



Les protéines PilB, nDsbD et DsbE1 de *Neisseria meningitidis* : caractérisation enzymatique, fonctionnelle et structurale

Laure Selme-Roussel

► To cite this version:

Laure Selme-Roussel. Les protéines PilB, nDsbD et DsbE1 de *Neisseria meningitidis* : caractérisation enzymatique, fonctionnelle et structurale. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10089 . tel-01746332

HAL Id: tel-01746332

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746332>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie, Santé et Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Enzymologie Moléculaire et Biologie Structurale

par Laure SELME-ROUSSEL

Les protéines PilB, DsbD et DsbE de *Neisseria meningitidis* : Caractérisation enzymatique, structurale et fonctionnelle

Soutenance publique le 9 Novembre 2010

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Mme G. Bonnard	Directeur de Recherche, CNRS, ULP Strasbourg
	M F. Rodrigues-Lima	Professeur, Université Paris Diderot-Paris 7
Examineurs :	Mme L. Pieulle	Chargée de Recherche, CNRS, Marseille
	M G. Duménil	Chargé de Recherche, Inserm, Paris
	M JP. Jacquot	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Directeurs de thèse :	Mme S. Boschi-Muller	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M C. Jacob	Maître de conférence, Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Laure SELME-ROUSSEL

**Les protéines PilB, DsbD et DsbE de *Neisseria meningitidis* :
Caractérisation enzymatique, fonctionnelle et structurale**

Le 9 Novembre 2010

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Mme G. Bonnard	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg
	M F. Rodrigues-Lima	Professeur, Université Paris Diderot-Paris 7
Examineurs :	Mme L. Pieulle	Chargée de Recherche, CNRS, Marseille
	M G. Duménil	Chargé de Recherche, Inserm, Paris
	M JP. Jacquot	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	Mme S. Boschi-Muller	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I, Directeur de thèse
	M C. Jacob	Maître de conférence, Université Henri Poincaré, Nancy I, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à Madame le Docteur Christiane Branlant, Directeur de l'UMR 7214 CNRS-UHP, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi qu'à Monsieur le Professeur Guy Branlant, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale pour ses enseignements, la formation, la rigueur, la culture scientifique qu'il m'a transmis au cours de mon Master et ma thèse, et jusque dans la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller et à Monsieur le Docteur Christophe Jacob (P'tit Christophe), qui ont encadré ce travail. Je leur suis reconnaissante pour leur générosité, leur disponibilité, leurs compétences, leurs conseils, leur sens de l'écoute et toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues au cours de ces cinq dernières années (et oui, ça passe vite !). Merci pour leur aide tout au long de mon Master et de ma thèse, et pour la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite remercier Madame le Docteur Géraldine Bonnard et Monsieur le Professeur Fernando Rodrigues-Lima, qui ont accepté de rapporter cette thèse, ainsi que Madame le Docteur Laetitia Pieulle, Monsieur le Docteur Guillaume Duménil et Monsieur le Professeur Jean-Pierre Jacquot qui ont accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer au cours de cette thèse. Un grand merci à Marc Quinternet, Pascal Tsan, Chrystel Beaufils et Manh-Thong Cung du LCPM (UMR 7568 CNRS-ENSIC) pour les fructueuses études structurales par RMN. Merci également à Guillaume Béchade, Sarah Sanglier et à l'ensemble du laboratoire LSMBO à Strasbourg (UMR 7509 CNRS-ULP) pour m'avoir si bien accueillie et permis de m'initier à la spectrométrie de masse. Enfin, merci à Annick Brun et à Joëlle Gérard (UMR A 1136 INRA-UHP) pour avoir pris un peu de leur temps pour la partie microscopie électronique.

Je veux remercier tout particulièrement Sabrina pour son énorme travail sur le projet, mais surtout pour son amitié, sa gentillesse et sa bonne humeur, et pour m'avoir supporté, aidé et soutenue quand il le fallait durant ces deux dernières années ; de même, je remercie la petite Carine (la Marseillaise !) pour sa large contribution au projet et pour tous les bons moments passés ensemble, et enfin au grand Christophe pour sa précieuse assistance et son expertise technique. Merci aussi à Arnaud pour son écoute, ses conseils et pour avoir essayé de m'initier à la cristallogénèse... (pêtre qu'un jour ça finira par cristalliser !)

Merci à Sophie, Hortense, François, Sev, Alex, Hélène pour leurs conseils, les discussions, les coups de mains et la bonne humeur partagés ensemble. Merci à l'ensemble des (ex-) membres du laboratoire AREMS (ex-MAEM), et plus particulièrement pour les très bons moments passés (et j'espère encore à venir) avec Flo (et Jérôme), Baptiste (P'tit Poulet), Audrey, Alex'andra, Raph, Gaby, Adeline, Mathias, le banc de « Morues », et tous ceux et celles qui m'en voudront de ne pas avoir noté leur nom ici...

Merci à ma famille ainsi qu'à ma « jolie »-famille, et particulièrement à ma maman qui, sans le faire exprès, m'a donné le goût pour la recherche, à mon papa et à mon frère qui est retourné aux sources. Je remercie aussi mes amis, avec une pensée spéciale pour Hélène (et Pierre-Olivier bien sûr) et pour Oriane qui sont déjà passées par là, pour leur soutien et toute leur amitié.

Enfin, je remercie Xavier, mon ch'ti mari que j'aime, qui m'a si bien accompagné depuis mon arrivée au laboratoire et pour qui la rédaction de cette thèse n'a pas forcément été un long fleuve tranquille... Je le remercie de savoir si bien m'écouter, me soutenir et m'encourager quand il le faut, et d'être si patient avec moi.

Table des Matières

Abréviations

Introduction

Partie I. Les bactéries pathogènes du genre <i>Neisseria</i>	1
1. Généralités	1
1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3
2. Pathogénicité des <i>Neisseria</i>	4
2.1. Facteurs de virulence	4
2.1.1. La capsule	5
2.1.2. Le lipopolysaccharide (LPS)	6
2.1.3. Protéines de la membrane externe	7
2.1.3.a. Les protéines du pili de type IV	8
2.1.3.b. Les protéines d'opacité : Opa et Opc	9
2.1.3.c. Autotransporteurs : NhhA et App	10
2.1.3.d. Protéase de l'IgA	10
2.1.3.e. Systèmes de capture du fer	10
2.2. Traitements et vaccination	11
3. Lutte des <i>Neisseria</i> contre les stress oxydant et nitré	11
3.1. Génération des ERO et ERA	12
3.1.1. NADPH oxydase phagocytaire	12
3.1.1.a. L'anion superoxyde	13
3.1.1.b. Le peroxyde d'hydrogène	13
3.1.1.c. Le radical hydroxyle	13
3.1.2. Oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)	14
3.1.2.a. L'oxyde nitrique	14
3.1.2.b. Le peroxynitrite	15
3.2. Cibles moléculaires des ERO et ERA	15
3.2.1. Les acides nucléiques	15
3.2.2. Les lipides	15
3.2.3. Les protéines	16
3.3. Systèmes de défenses de <i>N. meningitidis</i> et <i>N. gonorrhoeae</i>	16
3.3.1. Détoxification des ERO	17
3.3.1.a. Catalases (Kat)	17
3.3.1.b. Superoxyde dismutase (Sod)	18
3.3.1.c. Les peroxydases	19
3.3.1.d. Transporteur de Manganèse	20
3.3.1.e. Défenses basées sur les thiols	20
3.3.2. Détoxification des ERA	21
3.3.3. Régulations de la réponse au stress	22
Partie II. Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr)	23
1. Rôles des Msr	24
1.1. Lutte contre le stress oxydant	24
1.2. Vieillesse cellulaire	24
1.3. Régulation / réparation de protéines	25
1.4. Pathogénicité	26
1.4.1. Adhérence	26
1.4.2. Formation du biofilm	27
1.4.3. Motilité	27

Table des Matières

1.4.4. Survie.....	28
1.4.5. Résistance aux oxydants.....	28
2. Propriétés des Msr.....	29
2.1. Organisation génomique / Régulation.....	29
2.2. Localisation des Msr dans les cellules eucaryotes.....	30
2.2.1. MsrA.....	30
2.2.2. MsrB.....	30
2.3. Mécanisme catalytique des Msr.....	30
2.4. Classes de Msr.....	32
2.4.1. MsrA.....	32
2.4.2. MsrB.....	34
2.4.3. fRMsr.....	35
2.5. Structures tridimensionnelles des Msr.....	36
2.5.1. MsrA.....	36
2.5.2. MsrB.....	38
2.5.3. fRMsr.....	40
 Partie III. Les « Trx-like » périplasmiques.....	 43
1. La famille des « Trx-like ».....	43
1.1. Structures tridimensionnelles des « Trx-like ».....	43
1.2. Propriétés redox des protéines « Trx-like ».....	44
1.3. Mécanisme catalytique des protéines « Trx-like ».....	44
2. Les « Trx-like » cytoplasmiques des bactéries à Gram-négatif.....	45
2.1. Les Trx.....	45
2.2. Les Grx.....	46
3. Les « Trx-like » périplasmiques des bactéries à Gram-négatif.....	47
3.1. Formation et isomérisation des ponts disulfures par les protéines DsbA, DsbC/DsbG et DsbD.....	47
3.1.1. La DsbA.....	48
3.1.2. Les DsbC / DsbG.....	49
3.1.3. La protéine DsbD est le réducteur de la DsbC et de la DsbG.....	50
3.2. Rôle de la DsbE dans la maturation des cytochromes c.....	53
3.2.1. Les trois systèmes de maturation des cytochromes de type c.....	54
3.2.1.a. Le système I.....	55
3.2.1.b. Le système II.....	56
3.2.1.c. Le système III.....	57
3.2.2. Propriétés des DsbE.....	58
3.2.2.a. Propriétés biochimiques des DsbE.....	59
3.2.2.b. Caractéristiques structurales des DsbE.....	59
3.2.3. Cytochromes de type c de <i>N. meningitidis</i>	61
3.3. Le domaine Nter de PilB.....	62
 Partie IV. La protéine PilB.....	 65
1. Historique.....	65
2. PilB, une protéine périplasmique.....	65
3. PilB de <i>N. gonorrhoeae</i> serait impliquée dans la résistance au stress oxydant.....	66
4. Le domaine Nter isolé de PilB recycle efficacement le domaine MsrB isolé.....	66
5. Le gène <i>pilB</i> n'est présent que dans le génome de quelques bactéries.....	66
 Objectifs.....	 69

Résultats

Partie I : Etude du recyclage des activités Msr dans les protéines PilB de <i>N. meningitidis</i> et de <i>F. nucleatum</i>.....	71
1. Etude de la protéine PilB entière de <i>N. meningitidis</i>.....	71
1.1. Production, purification de la protéine PilB entière et des variants Cys.....	71
1.2. Le domaine Nter ne réduit efficacement que le domaine MsrB dans PilB.....	73
1.2.1 Détermination de la stœchiométrie de formation de méthionine.....	73
1.2.2. Vitesse de formation de méthionine avec le variant NmNterMsrBPilB.....	74
1.3. Les deux domaines Msr fonctionnent indépendamment dans PilB.....	75
1.3.1. Caractérisation des propriétés de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés dans PilB.....	75
1.3.2. Vitesses de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 MsrA et Cys63-Cys117 MsrB dans les protéines PilB entières.....	76
1.3.2.a. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrA pour le variant NmMsrAPilB.....	77
1.3.2.b. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrB pour le variant NmMsrBPilB.....	77
1.4. La réduction du domaine MsrB par le domaine Nter suit un mécanisme de type intramoléculaire.....	79
1.4.1. Vitesse de réduction du domaine MsrB oxydé sous forme pont disulfure de NmNterMsrBPilB par le domaine Nter de NmNterMsrBPilB.....	79
1.4.2. La réduction du domaine MsrB dans PilB est un mécanisme intramoléculaire.....	81
1.5. Conclusions.....	82
2. Etude des propriétés biochimiques et enzymatiques des domaines isolés de PilB de <i>F. nucleatum</i>.....	82
2.1. Clonage de l'ORF <i>pilB</i> et stratégie de construction des plasmides en vue de produire les trois domaines séparément.....	82
2.2. Production et purification des trois domaines isolés de la protéine PilB de <i>F. nucleatum</i>.....	83
2.3. Réduction du substrat Met-O par les domaines FnMsrA et FnMsrB en absence de réducteur.....	84
2.4. Caractérisation enzymatique des trois domaines.....	85
2.4.1. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire des trois domaines.....	85
2.4.2. Propriétés de fluorescence des trois domaines isolés de <i>F. nucleatum</i>	85
2.4.3. Etape réductase des domaines FnMsr.....	86
2.4.4. Réduction des domaines FnMsr par le domaine FnNter.....	87
2.5. Sélectivité de réduction des domaines Msr par les domaines N-terminaux de PilB de <i>F. nucleatum</i> et de <i>N. meningitidis</i>.....	89
2.6. Conclusion concernant les domaines isolés de la protéine PilB de <i>F. nucleatum</i>.....	90
3. Etude de la protéine PilB entière de <i>F. nucleatum</i>.....	91
3.1. Production, purification des protéines PilB entières et des variants Cys.....	91
3.2. FnNter réduit MsrA et MsrB dans PilB.....	92
3.2.1. Détermination de la stœchiométrie de formation de la méthionine.....	92
3.2.2. Vitesse de formation de la méthionine pour les variants FnNterMsrAPilB et FnNterMsrBPilB.....	93
3.2.2.a. Variant FnNterMsrAPilB.....	93
3.2.2.b. Variant FnNterMsrBPilB.....	94
3.3. Les domaines Msr dans FnPilB.....	96
3.3.1. Caractérisation des propriétés de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés dans PilB.....	96

Table des Matières

3.3.2. Vitesses de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 MsrA ou Cys63-Cys117 MsrB dans FnPilB.....	97
3.3.2.a. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrA avec le variant FnMsrAPilB.....	97
3.3.2.b. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrB avec le variant FnMsrBPilB.....	98
3.4. Réduction des domaines FnMsr dans PilB.....	99
3.4.1. Vitesse de réduction des domaines Msr oxydés sous forme de pont disulfure par les domaines Nter avec des variants FnNterMsrPilB.....	99
3.4.1.a. Etude du variant FnNterMsrAPilB.....	99
3.4.1.b. Etude du variant FnNterMsrBPilB.....	101
3.4.2. Réduction des variants FnMsrAPilB et FnMsrBPilB oxydés sous forme pont disulfure par le variant FnNterPilB.....	102
3.5. Conclusions.....	103
4. PilB de <i>N. meningitidis</i> in vivo.....	104
4.1. Localisation de PilB.....	104
4.1.1. PilB n'est pas une lipoprotéine.....	104
4.1.2. PilB n'est pas ancrée à la membrane externe.....	106
4.2. Effet de la délétion du gène <i>pilB</i> chez <i>N. meningitidis</i>.....	107
4.2.1. Délétion du gène <i>pilB</i>	107
4.2.2. Effet d'un stress oxydant sur une souche de <i>N. meningitidis</i> délétée du gène <i>PilB</i>	108
 Partie II : La protéine nDsbD de <i>N. meningitidis</i>.....	 109
1. Caractérisation <i>in vitro</i> de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>.....	111
1.1. Production et purification de la nDsbD sauvage de <i>N. meningitidis</i> et de différents mutants.....	111
1.2. Caractérisation biochimique de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>.....	112
1.2.1. Détermination des pK _a des cystéines de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>	112
1.2.2. Détermination du potentiel redox de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>	114
1.2.2.a. Propriétés d'émission de fluorescence de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>	114
1.2.2.b. Potentiel redox de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i>	115
1.3. Propriétés de la nDsbD de <i>N. meningitidis</i> en tant que disulfure oxydoréductase...116	
1.4. Étude structurale et dynamique du complexe covalent entre la nDsbD et le domaine Nter de PilB de <i>N. meningitidis</i> par RMN.....	118
1.4.1. Caractérisation de la cystéine de la nDsbD impliquée dans le pont disulfure transitoire avec le domaine Nter de PilB.....	119
1.4.2. Etude structurale et dynamique du mutant C103S de la nDsbD par RMN.....	120
1.4.3. Etude structurale et dynamique du complexe covalent entre la nDsbD et le domaine Nter de PilB par RMN.....	121
 Partie III : La DsbE1 de <i>N. meningitidis</i>.....	 125
1. Etude <i>in vitro</i> de la réduction de cibles par la DsbE1 de <i>N. meningitidis</i>.....	126
1.1. Réduction d'un apocytochrome c_x oxydé par la DsbE1.....	126
1.1.1. Production et purification de l'apocytochrome c _x de <i>N. meningitidis</i>	126
1.1.2. Réduction de l'apocytochrome c _x de <i>N. meningitidis</i> par la DsbE1.....	127
1.2. Réduction de peptides mimant un apocytochrome c.....	129
1.2.1. Rôle du résidu histidine invariant du motif des cytochromes c.....	129
1.2.2. Etude de la vitesse de la réduction du peptide ASCKSCHDS par la DsbE1 en fonction du pH.....	130
2. Phénotype d'une souche Δ<i>dsbE1</i> de <i>N. meningitidis</i>.....	131
2.1. Délétion du gène <i>dsbE1</i> de <i>N. meningitidis</i>.....	131
2.1.1. Gène <i>dsbE1</i> sous le contrôle du promoteur LacIOP.....	131

2.1.2. Remplacement du gène <i>dsbE1</i> par recombinaison homologue.....	132
2.2. Caractérisation du mutant $\Delta dsbE1$ de <i>N. meningitidis</i>	132

Discussion et Perspectives

Partie I. La protéine PilB.....	135
1. Reconnaissance entre le domaine Nter et les domaines Msr isolés.....	136
2. Réduction des domaines Msr dans PilB.....	138
3. Rôle de PilB <i>in vivo</i>	140
Partie II. La nDsbD, partenaire réducteur de PilB.....	142
Partie III. La DsbE1 de <i>N. meningitidis</i>.....	144

Annexes

Annexe 1 : Publication 1.....	147
Annexe 2 : Publication 2.....	151
Annexe 3 : Publication 3.....	165

Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique et milieux de culture.....	181
1.1. Souches bactériennes.....	181
1.2. Vecteurs plasmidiques.....	181
1.3. Milieux de culture bactérienne.....	182
1.3.1. Milieu riche LB (Luria Bertani).....	182
1.3.2. Milieu autoinductible ZYM 5052 (Studier, 2005).....	182
1.3.3. Milieu riche SOC.....	183
1.3.4. Milieu minimum M9.....	183
1.3.5. Milieux pour la culture de <i>N. meningitidis</i>	183
2. Techniques de génie génétique.....	184
2.1. Extraction d'ADN génomique de <i>N. meningitidis</i>	184
2.2. Préparation de l'ADN plasmidique.....	184
2.2.1. La minipréparation.....	184
2.2.2. Préparation et transformation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	184
2.2.3. Préparation et transformation des cellules compétentes de <i>N. meningitidis</i>	185
2.3. Mutagenèse du matériel plasmidique.....	185
2.4. Clonage des ORF codant les protéines étudiées.....	186
3. Production et purification des différentes protéines.....	186
3.1. Production des protéines recombinantes étudiées (NmPilB, FnMsrA, FnMsr B, FnPilB, DsbE1 et nDsbD).....	186
3.2. Désintégration des cellules.....	187
3.3. Purifications.....	187
3.3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	187
3.3.2. Filtration sur gel.....	187
3.3.3. Chromatographie d'échange d'anions.....	188
3.3.4. Chromatographie par interactions hydrophobes.....	188
3.3.5. Purification du cytochrome c_x	188

Table des Matières

3.3.6. Concentration et conservation des protéines.....	188
4. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes.....	189
4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	189
4.2. Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes.....	189
4.3. Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines.....	189
4.4. Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB) ou par le dithiodipiridine (2-PDS).....	190
4.5. Spectres de fluorescence des protéines réduites et oxydées.....	190
4.6. Potentiels redox à l'équilibre.....	190
4.7. Spectres de dichroïsme circulaire.....	191
5. Préparation des substrats sulfoxydes.....	191
6. Techniques d'études des propriétés enzymatiques des protéines	191
6.1. Quantification de la Met en absence de réducteur.....	192
6.2. Détermination du K_M et du k_{cat} en présence du système réducteur Trx/Trx réductase/NADPH à l'état stationnaire.....	192
6.3. Cinétique d'apparition de Met par mélange rapide résolu en temps (« quenched flow »).....	193
6.4. Mesure de la vitesse de formation (ou d'échange) des ponts disulfures par spectroscopie de fluorescence résolue en temps (« stopped flow »).....	194
6.5. Vitesse de modification des Cys par le 2-PDS en fonction du pH.....	194
6.6. Formation de complexes covalents pont disulfure.....	194
 7. Rôle des protéines DsbE1, DsbE2 et PilB chez <i>N. meningitidis</i>	 194
7.1. Délétion des gènes correspondant.....	194
7.2. Construction du plasmide pFP10-PLacIOP- <i>dsbE1</i>	197
7.3. Vérification de l'expression des protéines par Western blotting.....	198
7.4. Tests vis-à-vis des ERO et ERA.....	199
7.5. Détection des cytochromes <i>c</i>	199
8. Localisation de la protéine PilB de <i>N. meningitidis</i>	200
8.1. Fractionnement subcellulaire.....	200
8.1.1. Méthode d'enrichissement des fractions membrane interne / membrane externe.....	200
8.1.2. Séparation des membranes par gradient de saccharose.....	200
8.2. Préparation des coupes de <i>N. meningitidis</i> pour la microscopie électronique à transmission (collaboration J. Gérard et Dr A. Brun-Jacob, UHP Nancy 1).....	201
8.3. Utilisation de la globomycine pour mettre en évidence une lipoprotéine.....	201
 Références bibliographiques.....	 203

Abréviations

AniA	: nitrite réductase
App	: protéine d'adhésion et de pénétration
AT	: autotransporteur
CaM	: calmoduline
CCHL	: cytochrome <i>c</i> hème lyase
Ccm	: cytochrome <i>c</i> maturation
Ccp	: cytochrome <i>c</i> peroxydase
CycP	: cytochrome <i>c</i> '
Dsb	: protéines « disulfide-bond »
DTNB / TNB	: dithionitrobenzoate / thionitrobenzoate
DTT	: dithiothréitol
ERA	: espèce réactive de l'azote
ERO	: espèce réactive de l'oxygène
FAD	: flavine adenine dinucléotide
FMN	: flavine mononucléotide
FPLC	: chromatographie liquide moyenne pression
fRMs _r	: « free- <i>R</i> -Msr »
Gpx	: glutathion peroxydase
Grx	: glutarédoxine
GSH	: glutathion ou γ - <i>L</i> -Glutamyl- <i>L</i> -cystéinyglycine
GST	: glutathione S-transférase
GTP	: guanosine triphosphate
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
iNOS	: oxyde nitrique synthase inductible
IPTG	: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Kat	: catalase
k_{cat}	: constante catalytique
k_{obs}	: constante de vitesse observée
k_2	: constante de vitesse de second ordre
Kdo	: 2-kéto-3-déoxyoctonate
K_S	: constante apparente d'affinité
K_M	: constante de Michaelis
LAMP1	: protéine membranaire de liaison du lysosome de type 1
LB	: Luria Bertani
LPS / LOS	: lipopolysaccharide / lipooligosaccharide
MES	: acide 2-(N-Morpholino)-éthanesulfonique
Met-O	: méthionine sulfoxyde (<i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O ou Ac- <i>L</i> -Met- <i>R,S</i> -O-NHMe)
Msr	: méthionine sulfoxyde réductase
NAD(P)H	: nicotinamide dinucléotide (phosphate), forme réduite
Nhha	: « <i>Neisseria</i> hsf/hia homolog A »
Nter	: domaine N-terminal de PilB
NorB	: oxyde nitrique réductase
OM	: membrane externe
OMV	: vésicules de la membrane externe
ORF	: « Open Reading Frame »

Abréviations

PAGE	: gel d'électrophorèse en polyacrylamide
PDI	: protéine disulfure isomérase
PEA	: phosphoéthanolamine
<i>Pfu</i>	: ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
Phox	: NADPH oxydase phagocytaire
pKapp	: pKa apparent
PMN	: leucocytes polymorphonucléaire
Prx	: peroxyrédoxine
RMN	: résonance magnétique nucléaire
SAXS	: « Small Angles X ray Scattering »
SDS	: sodium dodécyle sulfate
Sod	: superoxyde dismutase
SRP	: particule de reconnaissance du signal
Srx	: sulfirédoxine
TFA	: acide trifluoroacétique
TLR4	: « Toll-like receptor 4 »
TNF	: « Tumor Necrosis Factor »
TPS	: « Two Partner Secretion »
Tris	: trishydroxyméthylaminométhane
Trx / TrxR	: thiorédoxine / thiorédoxine réductase
UQ	: ubiquinone
2-PDS / PDS	: 2,2'-dithiodipyridine / pyridine
<i>A. thaliana</i>	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. pertussis</i>	: <i>Bordetella pertussis</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. chrysanthemi</i>	: <i>Erwinia chrysanthemi</i>
<i>F. nucleatum</i>	: <i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
<i>M. genitalium</i>	: <i>Mycobacterium genitalium</i>
<i>M. penetrans</i>	: <i>Mycobacterium penetrans</i>
<i>M. pulmonis</i>	: <i>Mycobacterium pulmonis</i>
<i>M. smegmatis</i>	: <i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	: <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P. cryohalolentis</i>	: <i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
<i>R. capsulatus</i>	: <i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. gordonii</i>	: <i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. sanguis</i>	: <i>Streptococcus sanguis</i>
<i>X. campestris</i>	: <i>Xanthomonas campestris</i>

Introduction

Les bactéries *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* sont des bactéries pathogènes obligatoires de l'Homme. Ces espèces ont acquis différents mécanismes de défense pour détecter et combattre le stress oxydant généré par l'hôte lors de son infection. La protéine PilB périplasmique, spécifique de ces bactéries, ferait partie de ces défenses et serait de ce fait associée à la pathogénicité de ces bactéries. Deux formes protéiques sont produites à partir du gène *pilB* : une forme cytoplasmique composée de deux domaines portant une activité méthionine sulfoxyde réductase (Msr), respectivement de classes A et B, et une forme PilB périplasmique, qui serait impliquée dans la résistance au stress oxydant, et composée d'un domaine supplémentaire situé à l'extrémité N-terminale ayant une activité disulfure oxydoréductase de type thiorédoxine (Trx) et appartenant à la famille structurale des DsbE.

L'introduction de ce mémoire est divisée en quatre parties. Une première partie est consacrée aux bactéries pathogènes du genre *Neisseria* et à la présentation de leurs activités antioxydantes, dans la deuxième partie sont présentés les rôles et les activités Msr, la troisième partie porte sur les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines de type « Trx-like », et la quatrième partie est un état des lieux sur la protéine PilB au début de ma thèse.

Partie I. Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

1. Généralités

Les bactéries du genre *Neisseria* appartiennent au groupe des β -protéobactéries. Elles se caractérisent par un aspect morphologique particulier : ce sont des bactéries à Gram-négatif se présentant sous la forme de grains de café ou diplocoques à face aplatie. Les *Neisseria* sont des bactéries immobiles, aérobies strictes, chimiohétérotrophes, catalase positive et oxydase positive. Plusieurs espèces commensales peuvent être isolées au sein de la flore oropharyngée de l'Homme telles que *N. lactamica*, *N. sicca* ou *N. flava*. Seules les deux espèces suivantes sont pathogènes pour l'Homme :

- *N. meningitidis* est responsable chaque année de méningites, de graves septicémies et plus rarement de pneumonies, d'arthrites septiques, de péricardites et de conjonctivites chez des centaines de milliers de personnes dans le monde. Le taux de porteurs sains varie de 5 à 15 % ;
- *N. gonorrhoeae* est l'agent responsable de la gonococcie (blennorragie ou gonorrhée) au niveau des muqueuses génitales. Il n'y a jamais de porteurs sains. L'infection est souvent associée à d'autres infections sexuellement transmissibles. Une forte recrudescence de la maladie est observée depuis 1990. Le nombre de cas en France est de l'ordre de 1000 / an.

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

1.1. *Neisseria meningitidis*

Au moins 13 sérogroupes différents sont recensés pour *N. meningitidis*, basés sur des différences de composition de la capsule polysaccharidique : A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, H, I, K, L et W135 (Ala'Aldeen *et al.*, 1990 ; Stephens *et al.*, 2009) (voir paragraphe 2.1.a). Les infections invasives par *N. meningitidis* sont essentiellement dues aux groupes A, B, C et plus récemment W135 et Y. Il existe deux types d'épidémiologies (Figure 1) :

- endémo-épidémique localisée en Europe et en Amérique du Nord, avec une prédominance des sérogroupes B et C. En France, l'incidence est de 1 cas / 100 000 habitants / an environ, avec 8,5 cas / 100 000 / an chez les adolescents avec prédominance des sérogroupes B (60 %) et C (30 %), et seulement 3 % du sérogruppe A.
- épidémique localisée essentiellement en Afrique entre les deux tropiques, zone géographique appelée ceinture méningée, avec une prédominance du sérogruppe A et plus récemment du sérogruppe W135 (surtout depuis 2000).

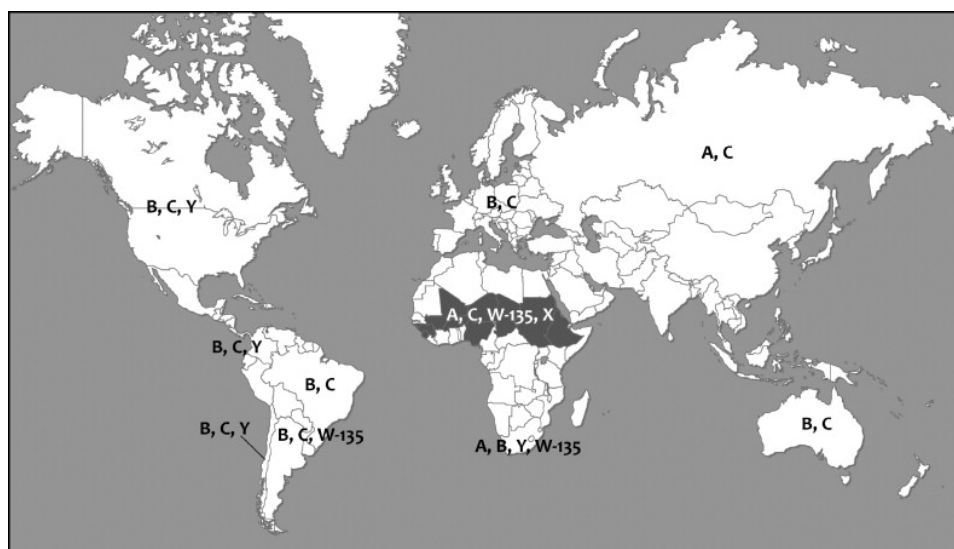


Figure 1 : Distribution des sérogroupes majeurs de *N. meningitidis* (d'après Harrison *et al.*, 2009). La ceinture méningée est indiquée en gris sur la carte ainsi que les principaux sérogroupes (A,B, C, X, Y et W-135) recensés sur les différents continents.

En se basant sur huit génomes de *N. meningitidis* séquencés, la taille moyenne des chromosomes est de 2 à 2,3 mégabases avec environ 2 000 gènes identifiés (Stephens *et al.*, 2009). A chaque nouveau génome séquencé, 40 à 50 nouveaux gènes ont été identifiés. Par exemple, la souche 8013 a un génome de 2,3 mégabases contenant 2206 gènes. De nombreux éléments génétiques mobiles sont présents, tels que les éléments IS (pour « Insertion Sequence ») et des séquences de prophages, et représentent environ 10 % du génome. L'évolution rapide du génome des bactéries du genre *Neisseria* est due au fait qu'elles sont naturellement compétentes.

N. meningitidis se transmet par l'inhalation de gouttelettes de respiration provenant d'un sujet porteur. La bactérie établit alors un contact étroit avec les cellules épithéliales non ciliées de la muqueuse des voies respiratoires supérieures. Elle peut ensuite pénétrer dans les cellules épithéliales puis ressortir par la surface apicale de ces cellules et être transmise à un nouvel hôte (Figure 2). Le portage asymptomatique est fréquent chez l'adulte sain : les bactéries traversant la barrière épithéliale sont éliminées par les défenses de l'hôte. *N. meningitidis* peut traverser la barrière épithéliale par transcytose ou par les phagocytes comme des « chevaux de Troie ». Chez les individus sensibles, les bactéries une fois dans la circulation sanguine, peuvent survivre, se multiplier rapidement et diffuser dans tout le corps (septicémie) et le cerveau. Le passage de la bactérie à travers l'endothélium vasculaire cérébral est possible, entraînant une infection des méninges et du liquide céphalo-rachidien (Vandeputte-Rutten *et al.*, 2003). Le TNF (pour « Tumor Necrosis Factor ») des macrophages ainsi que le lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie peuvent causer des dommages toxiques pour les cellules épithéliales non ciliées de la muqueuse (Edwards et Apicella, 2004).

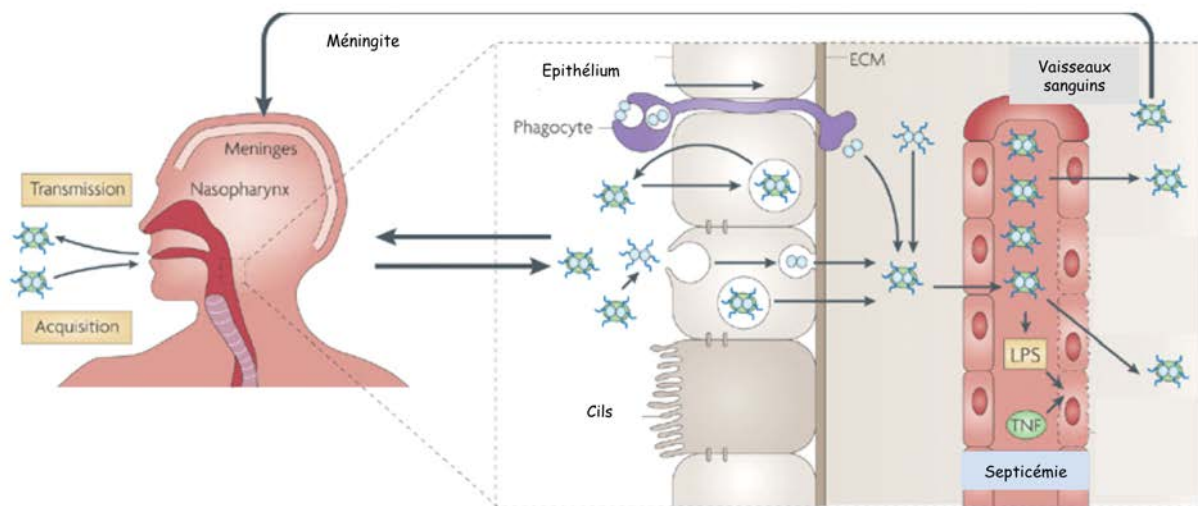


Figure 2 : Etapes de l'infection par *N. meningitidis* (d'après Virji, 2009).

ECM : matrice extracellulaire, TNF : « Tumor Necrosis Factor », LPS : lipopolysaccharide.

1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae s'est adaptée à une niche écologique différente de *N. meningitidis* puisque son site de prédilection est l'appareil urogénital féminin. L'analyse des génomes séquencés de *N. gonorrhoeae* montre que 80 à 90 % des phases de lecture présentes sont également présentes chez *N. meningitidis*. La plupart des protéines et composants identifiés chez *N. gonorrhoeae* existent aussi chez *N. meningitidis*. Par contre, *N. gonorrhoeae* ne possède pas de capsule.

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

N. gonorrhoeae se transmet par contact sexuel et établit l'infection dans les voies urogénitales en interagissant avec les cellules non ciliées de l'épithélium, aboutissant à l'invasion cellulaire (Figure 3). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués lors du contact de la bactérie sur les muqueuses des hommes et des femmes soient différents, l'infection entraîne en général une inflammation et un afflux de leucocytes polymorphonucléaires (PMN). Cependant l'infection chez les femmes reste souvent asymptomatique. Les bactéries phagocytées par les PMN sont ensuite sécrétées avec l'exsudat. Le TNF des macrophages ainsi que le peptidoglycane et les LPS de la bactérie, causent également des dommages toxiques pour les cellules épithéliales non ciliées de la muqueuse (Edwards et Apicella, 2004).

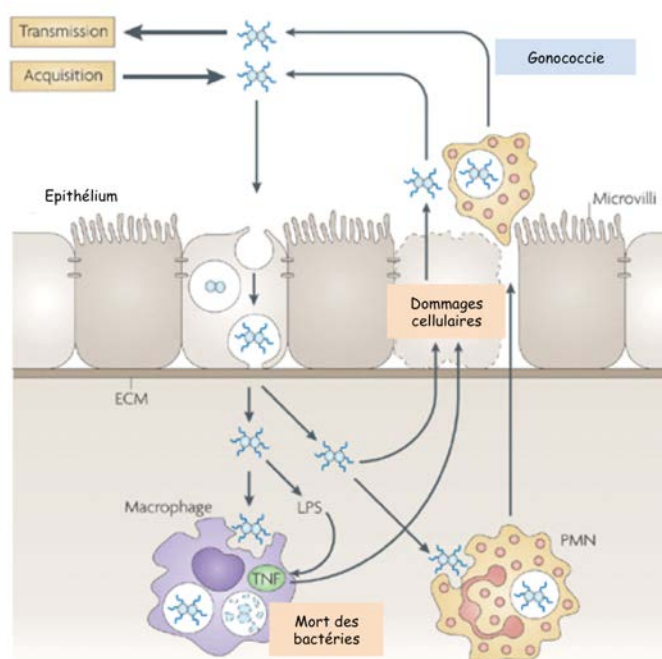


Figure 3 : Etapes de l'infection par *N. gonorrhoeae* (d'après Virji, 2009).

ECM : matrice extracellulaire ; PMN : leucocytes polymorphonucléaires, TNF : « Tumor Necrosis Factor ».

2. Pathogénicité des *Neisseria*

2.1. Facteurs de virulence

La structure de l'interface entre la cellule hôte et la bactérie pathogène est très importante. Pour la bactérie, cette structure est généralement constituée des polysaccharides de la capsule et / ou de LPS, ainsi que des pili et des protéines dites de la membrane externe telles que les adhésines et les porines (Figure 4). Cet ensemble constitue un « bouclier » à la surface bactérienne, qui empêche les peptides antimicrobiens d'accéder à la membrane externe. Les peptides antimicrobiens sont produits par les cellules du système immunitaire, telles que les neutrophiles ou les cellules épithéliales (Lo *et al.*, 2009). Ces peptides antimicrobiens sont des

molécules chargées positivement, qui appartiennent à la famille des défensines ou des cathélicines, selon leur structure. Certains de ces peptides sont capables de se lier au LPS pour neutraliser l'effet endotoxine. Ils agissent également comme molécules de transduction du signal pour activer la réponse immunitaire. Les bactéries rencontrent ce type de molécules à toutes les étapes de l'infection : au niveau du nasopharynx où les peptides sont sécrétés à la surface de la muqueuse (Hiemstra, 2007) et lors de l'invasion des cellules épithéliales qui contiennent des peptides intracellulaires. De plus, les neutrophiles circulants sont recrutés au niveau du site de colonisation où ils vont produire de l'élastase, de la lactoferrine et du lysozyme (Borregaard *et al.*, 2007).

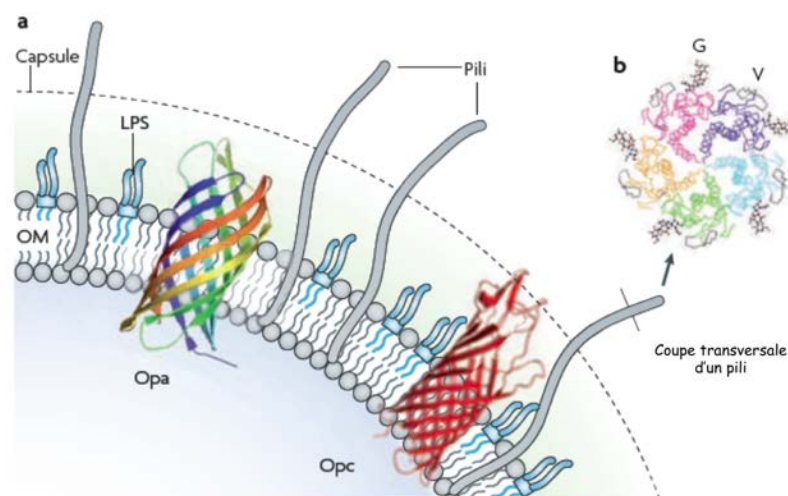


Figure 4 : Représentation schématique de certains constituants de la membrane externe de *N. meningitidis* permettant l'interaction avec la cellule hôte (d'après Virji, 2009).

a. Les pili traversent la capsule. Les adhésines de la membrane externe (OM) Opa et Opc, et les LPS interagissent avec les récepteurs des cellules hôtes.

b. Coupe transversale d'un pilus montrant les domaines variables (V) et les glycanes (G) situés autour des domaines constants enfouis dans la fibre.

2.1.1. La capsule

La capsule chez *N. meningitidis* joue un rôle clé dans la progression de l'infection (pour rappel *N. gonorrhoeae* ne possède pas de capsule). Elle est composée de dérivés d'acide sialique (sauf pour les sérogroupes A et X), qui confèrent à la bactérie des propriétés antiphagocytaires lui permettant de mieux survivre dans le sang et le système nerveux central (Tableau 1). Les propriétés stériques de la capsule vont empêcher la plupart des peptides antimicrobiens de la traverser. Toutes les souches virulentes sont capsulées.

La synthèse et l'export de la capsule sont codés par trois régions différentes au niveau du génome de *N. meningitidis*. La région A code les protéines impliquées dans la synthèse de

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

l'acide sialique (gènes *synA-C* ou *siaA-C*) et l'élongation des polymères d'acide sialique (gène *synD* ou *siaD* spécifique à chaque séro groupe). Les régions B (*ctrE* et *ctrF*) et C (*ctrA-D*) codent les protéines constituant le complexe d'export de la capsule à travers les membranes interne et externe, par un mécanisme ATP-dépendant (Tzeng *et al.*, 2005).

Sérogroupe	Composition de la capsule
A	(α 1-6)- <i>N</i> -acétyl- <i>D</i> -mannosamine-1-phosphate
B	(α 2-8)-acide- <i>N</i> -acétylneuramique
C	(α 2-9)-acide- <i>N</i> -acétylneuramique
W135	6- <i>D</i> -Gal(α 1-4)-acide- <i>N</i> -acétylneuramique
X	(α 1-4)- <i>N</i> -acétyl- <i>D</i> -glucosamine-1-phosphate
Y	6- <i>D</i> -Glc(α 1-4)-acide- <i>N</i> -acétylneuramique

Tableau 1 : Composition des capsules des six sérogroupes de *N. meningitidis* les plus fréquents (d'après Stephens, 2009).

2.1.2. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide est également appelé lipooligosaccharide (LOS) ou endotoxine bactérienne. Il est présent de manière constitutive au niveau de la membrane externe de toutes les bactéries à Gram-négatif. Il est composé du lipide A et d'un cœur d'oligosaccharides (Figure 5). Le lipide A est composé d'un disaccharide de *N*-acétyl glucosamine. Chaque ose de glucosamine est acétylé en position 2 par de l'acide laurique, en position 3 par de l'acide laurique hydroxylé et phosphorylé en position 4. La structure 2-kéto-3-déoxyoctonate (Kdo)-lipide A est la structure minimale pour atteindre l'activité et la toxicité maximum de l'endotoxine (Zughaier *et al.*, 2005). Le lipide A est reconnu par le système immunitaire de l'hôte grâce au récepteur TLR4 (pour « Toll-Like Receptor 4 ») (Palsson-McDermott *et al.*, 2004). De récentes études ont montré qu'environ 9 % des isolats issus d'infection de *N. meningitidis* possèdent un lipide A modifié avec une des chaînes d'acide gras en moins. Ces souches présentant un lipide A modifié échappent d'avantage au système immunitaire de l'hôte car le lipide A est moins bien reconnu par le TLR4 (Fransen *et al.*, 2010).

Le groupement phosphoéthanolamine (PEA) du lipide A participe à la résistance des bactéries aux peptides antimicrobiens (Tzeng *et al.*, 2005).

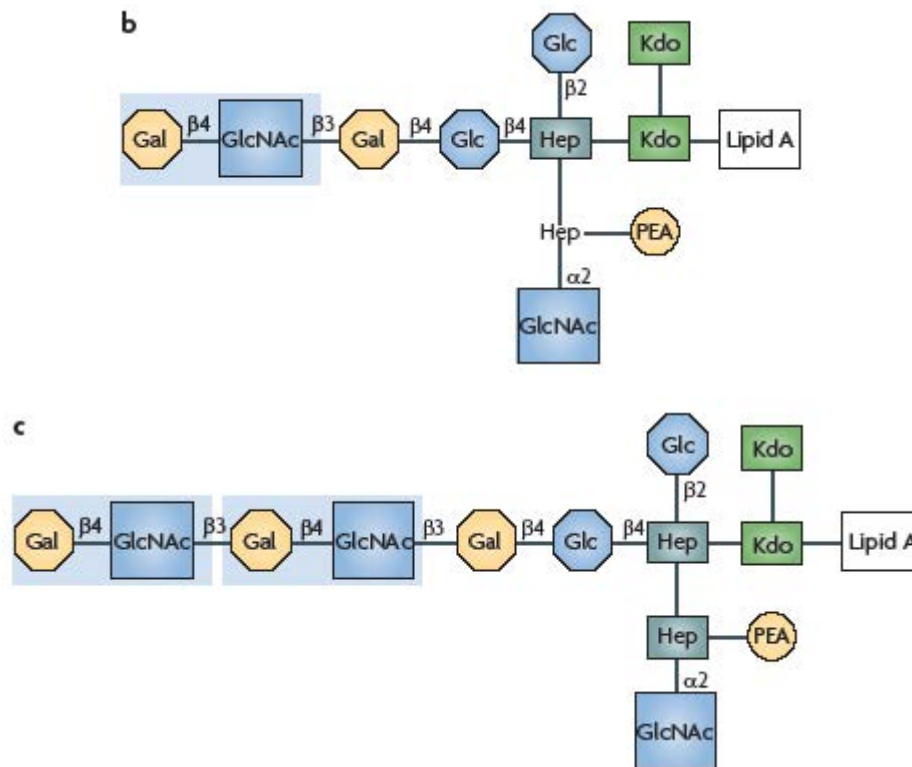


Figure 5 : Structure du LPS de *N. meningitidis* (b) et de *N. gonorrhoeae* (c) (d'après Vasta, 2009).

La partie en bleu clair est la partie carbohydrate reconnue par la galectine 3. Gal : Galactose, Glc : Glucose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, Hep : Heptose, Kdo : 2-kéto-3-déoxyoctonate, PEA : phosphoéthanolamine.

2.1.3. Protéines de la membrane externe

Les protéines de la membrane externe interviennent essentiellement dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte. La plupart sont des adhésines, dont les majeures sont les pili, Opa et Opc (Tableau 2). Elles favorisent l'agglutination des bactéries ce qui influence le taux d'adhésion aux cellules hôtes. Les autres sont des protéines de sécrétion. Les bactéries du genre *Neisseria* possèdent trois des six mécanismes de sécrétion des protéines utilisés par les bactéries à Gram-négatif : la voie autotransporteur (AT), la voie TPS pour « two-partner secretion » et le système de sécrétion de type I. Treize AT ont été identifiées dans les génomes de *Neisseria*. Cependant, *N. gonorrhoeae* n'en possède que deux : la protéase immunoglobuline A (IgA) et la protéine App, alors que *N. meningitidis* possède d'autres AT.

De plus, *N. meningitidis* produit des vésicules de la membrane externe (OMV pour « Outer Membrane Vesicles ») lors de sa croissance *in vitro* et lors de l'infection *in vivo*. Cependant leur contribution dans la virulence reste inconnue (Namork et Brandtzaeg, 2002).

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

Adhésine	Espèce	Fonction	Cible
Pili (type IV)	<i>Nm</i> / <i>Ng</i>	Adhésion et invasion	Cellules épithéliales et endothéliales
Opa	<i>Nm</i> / <i>Ng</i>	Adhésion et invasion	Cellules épithéliales et fibronectine
Opc	<i>Nm</i>	Adhésion et invasion	Cellules épithéliales et endothéliales, fibronectine et vitronectine
NhhA	<i>Nm</i>	Adhésion	Cellules épithéliales
App	<i>Nm</i> / <i>Ng</i>	Adhésion et diffusion	Cellules épithéliales
HrpA	<i>Nm</i>	?	Certaines lignées de cellules épithéliales
NadA	<i>Nm</i> *	Adhésion et invasion	Cellules épithéliales
MspA	<i>Nm</i> *	Adhésion	Cellules épithéliales et endothéliales

Tableau 2 : Principales protéines d'adhésion et d'invasion des bactéries du genre *Neisseria*.

Nm : *N. meningitidis*, *Ng* : *N. gonorrhoeae*. * Uniquement chez certaines souches ; ? non renseigné.

2.1.3.a. Les protéines du pili de type IV

Le pili de type IV est considéré comme le premier facteur d'attachement des *Neisseria* encapsulées aux muqueuses (Virji *et al.*, 1991 ; Nassif *et al.*, 1994). La biosynthèse du pili (Figure 6) de type IV implique une machinerie complexe constituée de nombreuses protéines (Pelicic, 2008). De récentes études ont montré que l'adhésion de *N. meningitidis* par les pili de type IV aux cellules endothéliales du cerveau recrute le complexe de polarité. Ce complexe est important dans l'établissement de la polarité des cellules eucaryotes et la formation des jonctions intercellulaires. Le recrutement du complexe de polarité entraîne un appauvrissement des protéines de jonction au niveau du site d'interaction avec les bactéries. Ceci induit l'ouverture des jonctions intercellulaires et facilite le passage de la bactérie à travers l'endothélium vasculaire cérébral (Coureuil *et al.*, 2009).

N. gonorrhoeae et *N. meningitidis* s'attachent aux cellules épithéliales et endothéliales grâce à la protéine PilC qui semble fonctionner comme une adhésine d'extrémité (Mattick, 2002). L'expression du gène de cette protéine est finement contrôlée par quatre promoteurs, deux facteurs de transcription et deux composants du système de transduction du signal. Des études récentes ont également montré l'existence d'une nouvelle protéine régulatrice supplémentaire (Jamet *et al.*, 2010).

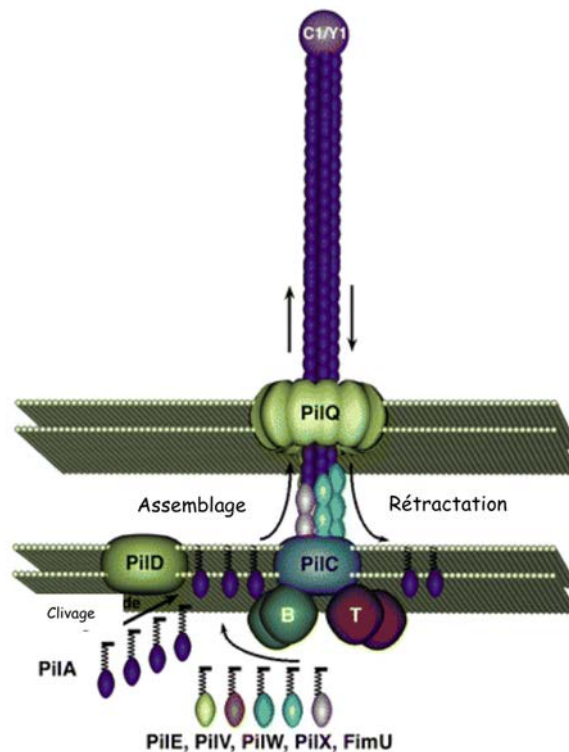


Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage et de la rétraction des pili de type IV (d'après Mattick, 2002).

Les séquences des pré-pilines sont clivées et la piline est N-méthylée par PilD. PilA est assemblée sur une base constituée de pilines mineures (PilE, V, W, X, et FimU) par l'action de la protéine de la membrane interne PilC. Puis le pilus est extrudé à travers la membrane externe *via* un pore composé d'un multimère de PilQ, stabilisé par la lipoprotéine PilP. La rétraction du pilus se fait par l'action de PilT.

2.1.3.b. Les protéines d'opacité : Opa et Opc

L'expression des protéines d'opacité Opa chez les bactéries du genre *Neisseria* les rend opaques (Swanson, 1978). Ces protéines sont transmembranaires et forment une structure en tonneau constitué de huit brins β dans la membrane externe de la bactérie avec quatre boucles exposées à la surface. Il existe des variations de structure au niveau de trois de ces boucles exposées. Une même souche peut exprimer une ou plusieurs protéines Opa différentes et dans différentes conditions. En effet, chez *N. meningitidis*, trois à quatre copies du gène *opa* sont retrouvées.

Chez *N. meningitidis*, une autre protéine d'opacité Opc, homologue à Opa, est exprimée. Cette protéine Opc n'est pas exprimée chez *N. gonorrhoeae*. Opc est également une protéine transmembranaire en forme de tonneau composé de dix brins β avec cinq boucles exposées à la surface (Olyhoek *et al.*, 1991).

Les protéines Opa et Opc interviennent dans l'adhésion et l'invasion. Elles vont surtout interagir avec les cellules endothéliales et épithéliales ainsi qu'avec les protéines de la matrice

Les bactéries pathogènes du genre Neisseria

extracellulaire, telles que la fibronectine et la vibronectine (pour revue Carbonnelle *et al.*, 2009). En effet, il a été montré que la protéine Opa se lie au protéoglycane à sulfate d'héparane (Virji *et al.*, 1996) et que la protéine Opc se lie à la fibronectine des cellules endothéliales (Unkmeir *et al.*, 2002).

2.1.3.c. Autotransporteurs : NhhA et App

Les protéines NhhA (pour « *Neisseria* hsf/hia homolog A ») et App (pour « Adhesion and penetration protein ») sont homologues aux protéines autotransporteurs Hsf / Hia et Hap de *Haemophilus influenzae*. La protéine NhhA est fortement exprimée dans les souches virulentes ; par contre la protéine App est présente dans toutes les souches de *Neisseria*. Il a été montré que la protéine App joue un rôle dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales (Serruto *et al.*, 2003). De même, la protéine NhhA intervient dans l'adhérence de la bactérie, puisqu'elle interagit avec les cellules épithéliales et les composants de la matrice extracellulaire, comme la laminine et le protéoglycane à sulfate d'héparane (Scarselli *et al.*, 2006).

2.1.3.d. Protéase de l'IgA

Les IgA de l'hôte jouent un rôle prépondérant dans la défense des muqueuses, d'où l'intérêt pour les *Neisseria* de posséder une protéase spécifique à ces IgA. La protéase de l'IgA1 est capable de cliver l'IgA1 humaine ainsi que la protéine membranaire de liaison du lysosome de type 1 (LAMP1). Le clivage de l'IgA1 prolonge la survie extracellulaire de la bactérie au niveau des muqueuses et le clivage de LAMP1 serait important pour la survie intracellulaire des pathogènes (van Ulsen et Tommasen, 2006).

2.1.3.e. Systèmes de capture du fer

La lactoferrine est libérée des granules des neutrophiles durant l'inflammation. C'est une glycoprotéine liant le fer présente dans de nombreux milieux de sécrétion. Les rôles biologiques décrits pour la lactoferrine concernent essentiellement la défense antimicrobienne et la réponse inflammatoire de l'organisme. En effet, ses propriétés de fixation du fer privent la bactérie pathogène de cet élément essentiel à sa croissance et à sa respiration. *N. meningitidis* exprime des récepteurs de surface qui fixent spécifiquement la lactoferrine humaine. Ces récepteurs, situés au niveau de la membrane externe, sont capables de capter le fer et de le transporter dans la cellule bactérienne (Perkins-Balding *et al.*, 2004).

2.2. Traitements et vaccination

La gravité et le risque d'évolution rapide des infections à méningocoque imposent la mise en place d'un traitement antibiotique le plus rapidement possible. Dans les pays dits industrialisés, ce sont les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime ou ceftriaxone) qui sont le plus couramment utilisées. En Afrique et en Asie du Sud-Est, pour des questions de coût et de modalités d'administration, le chloramphénicol est l'antibiotique utilisé en routine, sous forme injectable. Le traitement actuel lors d'une infection à gonocoque associe généralement une céphalosporine de troisième génération (ceftriaxone) avec obligatoirement un traitement contre les chlamydiae qui sont présentes dans plus de 25 % des cas de gonocoque. L'augmentation croissante des résistances acquises aux antibiotiques des deux espèces devient problématique surtout dans les pays d'Afrique.

Actuellement, une vaccination est possible pour la prévention des infections à méningocoque de séro groupe A, C, Y et W135. Le principe vaccinal est constitué de polysaccharide capsulaire purifié. Une injection protège pour une durée de 3 ans et l'immunité apparaît 10 jours après l'injection. Comme tous les vaccins polysaccharidiques, ces vaccins sont très peu efficaces chez le nourrisson et n'induisent pas de réponse mémoire. Récemment, un vaccin conjugué a fait son apparition pour le séro groupe C (Snape *et al.*, 2008). Il est efficace dès l'âge de 2 mois. Pour le séro groupe B, le polysaccharide est de même nature qu'un ose présent au niveau du cerveau et n'est donc pas immunogène. Il n'existe donc pas de prophylaxie vaccinale contre le principal séro groupe pathogène.

3. Lutte des *Neisseria* contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les neutrophiles et les macrophages, appartenant à la famille des phagocytes, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) (Figure 7) qui agissent en synergie ou séquentiellement pour détruire les pathogènes lors d'une infection (pour revue Fang, 2004). Les deux systèmes antimicrobiens les plus importants sont la NADH oxydase phagocytaire (phox) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui sont responsables respectivement de la génération de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et d'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$). En général, les neutrophiles produisent plus d'ERO alors que les macrophages produisent plus de ERA (Nathan et Shiloh, 2000).

L' $O_2^{\cdot-}$ et le $NO^{\cdot}$ sont produits directement et respectivement par la NADPH oxydase et l'oxyde nitrique synthase et vont conduire à la formation d'autres espèces réactives. La réactivité, la stabilité, la compartimentation et l'activité biologique de ces espèces activées sont

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

différentes. Elles vont pouvoir ensuite réagir avec de nombreuses cibles, ce qui leur confère un rôle plus ou moins bactéricide.

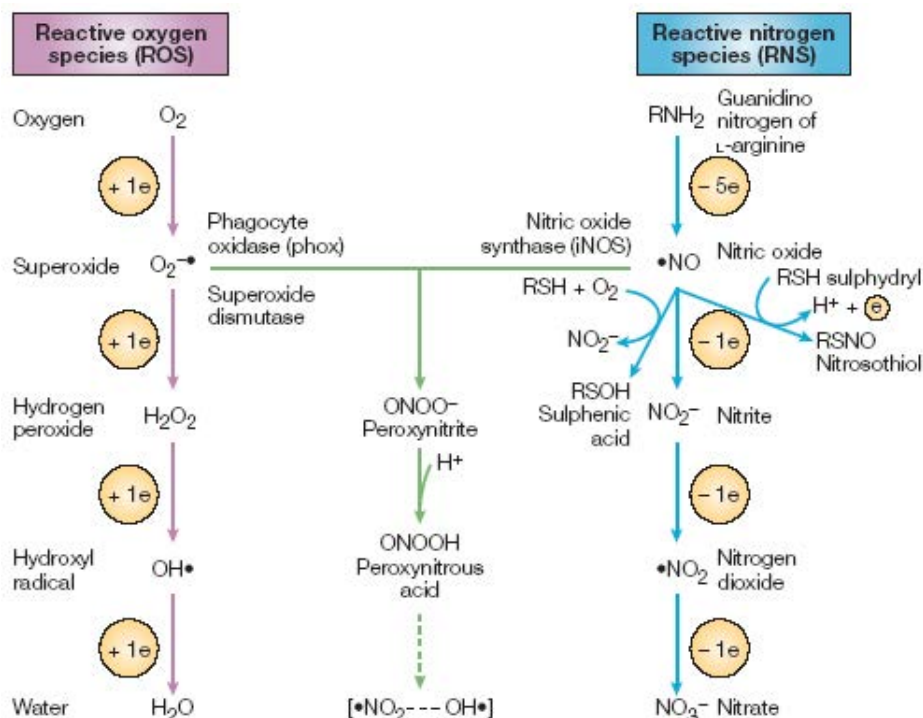


Figure 7 : Production des ERO et ERA par les cellules de mammifères (d'après Fang, 2004).
Phox : NADPH oxydase phagocytaire, iNOS : pour « inducible Oxyde Nitrique Synthase ».

3.1. Génération des ERO et ERA

3.1.1. NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique composé de deux protéines membranaires gp91-phox et p22-phox, de trois protéines cytosoliques p47-phox, p67-phox et Rac, ainsi que d'une protéine cytosolique non essentielle p40-phox pouvant jouer le rôle de régulateur. Les deux protéines membranaires constituent l'hétérodimère du flavocytochrome b_{558} (Figure 8).

Elle catalyse le transfert d'électrons de son substrat (NADPH) à l'accepteur final (O_2) entraînant la production d'anions superoxydes :



Lors de l'inflammation, la phosphorylation de p47-phox par des kinases entraîne un changement de conformation du complexe p47-phox / p40-phox / p67-phox qui va interagir avec le flavocytochrome b_{558} (gp91-phox / p22-phox). La protéine Rac-GTP est également requise pour l'assemblage et l'activation de l'oxydase.

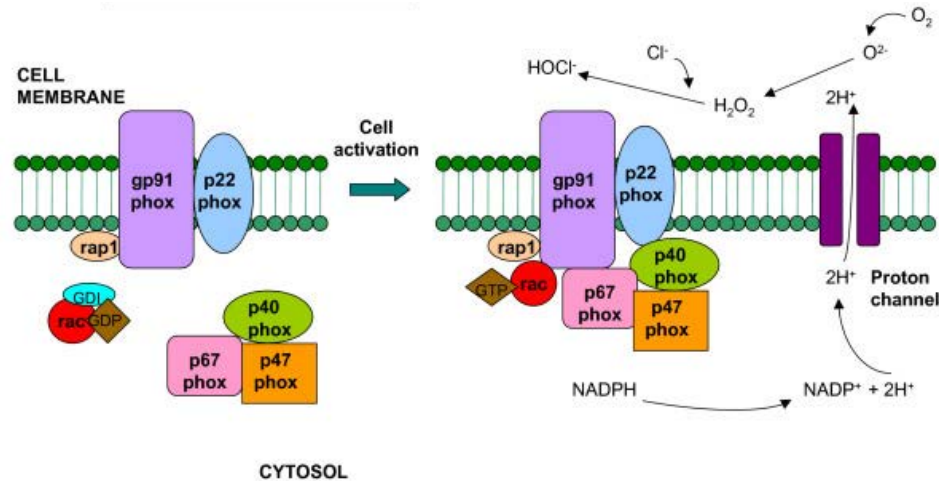


Figure 8 : Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire (d'après Assari, 2006).

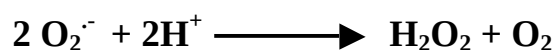
Le cytochrome b558 membranaire du phagocyte se compose de deux sous-unités : p22phox et gp91phox. Les sous-unités cytosoliques p67phox, p47phox, p40phox et la protéine Rac-GTP sont transloquées à la membrane des cellules lors de leur activation pour former le complexe NADPH oxydase.

3.1.1.a. L'anion superoxyde

O_2^- est donc produit de façon spécifique par la NADPH oxydase (phox) au cours de phénomènes inflammatoires ou d'une réaction immunitaire anti-microbienne chez les mammifères (Lambeth, 2004). L'anion superoxyde est ensuite réduit par voie enzymatique par les superoxyde dismutases et les superoxyde réductases en H_2O_2 .

3.1.1.b. Le peroxyde d'hydrogène

H_2O_2 est une petite molécule non chargée qui diffuse aisément à travers les membranes et donc dans les cellules. La principale source de production d' H_2O_2 provient de la dismutation de l' O_2^- , qui est spontanée ou catalysée par les superoxyde dismutases (Sod).



H_2O_2 va être responsable, directement ou indirectement *via* $OH^\cdot$, de l'oxydation de nombreuses biomolécules. Il peut aussi intervenir dans la transduction du message cellulaire ou dans la régulation de l'expression de certains gènes.

3.1.1.c. Le radical hydroxyle

Parmi toutes les ERO, le radical hydroxyle est le plus réactif. Cette grande réactivité l'empêche de diffuser dans la cellule. Il est donc actif uniquement au niveau de son lieu de

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*

formation. Il peut être généré dans la cellule par un clivage réducteur de l' H_2O_2 (1), par coupure homolytique d' H_2O_2 (2), ou par la réaction de Fenton faisant intervenir le fer sous forme Fe^{2+} ou des métaux de transition (3).



3.1.2. Oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)

L'iNOS catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline et radical $\text{NO}^\cdot$ (Figure 9). Elle est composée de deux domaines catalytiques : un domaine N-terminal oxygénase et un domaine C-terminal réductase reliés par un site de fixation de la calmoduline (CaM). Le domaine oxygénase possède le site de fixation de la L-arginine, de l'hème et du cofacteur tétrahydrobioptérine. Le domaine réductase possède des sites de liaison pour le FMN, le FAD et le NADPH.

L'iNOS fonctionnelle est dimérique. La dimérisation est possible lorsque l'hème, la L-arginine et la tétrahydrobioptérine sont fixés. L'activité de l'iNOS est régulée au niveau transcriptionnel, et elle n'est pas dépendante de la concentration en Ca^{2+} .

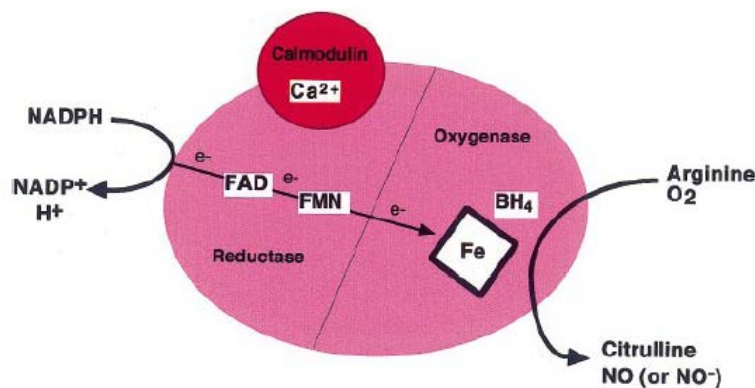


Figure 9 : Représentation schématique de l'oxyde nitrique synthase inductible (d'après Alderton *et al.*, 2001).

Les électrons (e^-) sont fournis par le NADPH au domaine réductase de l'enzyme et sont transmis au FAD puis au FMN et enfin au domaine oxygénase. Le site actif constitué du fer hémique et du cofacteur tétrahydrobioptérine (BH_4) permet de catalyser la réaction de l'oxygène avec la L-arginine, générant la citrulline et du $\text{NO}^\cdot$. Le flux d'électrons à travers le domaine réductase nécessite la présence de Ca^{2+} lié à la CaM.

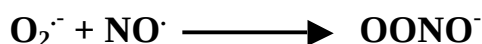
3.1.2.a. L'oxyde nitrique

Le $\text{NO}^\cdot$ est donc produit par l'iNOS. Ce composé est très réactif vis-à-vis des composés radicalaires. La liaison de $\text{NO}^\cdot$ au glutathion (GSH) conduit par exemple à la formation de S-

nitrosothiols. Une production excessive lors d'une infection peut conduire à une vaso-dilatation massive aboutissant à un choc septique.

3.1.2.b. Le peroxynitrite

Le peroxynitrite provient de la réaction entre le $\text{NO}^\cdot$ et l' $\text{O}_2^\cdot$. Il présente un faible temps de demi-vie. Les sites de production du peroxynitrite sont associés aux sources d' $\text{O}_2^\cdot$, puisque l' $\text{O}_2^\cdot$ présente un temps de demi-vie très courte et donc ne peut pas diffuser à travers les membranes, contrairement au $\text{NO}^\cdot$ qui est relativement stable et diffusible.



3.2. Cibles moléculaires des ERO et ERA

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ont de nombreuses cibles dans la cellule bactérienne, telles que les acides nucléiques, les lipides, les thiols, les centres métalliques et les acides aminés. Les modifications qu'elles engendrent sont souvent réversibles.

3.2.1. Les acides nucléiques

L'action d' H_2O_2 au niveau de l'ADN est essentiellement indirecte. Cinq types de dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}^\cdot$ ont été décrits (Favier, 2003). La réactivité de $\text{OH}^\cdot$ sur l'ADN n'est pas spécifique. Il peut en résulter l'oxydation des bases, la rupture de la liaison entre la base et l'ose créant ainsi des sites abasiques, la rupture de la liaison phosphodiester provoquant une coupure de chaîne simple ou double brin, la formation d'espèces radicalaires sur l'ADN induisant la formation d'adduits avec des dérivés d'oxydation lipidique ou des pontages ADN-protéines. Les dommages sur l'ADN bactérien sont dépendants de la présence de fer sous forme de Fe^{2+} . D'autre part, la présence de $\text{NO}^\cdot$ et de S-nitrosothiols peut inhiber de façon réversible la réplication de l'ADN par mobilisation du zinc sous forme Zn^{2+} (Schapiro *et al.*, 2003).

3.2.2. Les lipides

Les lipides sont une cible des ERO *via* une réaction radicalaire : la peroxydation lipidique. Le radical $\text{OH}^\cdot$ arrache un proton entre deux double liaisons d'acides gras polyinsaturés formant ainsi un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy en présence d' O_2 . La réaction est ensuite amplifiée par l'attaque de ce dernier sur un autre acide gras insaturé pour donner un peroxyde et un nouveau radical diène conjugué. Ces peroxydes

Les bactéries pathogènes du genre Neisseria

peuvent évoluer pour donner des composés non toxiques qui seront éliminés. La fluidité de la membrane sera modifiée. La peroxydation des lipides bactériens a été observée après ingestion par des neutrophiles, mais l'effet bactéricide n'a jamais été montré (Fang, 2004).

3.2.3. Les protéines

Tous les acides aminés des protéines sont potentiellement oxydables aussi bien au niveau des chaînes latérales des acides aminés qu'au niveau de la chaîne principale (Berlett et Stadtman, 1997). Les résidus les plus facilement oxydables et potentiellement sensibles à l'effet direct d'H₂O₂ sont les résidus soufrés, Cys et Met, ainsi que les aromatiques, Tyr, Phe et Trp. La carbonylation des protéines sur les résidus Arg, Pro et Lys est facilement observée après une forte exposition à H₂O₂ (Tamarit *et al.*, 1998).

Par exemple, il a été montré que la ribonucléotide réductase est inhibée par les ERA, ce qui limite la disponibilité en précurseurs nécessaires à la synthèse et à la réparation de l'ADN (Lepoivre *et al.*, 1991).

Enfin, il a été montré que le peroxynitrite ou l'oxyde nitrique avec H₂O₂ et la myéloperoxydase peuvent nitrer les résidus Tyr, mais cette modification des protéines n'a pas été clairement démontrée dans la lutte contre les bactéries (Evans *et al.*, 1996).

3.3. Systèmes de défenses de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*

Les bactéries pathogènes doivent donc résister et s'adapter à l'action des ERO et ERA produits par les neutrophiles et les macrophages. Pour cela, les bactéries pathogènes du genre *Neisseria* ont mis en place différentes stratégies pour échapper, supprimer, inactiver, piéger ces espèces réactives et / ou pour pouvoir réparer les dommages occasionnés. Dans ce paragraphe, nous allons voir que les deux espèces *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*, bien que très proches, ne possèdent pas tout à fait les mêmes systèmes de défenses, avec des systèmes de régulation différentes (Figure 10). Ces différences sont notamment dues au fait que ces deux bactéries ne colonisent pas les mêmes niches écologiques et doivent donc faire face à des stress oxydants différents lors de l'infection (Seib *et al.*, 2004).

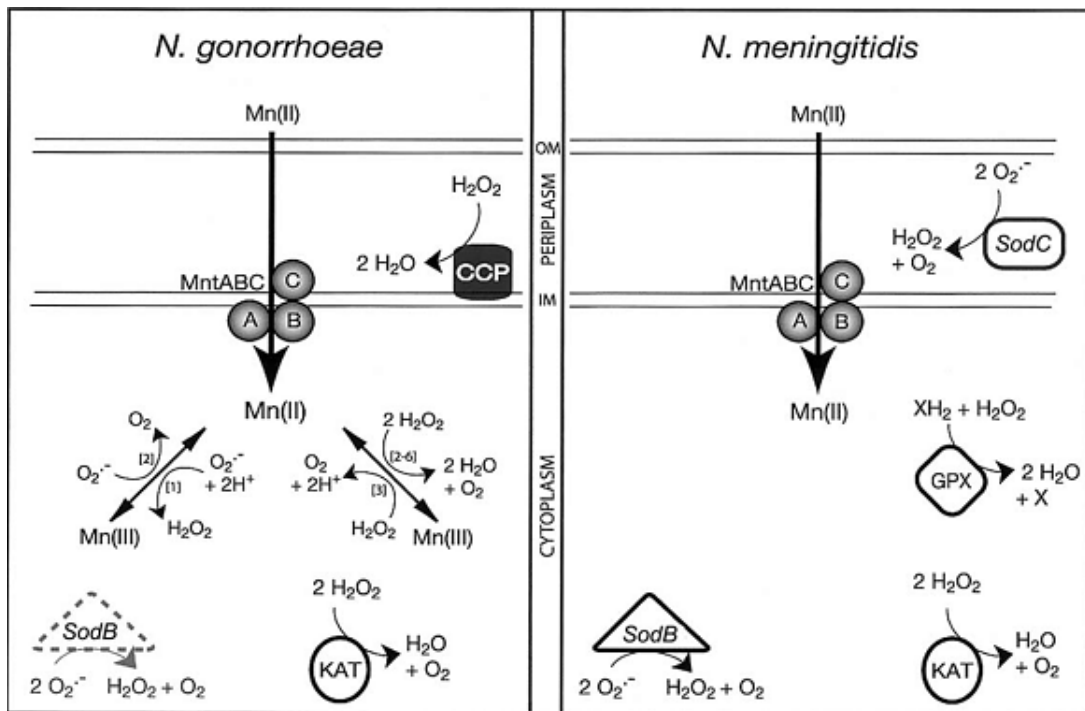


Figure 10 : Modèle et comparaison des principales défenses contre les stress oxydants de *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* (d'après Seib *et al.*, 2004).

Les protéines impliquées dans les défenses contre les stress oxydants, ainsi que leur mécanisme anti-oxydant sont indiqués : MntABC (transporteur de manganèse), SodB (superoxyde dismutase B), SodC (superoxyde dismutase C), KAT (catalase), Gpx (glutathion peroxydase) et CCP (cytochrome c peroxydase). OM : membrane externe ; IM : membrane interne.

3.3.1. Détoxification des ERO

3.3.1.a. Catalases (Kat)

Les catalases sont des métalloenzymes à centre hémique, ubiquitaires. La catalase est codée par le gène *kat* chez les bactéries du genre *Neisseria*. *N. gonorrhoeae* possède un taux constitutif très élevé de catalase, cent fois supérieur à celui de *N. meningitidis* (Hasset *et al.*, 1990). Il semble donc que les défenses contre H_2O_2 via la catalase soient d'une grande importance chez *N. gonorrhoeae* (Seib *et al.*, 2004).

La plupart des catalases existent sous forme de tétramères de 60 ou 75 kDa ; chaque sous-unité contient un site actif (hème) enfoui au sein de la structure tridimensionnelle mais accessible via des canaux hydrophobes. Ces enzymes catalysent la dismutation de deux molécules d' H_2O_2 , en deux étapes (Figure 11). Dans la première étape, l'enzyme réduit une molécule d' H_2O_2 par transfert de deux électrons de l'hème vers H_2O_2 aboutissant à la formation d'une espèce oxydée de l'hème (« π -cation radical ferryl ») et d'une molécule d'eau. Dans la seconde étape, une deuxième molécule d' H_2O_2 est utilisée comme réducteur pour régénérer l'enzyme, produisant ainsi de l'eau et de l' O_2 . L' O_2 est formé par l'oxydation à deux électrons de la deuxième molécule d' H_2O_2 sans rupture de la liaison O-O (Kato *et al.*, 2004).

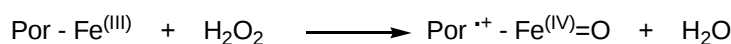


Figure 11 : Mécanisme proposé pour les catalases (d'après Kato *et al.*, 2004).

$\text{Por} - \text{Fe}^{(\text{III})}$ représente l'enzyme sous forme réduite, et $\text{Por}^{\cdot+} - \text{Fe}^{(\text{IV})}=\text{O}$ représente l'enzyme sous forme oxydée « π -cation radical ferryl».

La réduction, dont la constante de vitesse de second ordre est de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, est un processus extrêmement efficace. Les catalases exercent une double fonction, selon la concentration en H_2O_2 . Si la concentration en H_2O_2 est faible (inférieure à $1 \mu\text{M}$), les catalases réalisent une réaction de peroxydation où différents donneurs d'hydrogène, comme l'éthanol ou l'acide ascorbique, peuvent être oxydés. Si la concentration en H_2O_2 devient trop élevée (en situation de stress oxydant), l'enzyme joue alors son rôle de détoxication. H_2O_2 est donc à la fois donneur et accepteur de protons (Scandalios, 2005).

3.3.1.b. Superoxyde dismutase (Sod)

Une source majeure de production d' H_2O_2 passe par la dismutation spontanée de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou catalysée par les superoxyde dismutases, qui sont des métalloenzymes ubiquitaires, selon la réaction :



La famille des Sod peut être divisée en trois classes majoritaires selon la nature du métal présent : la SodA cytoplasmique à Mn^{2+} , la SodB cytoplasmique à Fe^{2+} et la SodC périplasmique à $\text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$; auxquelles s'ajoute une Sod à nickel présente uniquement chez les bactéries du genre *Streptomyces*. Chez *N. meningitidis*, les gènes *sodB* et *sodC* sont retrouvés, alors que chez *N. gonorrhoeae* le gène *sodC* est absent et même si toutes les souches de cette espèce contiennent un gène *sodB*, 80 à 100 % d'entre elles ne possèdent pas d'activité Sod, les autres ne montrant qu'une très faible activité.

Toutes les classes de Sod ont un mécanisme catalytique similaire de dismutation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui se fait en deux étapes :

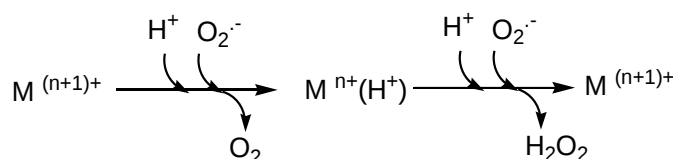


Figure 12 : Réaction de dismutation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par les Sod (d'après McCord et Fridovich, 1969).

$\text{M}^{(\text{n}+1)+}$ et $\text{M}^{\cdot(\text{n}+)}$ correspondent respectivement aux états $\text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$ et $\text{Cu}^+ / \text{Zn}^{2+}$, Fe^{3+} et Fe^{2+} , Mn^{3+} et Mn^{2+} des Sod à Cu / Zn, Fe et Mn.

Le centre métallique de la Sod est oxydé. Sous cette forme, il oxyde une molécule d' $O_2^{\cdot -}$ avec fixation d'un proton, libérant une molécule d' O_2 et l'enzyme réduite protonée. Puis l'enzyme réduit une deuxième molécule d' $O_2^{\cdot -}$ en présence d'un autre proton, formant ainsi une molécule d' H_2O_2 et la Sod oxydée au niveau de son centre métallique (McCord et Fridovich, 1969). La vitesse de cette réaction est de $10^9 M^{-1}.s^{-1}$.

Il a été montré que la SodB de *N. meningitidis* joue un rôle dans la protection de la bactérie contre le stress oxydant (Seib *et al.*, 2004) ; alors que chez *N. gonorrhoeae*, la délétion du gène *sodB* n'a pas d'effet vis-à-vis d'un stress oxydant comparé à la souche sauvage, ce qui était attendu (Tseng *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que la protéine SodC de *N. meningitidis* jouerait un rôle dans la virulence de la bactérie chez la souris (Wilks *et al.*, 1998), ainsi qu'un rôle de protection contre la phagocytose par les monocytes et les macrophages humains (Dunn *et al.*, 2003).

3.3.1.c. Les peroxydases

N. meningitidis possède une glutathion peroxydase (Gpx) cytoplasmique, exprimée constitutivement à partir du gène *gpxA* et impliquée dans la résistance au stress oxydant. Il a été montré qu'un mutant *gpxA* est beaucoup plus sensible au paraquat et un peu plus sensible à H_2O_2 (Moore et Sparling, 1995 et 1996). Cependant, aucun gène *gpx* n'est présent chez *N. gonorrhoeae* et chez les espèces commensales du genre *Neisseria*.

L'activité catalytique des Gpx repose sur l'oxydation d'une sélénocystéine catalytique en acide sélénique qui est ensuite réduite *via* le GSH. Les Gpx réduisent les peroxydes en formant une molécule d'alcool et un acide séléninique sur leur sélénocystéine. L'acide séléninique réagit ensuite avec une molécule de GSH, formant un pont intermoléculaire Protéine-Se-SG. Ce pont est ensuite réduit par une deuxième molécule de GSH qui permet la régénération de la sélénocystéine catalytique de la peroxydase et la libération d'une molécule de GSSG. La réaction se fait avec une vitesse de second ordre de l'ordre de $10^7 M^{-1}.s^{-1}$.

La cytochrome c peroxydase (Ccp) périplasmique est impliquée dans la résistance à H_2O_2 chez *N. gonorrhoeae* (Turner *et al.*, 2003). La Ccp appartient à la classe I des peroxydases. C'est un cytochrome de type c dihémique qui catalyse la réduction d' H_2O_2 *via* le cytochrome c de la chaîne respiratoire :



Les bactéries pathogènes du genre Neisseria

Il a été montré qu'un mutant *ccp* de *N. gonorrhoeae* est plus sensible à H₂O₂ (Seib *et al.*, 2004). La Ccp est présente chez *N. gonorrhoeae* et toutes les bactéries commensales du genre *Neisseria*, mais est absente dans toutes les souches de *N. meningitidis*.

Les peroxyrédoxines (Prx) catalysent la réduction d'H₂O₂ via l'implication de deux résidus cystéine invariants. La protéine hybride PrxGrx de *N. meningitidis* réduit un grand nombre de peroxyde en présence de GSH *in vitro* (Rouhier et Jacquot, 2003).

3.3.1.d. Transporteur de Manganèse

N. gonorrhoeae utilise l'ion manganèse (Mn²⁺) comme un agent chimique pour capter les ERO. Comme l'activité Sod est très faible chez *N. gonorrhoeae*, l'accumulation de manganèse est très forte (Seib *et al.*, 2006).

Il a été montré qu'en présence de manganèse, *N. gonorrhoeae* présente une résistance accrue à H₂O₂ et à O₂⁻ (Seib *et al.*, 2004). Ceci est dû à la présence du transporteur à manganèse MntABC qui est responsable de l'accumulation de manganèse dans le cytoplasme (Tseng *et al.*, 2001). Ce transporteur appartient à la famille des transporteurs de type ABC (pour « ATP-binding cassette ») perméases. Il est composé de trois domaines : une protéine MntC périplasmique qui lie le substrat, deux perméases membranaires MntB et deux protéines membranaires périphériques MntA qui fixent et hydrolysent l'ATP. Il a été montré que les mutants *mntC* sont plus sensibles à la présence d'oxydants (Wu *et al.*, 2009).

Cette résistance vis-à-vis d'H₂O₂ et O₂⁻ ne se retrouve pas chez *N. meningitidis*, bien que cette dernière possède un opéron *mntABC* similaire (Seib *et al.*, 2004). Cependant, le rôle de MntC de *N. meningitidis* dans la défense contre le stress oxydant de manière Mn-indépendante semble indiquer une fonction autre que celle de transporteur de manganèse : MntC pourrait être impliquée dans la régulation des processus associés à la réponse au stress (Tseng *et al.*, 2001).

3.3.1.e. Défenses basées sur les thiols

Le GSH (γ-L-glutamyl-L-cysteinylglycine) est considéré comme la molécule constituant l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant (Pomposiello et Demple, 2002). Le GSH est présent à haute concentration chez *N. gonorrhoeae* (> 15 mM) et qui de part sa structure participe à de nombreux systèmes de détoxification (Archibald et Duong, 1986). Le taux de GSH réduit est maintenu dans la bactérie par la GSH réductase, dont l'expression est régulée par OxyR (voir paragraphe 3.3.3).

Les thiorédoxines (Trx) et glutarédoxines (Grx) sont des protéines possédant deux résidus cystéine conservés. Ces deux classes de protéines sont présentées dans la troisième partie de l'introduction. Il a été montré, par exemple, que le mutant *tlpA* (codant une Trx périplasmique) de *N. gonorrhoeae* est sensible au paraquat et à H₂O₂ (Achard *et al.*, 2009).

Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) catalysent la réduction des résidus Met oxydés, libres ou situés dans une chaîne polypeptidique, en Met. Chez *N. gonorrhoeae*, deux protéines portant des activités Msr sont exprimées à partir du même gène *pilB* : une forme cytoplasmique et une forme périplasmique impliquée dans la résistance au peroxyde d'hydrogène (Skaar *et al.*, 2002). Cette forme périplasmique, appelée PilB est composée de trois domaines : un domaine central et un domaine C-terminal portant respectivement les activités MsrA et MsrB et un domaine N-terminal (Nter) de type Trx. Ces trois domaines, ainsi que PilB, sont décrits plus en détails dans les parties II, III et IV de l'introduction. L'expression du gène *pilB* est régulée positivement en présence d'H₂O₂ par le facteur de transcription sigma Ecf chez *N. gonorrhoeae* (Gunsekere *et al.*, 2006). Ce gène est également retrouvé chez *N. meningitidis*.

3.3.2. Détoxification des ERA

Chez les deux pathogènes du genre *Neisseria*, il existe un système nitrite réductase (AniA) / oxyde nitrique réductase (NorB) permettant de dénitrifier leur environnement.

AniA est une nitrite réductase cuivre-dépendante. Elle catalyse la réduction du nitrite (NO₂⁻) en oxyde nitrique (NO[•]). NorB permet ensuite la réduction du NO[•] en oxyde nitreux (N₂O). NorB de *N. meningitidis* est capable de neutraliser la toxicité du NO[•] exogène (Anjum *et al.*, 2002). Un mutant *norB* de *N. gonorrhoeae* est toujours résistant à NO[•] ce qui montre qu'il existe d'autres voies de détoxification chez la bactérie (Householder *et al.*, 2000), comme le cytochrome *c*'.

Le cytochrome *c*' (CycP) est une lipoprotéine de la membrane externe qui fixe le NO *in vitro* chez les deux espèces pathogènes de *Neisseria* (Turner *et al.*, 2005), mais a peu ou pas d'effet sur le NO[•] cytoplasmique. Il a été montré chez *N. meningitidis* que le système NorB est régulé par le NO[•] via un répresseur (NsrR) alors que CycP ne l'est pas. Ce résultat indique que *N. meningitidis* exprime à la fois de façon constitutive et inductible les systèmes de protection contre le NO[•] (Heurlier *et al.*, 2008).

3.3.3. Régulations de la réponse au stress

Les bactéries du genre *Neisseria* répondent au stress oxydant au niveau transcriptionnel. La protéine OxyR appartient à la famille des régulateurs qui répondent à H₂O₂.

La protéine OxyR appartient à la famille des facteurs de transcription LysR. Le domaine N-terminal d'OxyR possède un motif hélice-coude-hélice de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal d'oligomérisation. En conditions de stress, il se fixe sous forme tétramérique sur les promoteurs de plusieurs gènes cibles (Toledano *et al.*, 1994). L'activation d'OxyR par H₂O₂ passe par l'oxydation sous forme d'acide sulfénique de la Cys199, puis sous forme pont disulfure Cys199-Cys208 entraînant un changement conformationnel de la protéine (Lee *et al.*, 2004). Ce changement de conformation modifie la spécificité de liaison à l'ADN de la protéine qui va alors activer la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (Stone et Yang, 2006).

Des études récentes ont montré que chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, OxyR est un répresseur pour l'expression de la catalase contrairement à ce qui a été montré chez *Escherichia coli* où OxyR est un activateur du gène de la catalase. En effet, OxyR se fixe sous forme réduite au promoteur du gène et ne se lie plus lorsqu'il est oxydé par H₂O₂. De plus, un mutant n'exprimant plus OxyR est plus résistant à H₂O₂ (Tseng *et al.*, 2003 ; Ieva *et al.*, 2008). Ceci permet l'expression de la catalase uniquement lorsque c'est nécessaire. Chez *N. gonorrhoeae*, il a également été montré que le gène codant la Prx est régulé par le régulateur OxyR (Seib *et al.*, 2007).

Partie II. Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr)

L'oxydation des Met dans les protéines par les ERO et les ERA engendre la formation d'un mélange des deux stéréoisomères de configuration *S* et *R* de la fonction sulfoxyde de la Met-O. La Met possède une chaîne latérale plutôt hydrophobe et flexible, alors que sous forme sulfoxyde, la chaîne latérale devient plus polaire et un peu plus encombrante. Ces modifications peuvent, selon les méthionines oxydées et leur contexte tridimensionnel, conduire à la perte de fonction de la protéine. Il est donc essentiel que les cellules possèdent des enzymes de réparation capables de restaurer la fonction de ces protéines. Il existe à ce jour trois classes de Msr : MsrA, MsrB et fRMsr (pour « free-*R*-Msr ») qui catalysent la réduction des résidus Met oxydés en Met en présence de réducteur. Les MsrA et MsrB réduisent spécifiquement et respectivement les isomères *S* et *R* de la Met-O libre ou dans un contexte polypeptidique (Moskovitz *et al.*, 2000 ; Grimaud *et al.*, 2001), alors que la fRMsr ne réduit que l'isomère *R* des Met-O libres avec une forte sélectivité pour l'isomère *L* de la *L*-Met-*R*-O (Lin *et al.*, 2007 ; Gruez *et al.*, 2010).

L'oxydation des Met en Met-O est décrite conduire dans certains cas non pas à une perte de fonction mais plutôt à un rôle de régulation de la fonction de la protéine oxydée ou de la cible avec laquelle la protéine oxydée interagit. C'est le cas de la CaM qui est une protéine capable de lier le calcium et qui est connue pour interagir avec des protéines cibles en vue de les activer, comme l'adénylate cyclase ou les kinases II Ca^{2+} / CaM-dépendantes). La CaM est une protéine régulatrice utilisée par les pompes et canaux à calcium comme senseur de la concentration intracellulaire en calcium. La CaM possède neuf résidus Met tous potentiellement oxydables en Met-O. L'oxydation des Met144 et Met145 entraîne une diminution de 50 à 60 % de l'activation de l'ATPase à calcium de la membrane plasmique (Bartlett *et al.*, 2003).

Dans d'autres cas, l'oxydation des Met en surface d'une protéine peut favoriser sa dégradation par le protéasome en augmentant l'exposition de zones hydrophobes (Davies, 2001).

Enfin, l'oxydation des Met peut au contraire jouer un rôle dans la protection de la fonction de protéines ou d'enzymes en piégeant les ERO. Par exemple, l'oxydation des résidus Met en surface de la glutamine synthase d'*E. coli* permettrait d'éviter l'oxydation d'autres résidus Met plus enfouis et essentiels à la fonction biologique (Weissbach *et al.*, 2005).

1. Rôles des Msr

Les Msr vont jouer un rôle dans la lutte contre le stress oxydant soit *via* leur rôle de réparation en restaurant la fonction des protéines oxydées, soit *via* leur rôle dans la détoxification des ERO en réduisant les Met-O exposées à la surface des protéines (Levine *et al.*, 1996). Il est à noter qu'à ce jour il existe peu d'études qui ont montré un rôle physiologique de la MsrB et de la fRMsr.

1.1. Lutte contre le stress oxydant

Les premières preuves de l'implication des Msr dans la protection des cellules contre le stress oxydant ont été décrites chez *E. coli* où des souches déficientes en MsrA montrent une sensibilité accrue à H₂O₂ (Moskovitz *et al.*, 1995). Des études similaires ont été menées par exemple chez *Staphylococcus aureus* où la délétion du gène *msrA* entraîne une augmentation de la sensibilité de la souche à H₂O₂ (Singh *et al.*, 2001).

D'autres études menées sur des modèles eucaryotes ont également permis de mettre en évidence l'implication des Msr dans la lutte contre le stress oxydant. En effet, des souris ne possédant plus le gène *msrA* sont plus sensibles au stress oxydant (Salmon *et al.*, 2009). D'autre part, la surexpression de la MsrA rend la drosophile plus résistante au paraquat (Ruan *et al.*, 2002). Il a également été montré l'implication de la MsrA (Kantorow *et al.*, 2004 ; Brennan *et al.*, 2009) et de la MsrB (Marchetti *et al.*, 2005) dans la protection de l'épithélium du cristallin humain vis-à-vis du stress oxydant, associé à la formation de la cataracte. De plus, des études récentes ont montré que la MsrB2 (paragraphe 2.2.2) est largement exprimée au niveau de la rétine et protège les cellules épithéliales pigmentées de la rétine contre les entités oxydantes (Pascual *et al.*, 2009). Il a également été montré que la MsrA est essentielle dans ces cellules pour le maintien des fonctions mitochondriales (Marchetti *et al.*, 2006). Enfin, des cellules PC12 humaines surexprimant le gène *msrA* sont moins sensibles au stress oxydant généré au cours d'un phénomène d'hypoxie / réoxygénation (Yermolaieva *et al.*, 2004).

Des études menées chez *S. cerevisiae* montre que la délétion du gène *fRmsr* entraîne une augmentation de la sensibilité de la souche à H₂O₂, alors que la surexpression de la fRMsr confère une plus grande résistance à H₂O₂ (Le *et al.*, 2009).

1.2. Vieillesse cellulaire

Le vieillissement cellulaire est caractérisé par une augmentation de la quantité des protéines oxydées, due à une altération de l'homéostasie redox. La quantité de protéines oxydées résulte de la différence entre le taux d'oxydation des protéines et le taux de

dégradation et de réparation de ces protéines. Le rôle des Msr dans le vieillissement cellulaire est particulièrement bien documenté (pour revue Ugarte *et al.*, 2009). Il a ainsi été montré que chez des drosophiles transgéniques, la surexpression du gène *msrA* retarde l'apparition du vieillissement et rend les drosophiles plus résistantes au flux d'O₂⁻ généré par le paraquat (Ruan *et al.*, 2002). Inversement, des souris ne possédant plus le gène *msrA* sont plus sensibles au stress oxydant ; elles présentent une accumulation de protéines oxydées et ont une durée de vie diminuée de 40 % (Moskovitz *et al.*, 2001). Cependant, une étude beaucoup plus récente montre au contraire que les souris ne possédant plus le gène *msrA* sont bien plus sensibles au stress oxydant tout en ayant une espérance de vie inchangée (Salmon *et al.*, 2009). Il a également été montré chez le rat que dans des organes dans lesquels une forte activité MsrA est présente, comme le foie et les reins, cette activité est significativement diminuée au cours du vieillissement. Cette diminution est directement liée à une diminution de l'expression du gène codant cette Msr (Petropoulos *et al.*, 2001).

D'autres études ont été menées sur des fibroblastes sénescents humains (Picot *et al.*, 2004). Il a ainsi été montré une diminution de l'expression de la MsrA et d'une MsrB (hCBS-1) au cours de la sénescence qui entraîne une diminution de l'activité Msr dans la cellule et une accumulation de protéines oxydées.

Enfin, il a été montré que l'absence de la fRMsr et de la MsrA chez la levure entraîne une diminution respective de durée de vie de l'ordre de 18 % et 30 % par rapport à une souche de *S. cerevisiae* sauvage (Le *et al.*, 2009).

1.3. Régulation / réparation *in vitro* de protéines oxydées sur leur Met

Il est décrit que les Msr sont impliquées dans la régulation et la réparation de protéines. Dans ce cadre, trois exemples sont présentés qui concernent la CaM, la protéine Ffh et la protéine ribosomique L7 / L12.

La CaM intervient dans la régulation des canaux Ca²⁺-dépendant. La réduction des Met oxydées de la CaM par les MsrA et MsrB a été très largement étudiée *in vitro*. La MsrA seule ne peut réduire que les isomères S des Met-O de la CaM. Néanmoins, il est décrit que la CaM ainsi réduite recouvre sa capacité à se lier au domaine inhibiteur de la pompe Ca-ATPase (Sun *et al.*, 1999). De façon similaire, l'utilisation seule de la MsrB n'aboutit pas à la réduction de toutes les Met-O au sein de la CaM. En revanche, l'utilisation combinée des MsrA et MsrB conduit à la réduction de la totalité des Met-O de la CaM (Grimaud *et al.*, 2001).

Des études ont également montré l'importance des MsrA et MsrB dans le processus de réparation de la protéine Ffh impliquée dans la formation d'une particule SRP (pour « Signal Recognition Particle ») fonctionnelle qui est nécessaire à la synthèse des protéines par les

ribosomes. La protéine Ffh est une GTPase composée de trois domaines : un domaine N-terminal, un domaine G portant le site de liaison au GTP et un domaine M de liaison à l'ARN. L'oxydation des Met du domaine M de la protéine Ffh empêche son interaction avec l'ARN 4,5 S. La protéine Ffh oxydée au niveau de ses Met se révèle être un substrat de la MsrA et de la MsrB *in vitro*, et la réduction des Met-O permet à la protéine de retrouver ses capacités à lier l'ARN 4,5 S. D'autres expériences réalisées *in vivo* ont montré que dans des souches d'*E. coli*, la délétion des gènes *msrA* et *msrB* entraîne l'accumulation de Ffh avec ses Met oxydées en Met-O (Ezraty *et al.*, 2004).

La protéine ribosomique L7 / L12 est une protéine dimérique constituée de la protéine L7 et de la protéine L12 ; en fait, la protéine L7 correspond à une forme N-acétylée au niveau N-terminal de L12. Cette protéine est essentielle à la synthèse des protéines chez les bactéries. En effet, la sous-unité 50 S du ribosome sans L7 / L12 est incapable d'interagir de façon efficace avec les facteurs impliqués dans les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison de la synthèse protéique. La forme biologiquement active de la protéine L7 / L12, capable de se fixer au ribosome, est la forme dimérique. Les protéines L7 et L12 possèdent trois Met aux positions 14, 17 et 26. L'oxydation de ces Met en Met-O entraîne une dissociation des protéines L7 et L12. Le complexe actif n'est donc plus formé et il n'y a plus de fixation au niveau du ribosome (Caldwell *et al.*, 1978). Des études ont montré que ces Met-O pouvaient être réduites par la MsrA, ce qui permet à la protéine de recouvrer son activité biologique bien que seul 50 % des Met soient réduites (Brot *et al.*, 1981).

1.4. Pathogénicité

De nombreux travaux montrent que la présence des Msr chez les bactéries pathogènes est corrélée à la virulence de celles-ci (Sasindran *et al.*, 2007). En effet, les bactéries pathogènes déficientes en activités Msr adhèrent moins bien aux cellules eucaryotes, survivent plus difficilement dans l'hôte et sont plus sensibles au stress oxydant *in vitro*.

1.4.1. Adhérence

La reconnaissance et l'adhérence à la cellule hôte, médiées par des macromolécules exposées à la surface du pathogène, sont des étapes critiques de la colonisation pour l'invasion des tissus de l'hôte. Il semble que les Msr soient impliquées dans les mécanismes d'expression, de positionnement, d'assemblage et de maintenance de ces macromolécules à la surface de la bactérie. En effet, il a été montré que la MsrA est impliquée dans la production d'adhésine fonctionnelle chez *Streptococcus pneumoniae*, *N. gonorrhoeae* et *E. coli* (Wizemann *et al.*,

1996). De même, il a été montré que l'absence du gène *msrA* chez *Mycoplasma genitalium* affecte sa capacité à adhérer à des érythrocytes de mouton (Dhandayuthapani *et al.*, 2001). Il a également été montré que chez *S. sanguis*, bactérie présente dans la bouche, l'absence de MsrA empêche la bactérie d'adhérer aux plaquettes ou induit l'agrégation plaquettaire, alors que l'absence de MsrA chez *S. gordonii*, qui est une autre bactérie présente dans la bouche, entraîne une importante altération de la fixation de la bactérie à la fibronectine, qui est sa cible cellulaire (Herzberg *et al.*, 2005). *S. sanguis* et *S. gordonii* ont aussi été retrouvées dans des plaques d'athérosclérose et pourraient être associées au développement de cette pathologie. Par contre, chez d'autres bactéries pathogènes, aucun défaut n'a été mis en évidence sur des mutants *msrA*, indiquant que le rôle de la MsrA dans l'adhérence des bactéries reste limité à certaines espèces.

1.4.2. Formation du biofilm

Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, accompagné d'une sécrétion de matrice adhésive et protectrice. La structure de cette matrice est hétérogène, souvent composée de substances polymères polysaccharidiques (peptidoglycanes, cellulose) et d'une importante proportion d'eau. Il a été montré que l'absence de MsrA affecte la formation de ce biofilm chez *E. coli* et *S. gordonii*, et que le gène *msrA* est induit lors de la formation du biofilm chez *E. coli* (Beloin *et al.*, 2004 ; Kuboniwa *et al.*, 2006).

Chez *S. aureus*, les gènes *msrA* et *msrB* sont les deux premiers cistrons d'un opéron (Singh *et al.*, 2003). Cet opéron est induit par la présence d'antibiotiques permettant l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, ce qui suggère un lien entre les activités MsrA / MsrB et la biosynthèse de la paroi bactérienne.

1.4.3. Motilité

La motilité est déterminante pour les bactéries car elle leur permet de se déplacer jusqu'à l'hôte. La bactérie *Erwinia chrysanthemi* est un pathogène de plantes. La délétion du gène *msrA* aboutit à une propagation très réduite de la bactérie sur milieu solide (Hassouni *et al.*, 1999).

1.4.4. Survie

Les défenses de l'hôte *via* les macrophages ou d'autres phagocytes mononucléaires sont capables de générer des ERO et des ERA comme cela est exposé dans la première partie de l'introduction. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la présence d'une activité MsrA et la résistance de la bactérie dans les macrophages. D'autre part, il a été montré que des souches délétées du gène *msrA* de *Helicobacter pylori* présentent un retard de colonisation dans les intestins de souris et que l'absence d'expression de MsrB chez *Lactobacillus reuteri* se traduit par une diminution de la survie toujours dans l'intestin de souris. De même, les plantes en réponse à l'invasion par *E. chrysanthemi* produisent une quantité accrue de ERO. La délétion du gène *msrA* permettrait donc de diminuer la virulence d'*E. chrysanthemi* en réduisant le temps de survie de la bactérie dans les plantes (Hassouni *et al.*, 1999).

1.4.5. Résistance aux oxydants

Plusieurs études ont montré que l'absence d'activité MsrA chez différentes bactéries entraîne une sensibilité accrue à différents oxydants (Tableau 3), comme cela a pu être observé chez des bactéries ne possédant pas de systèmes antioxydants comme les Sod ou la Kat-G. Pour la plupart des bactéries, cette sensibilité peut être annulée par complémentation avec une MsrA fonctionnelle.

En particulier, il a été montré que la protéine PilB périplasmique de *N. gonorrhoeae* portant les activités MsrA et MsrB est impliquée dans la résistance de la bactérie au stress oxydant (Skaar *et al.*, 2002).

Espèces	Sensibilité aux oxydants			
	Superoxyde	H ₂ O ₂	Hydroperoxydes	Oxyde nitrique
<i>E. coli</i>	ND	+ ^{ab}	ND	+ ^b
<i>E. chrysanthemi</i>	+ ^b	+ ^a	ND	ND
<i>H. pylori</i>	+ ^a	+ ^{ab}	ND	+ ^{ab}
<i>M. smegmatis</i>	-	-	+ ^b	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	+ ^b	+ ^a	ND	ND
<i>S. aureus</i>	+ ^b	+ ^b	ND	ND

Tableau 3 : Sensibilité des mutants Δ msr de bactéries à différents oxydants (d'après Sasindran *et al.*, 2007).

Sensibilité déterminée par : a) test d'inhibition de croissance par disque et b) test de viabilité ; ND : Non déterminé ; + : sensible ; - : non sensible.

2. Propriétés des Msr

2.1. Organisation génomique

Les gènes *msrA* et *msrB* sont présents dans la quasi-totalité des génomes séquencés disponibles à ce jour (Sasindran *et al.*, 2007). En effet, ces deux gènes sont présents à la fois chez les bactéries, les archées et les eucaryotes ce qui suggère un rôle essentiel de ces deux gènes ou de leur protéine correspondante. Quelques exceptions sont à noter : *M. penetrans* ne possède qu'un gène *msrA* ; et les endoparasites *Rickettsia* et *Clamydia* ainsi que les endosymbiotes *Buchnera* et *Tropheryma* ne possèdent aucune copie de ces deux gènes. Chez *Rhizobium meliloti*, on retrouve des gènes *msr* chromosomique et plasmidique. Le gène *fRmsr* quant à lui, n'est présent que chez environ la moitié des bactéries et des eucaryotes unicellulaires (Le *et al.*, 2009).

Les deux gènes *msrA* et *msrB* peuvent être organisés de différentes manières au sein des génomes bactériens (Tableau 4). Chez de nombreuses bactéries incluant *E. coli* et *M. tuberculosis*, les gènes *msrA* et *msrB* constituent deux unités transcriptionnelles distinctes et distantes l'une de l'autre dans le chromosome. Ces deux gènes sont organisés en opéron comme par exemple chez *Bacillus subtilis* et *S. aureus*, ou sous forme de fusion de type *msrAmsrB* ou *msrBmsrA* chez *H. pylori* ou *Treponema palladium Nichols*. Enfin, chez les bactéries du genre *Neisseria*, les gènes *msrA* et *msrB* sont fusionnés à un gène codant une Trx.

Espèces	<i>msrA</i>	<i>msrB</i>	<i>msrAB</i>	<i>msrBA</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1		
<i>Escherichia coli</i>	1	1		
<i>Helicobacter pylori</i>			1	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	1	1	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	1		
<i>Mycoplasma penetrans</i>	1			
<i>Neisseria meningitidis</i>			1	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1		
<i>Treponema palladium Nichols</i>				1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2		
<i>Xanthomonas campestris</i>	1	1		

Tableau 4 : Nombre de copies de gènes *msrA* et *msrB* chez différentes espèces de bactéries (d'après Sasindran *et al.*, 2007).

Les Msr

De plus, le nombre de copies des gènes *msrA* et *msrB* varie en fonction des organismes. Par exemple, *E. coli* ne possède qu'une seule copie de *msrA* et *msrB* alors que *S. aureus* possède trois copies de *msrA* et une copie de *msrB*.

2.2. Localisation des MsrA et MsrB dans les cellules eucaryotes

2.2.1. MsrA

Chez les mammifères, un seul gène *msrA* est retrouvé. Différentes études montrent que la protéine MsrA est retrouvée dans le cytosol, dans les mitochondries et dans le noyau suite à un mécanisme d'épissage alternatif de son gène (Kim et Gladishev, 2006), ou à un mécanisme de réinitiation interne de la traduction (Kim *et al.*, 2010). La MsrA est fortement produite dans les reins, le foie, le cerveau et le cœur (Kuschel *et al.*, 1999).

Chez les plantes, on retrouve plusieurs gènes *msrA* : chez *Arabidopsis thaliana*, il existe ainsi cinq gènes *msrA* codant trois MsrA cytosolique, une chloroplastique et une sécrétée (Sadanandom *et al.*, 2000).

2.2.2. MsrB

Les mammifères possèdent trois gènes *msrB* qui codent les protéines MsrB1, MsrB2 et MsrB3. La MsrB1 est localisée au niveau du cytosol et du noyau, la MsrB2 est localisée au niveau des mitochondries et la MsrB3 est présente sous deux formes protéiques, MsrB3A et MsrB3B qui proviennent de l'épissage alternatif au niveau du premier exon du gène correspondant. La MsrB3A et MsrB3B sont localisées respectivement au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Les protéines MsrB1, MsrB2 et MsrB3 sont respectivement retrouvées dans le foie et le pancréas (Lescure *et al.*, 1999), dans le cœur, les muscles squelettiques, le foie et les reins (Jung *et al.*, 2002), et dans les muscles lisses, le cœur, l'aorte et les muscles squelettiques (Hansel *et al.*, 2003).

Chez *A. thaliana*, neuf gènes codant des MsrB ont été retrouvés dont deux chloroplastiques, une sécrétée et six cytoplasmiques (Vieira Dos Santos *et al.*, 2005). Ce nombre varie en fonction des espèces de plante.

2.3. Mécanisme catalytique des Msr

Les MsrA, MsrB et fRMsr caractérisées jusqu'ici, sont des enzymes à cystéines essentielles et qui présentent toutes le même mécanisme catalytique faisant intervenir la chimie de l'acide sulfénique (Figure 13) (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002 ; Gruez *et al.*, 2010 et pour revue Boschi-Muller *et al.*, 2005, Boschi-Muller *et al.*, 2008).

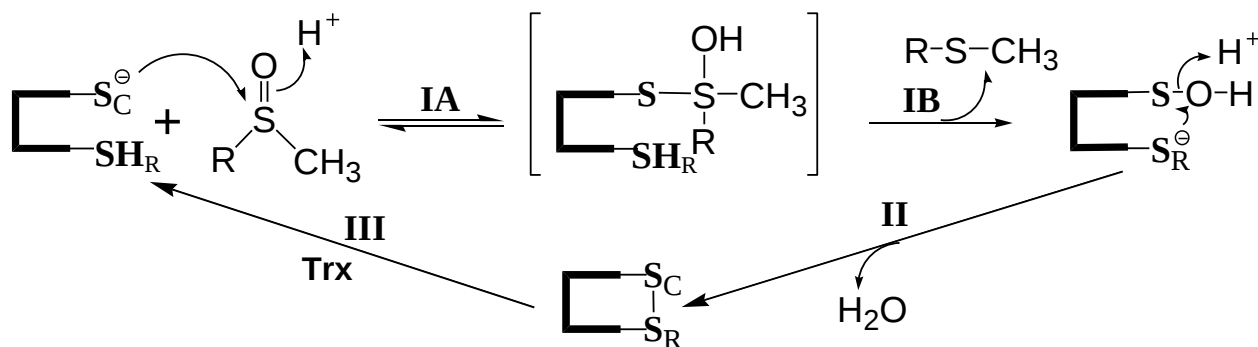


Figure 13 : Mécanisme catalytique des Msr à deux Cys (d'après Olry *et al.*, 2002).

La formation du complexe Msr_{red}/substrat n'est pas explicitée. L'étape MetO réductase peut être divisée en deux sous-étapes. L'attaque nucléophile de la Cys catalytique (S_C) sur la fonction sulfoxyde lors de l'étape IA, conduisant à la formation d'un état de transition de type sulfurane. Ce sulfurane doit se réarranger dans l'étape IB pour conduire à l'intermédiaire acide sulfénique et au relargage de la Met. L'attaque de la Cys de recyclage (S_R) sur l'intermédiaire conduit à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire et à la libération d'une molécule d'eau, lors de l'étape II. Enfin, le pont disulfure est réduit par la Trx ou par une « Trx-like » au cours de l'étape III.

La première étape du mécanisme, appelée étape réductase, consiste en la formation d'un complexe michaelien entre la Msr et la Met-O et en l'attaque nucléophile de la Cys catalytique (S_C) de la Msr sur la fonction sulfoxyde. Ceci entraîne vraisemblablement la formation d'un état de transition de type sulfurane avec une géométrie de type bipyramide trigonale. Cet état de transition doit ensuite se réarranger pour permettre la libération d'une mole de Met par mole d'enzyme ainsi que la formation d'un intermédiaire acide sulfénique.

Au cours de la deuxième étape, la Cys de régénération (S_R) attaque l'intermédiaire acide sulfénique entraînant la libération d'une mole d'eau par mole d'enzyme ainsi que la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Enfin, la troisième étape permet la régénération de la Msr grâce à la réduction du pont disulfure intramoléculaire par une Trx ou une « Trx-like ». Ceci aboutit à la régénération de la Msr sous forme réduite ainsi qu'à la libération d'une Trx ou d'une « Trx-like » sous forme oxydée. Dans le cas de la Trx, cette dernière est ensuite elle-même réduite par la Trx réductase (TrxR) NADPH-dépendante. Il est à noter que le mécanisme catalytique des fRMs est semblable à celui des MsrA et des MsrB avec l'intervention d'une cystéine de recyclage (Kwak *et al.*, 2010 ; Gruez *et al.*, 2010).

Pour les MsrA et MsrB, la vitesse de la première étape est rapide (790 s⁻¹ pour la MsrA de *N. meningitidis* et 85 s⁻¹ pour la MsrB de *N. meningitidis*, avec le substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe). La vitesse de la seconde étape est limitée par celle de la première étape. Enfin, la troisième étape est l'étape cinétiquement limitante du mécanisme (Figure 14). Plus précisément, c'est l'étape de dissociation entre la Msr réduite et la Trx oxydée qui constitue le

processus cinétiquement limitant (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005).

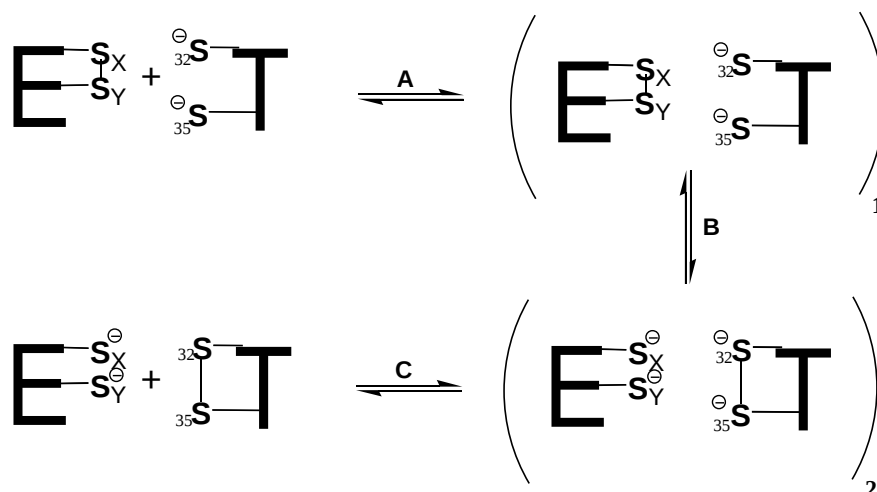


Figure 14 : Mécanisme de réduction par la Trx du pont disulfure intramoléculaire des MsrA et MsrB.

Le mécanisme *a minima* peut être décrit par trois étapes : la formation d'un complexe Msr oxydée / Trx réduite (étape A), le transfert d'un pont disulfure entre la Msr et la Trx (étape B), et la dissociation du complexe Msr réduite / Trx oxydée (étape C). C'est l'étape C qui est l'étape cinétiquement limitante dans le mécanisme des Msr (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005).

Le mécanisme cinétique des MsrA et MsrB a été décrit comme étant un mécanisme de type ping-pong (Figure 15), en présence de réducteur comme la Trx ou le DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2001 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005).

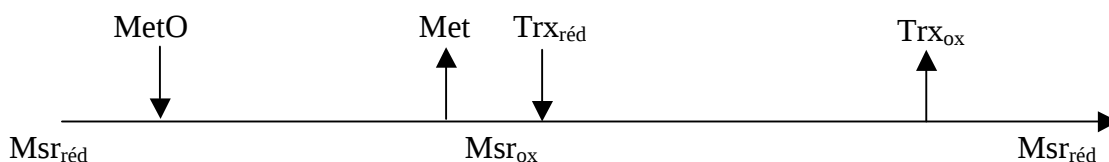
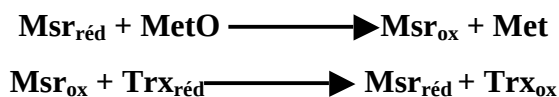


Figure 15 : Schéma du mécanisme cinétique de type ping-pong des MsrA et MsrB.

Ce mécanisme peut être décrit par les deux demi-réactions suivantes :



2.4. Classes de Msr

2.4.1. MsrA

Au sein des MsrA, il existe différentes sous-classes qui se différencient par le nombre et la localisation des résidus Cys impliqués dans le mécanisme de régénération de l'activité réductase. En effet, si la Cys51 catalytique (en se basant sur la numérotation de la MsrA

d'*E. coli*) est conservée dans toutes les MsrA, le nombre et la localisation des Cys impliquées dans la formation du pont disulfure intramoléculaire varient (Figure 16). Sur cette base, quatre sous-classes peuvent être définies.

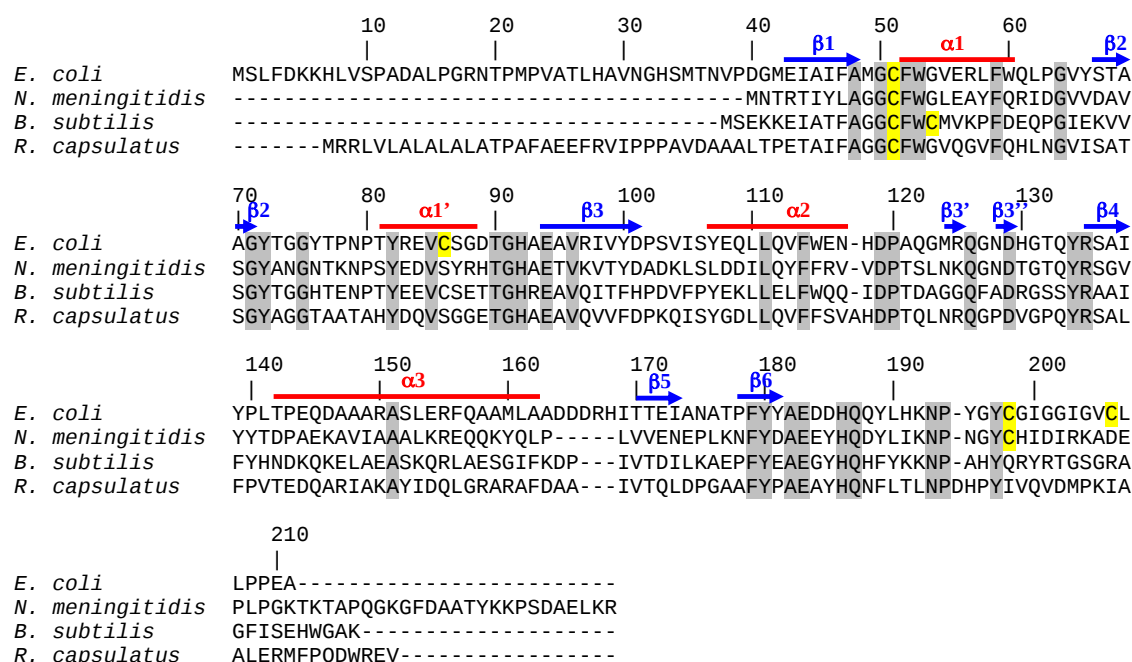


Figure 16 : Alignement des séquences des MsrA d'*E. coli*, *N. meningitidis*, *B. subtilis* et *R. capsulatus*.

La numérotation et les structures secondaires (hélices α et brins β) correspondent à celles de la MsrA d'*E. coli* (Coudeville *et al.*, 2007). Les résidus Cys sont surlignés en jaune et les résidus strictement conservés en gris. La Cys51 est la Cys catalytique et les Cys54, C198 ou Cys206 sont les Cys de recyclage.

La première sous-classe est représentée par la MsrA d'*E. coli* ; dans ce cas, deux Cys sont impliquées dans le processus de recyclage de l'enzyme : la Cys198 et la Cys206. Il y a alors formation de deux ponts disulfures successifs au niveau du mécanisme catalytique : le pont C51-C198 puis le pont Cys198-Cys206, ce dernier étant celui qui est préférentiellement réduit par la Trx (Boschi-Muller *et al.*, 2000). La quatrième cystéine, la Cys86, n'intervient pas dans le mécanisme catalytique.

La deuxième sous-classe est représentée par l'enzyme de *N. meningitidis*, qui fait intervenir une seule Cys dans son mécanisme de régénération : la Cys198 ; dans ce cas, il y a uniquement formation du pont disulfure Cys51-Cys198 (Olry *et al.*, 2002) qui est réduit par la Trx.

La troisième sous-classe est représentée par la MsrA de *B. subtilis* qui ne possède qu'une seule Cys de régénération en position 54. Dans ce cas, c'est le pont disulfure Cys51-Cys54 qui se forme (Boschi-Muller *et al.*, 2005) et qui est réduit par la Trx.

Enfin, la quatrième sous-classe est représentée par la MsrA de *Rhodobacter capsulatus*. Dans ce cas, seule la Cys51 catalytique est présente, ce qui suggère, si l'enzyme est produite et active, un mécanisme de régénération différent impliquant une réduction directe de l'intermédiaire acide sulfénique. A ce jour, aucune donnée biochimique n'est disponible sur la nature du réducteur impliqué pour cette sous-classe (Boschi-Muller *et al.*, 2005).

Il existe également quelques cas de MsrA où la Cys51 catalytique est remplacée par une sélénocystéine (Kim *et al.*, 2006).

2.4.2. MsrB

Plusieurs sous-classes de MsrB peuvent être définies à partir de la différence du positionnement et de la présence de la Cys de régénération (Figure 17). Dans tous les cas, la Cys catalytique des MsrB est en position 117. Quatre sous-classes de MsrB peuvent alors être définies.

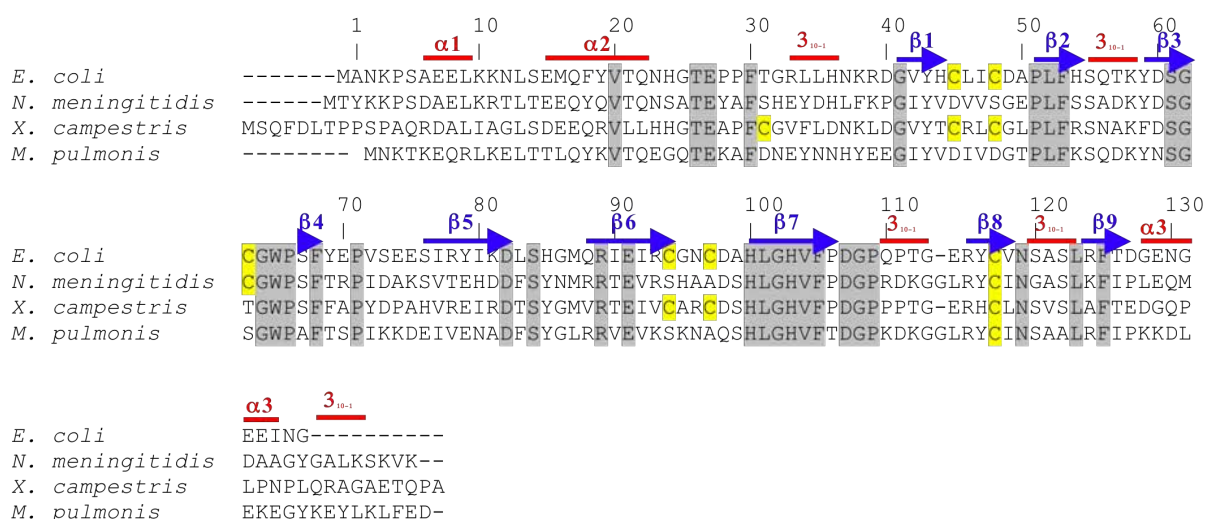


Figure 17 : Alignement des séquences des MsrB d'*E. coli*, *N. meningitidis*, *X. campestris* et *M. pulmonis*.

La numérotation et les structures secondaires (hélices α et brins β) correspondent respectivement à celles des MsrB d'*E. coli* et de *N. meningitidis* (Ranaivoson *et al.*, 2009). Les résidus Cys sont surlignés en jaune et les résidus strictement conservés en gris. La Cys117 est la Cys catalytique et les Cys63 et Cys31 sont les Cys de recyclage. Lorsqu'elles sont présentes, les Cys45, Cys48, Cys94 et Cys97 sont impliquées dans la fixation du Zn^{2+} .

La première sous-classe est représentée par la MsrB de *N. meningitidis* (60 % des MsrB). Dans ce cas, la Cys de régénération se situe dans une boucle en position 63. Le pont disulfure formé est le pont Cys117-Cys63 qui est réductible par la Trx (Olry *et al.*, 2002).

La seconde sous-classe est représentée par la MsrB de *Xanthomonas campestris* qui possède une Cys de régénération en position 31 également au niveau d'une boucle (5 % des MsrB). Il y a alors formation d'un pont disulfure Cys117-Cys31 qui est réductible par la Trx

(Neiers *et al.*, 2004). La MsrB de souris possède quant à elle une Cys de recyclage dans la même boucle que la Cys31 (Aachmann *et al.*, 2010).

La troisième sous-classe est représentée par l'enzyme humaine MsrB2 (aussi appelée hCBS1), qui possède une Cys de régénération en position 60 (1 % des MsrB). Ceci suggère que le mécanisme de régénération de l'enzyme passe par la formation d'un pont disulfure Cys117-Cys60 réductible par la Trx, en accord avec ce qui a été montré avec un mutant C63SMsrB de *N. meningitidis* dans lequel une Cys60 a été introduite (Neiers *et al.*, 2004).

Enfin, la quatrième sous-classe est représentée par la MsrB de *M. pulmonis*, qui ne possède que la Cys117 catalytique (31 % des MsrB). Une étude récente montre que la Trx plastidiale chez *A. thaliana* est capable de réduire directement *in vitro* l'acide sulfénique de la MsrB à une Cys mais avec une faible vitesse (Tarrago *et al.*, 2010).

Il est à noter que la MsrB1 humaine SelX possède une SeCys en remplacement de la Cys117 catalytique et possède une Cys de régénération en position 63.

En plus de ces différentes sous-classes, environ 50 % des MsrB, et notamment les MsrB d'*E. coli*, de *R. capsulatus* et de *X. campestris* possèdent deux motifs supplémentaires CXXC permettant la fixation d'un atome de Zn^{2+} (Kumar *et al.*, 2002 ; Kim et Gladyshev, 2004 ; Olry *et al.*, 2005 ; Oke *et al.*, 2009).

2.4.3. fRMsr

La Cys catalytique des fRMsr correspond à la Cys en position 118 selon la numérotation de la fRMsr d'*E. coli* (Kwak *et al.*, 2010 ; Gruez *et al.*, 2010). Sur les 358 séquences putatives de fRMsr, ce résidu Cys118 est strictement conservé (Figure 18). Les résidus Cys84 and Cys94 sont respectivement présents dans 94,5 % et 98,6 % de ces séquences (Gruez *et al.*, 2010). En terme de signatures, trois sous-classes peuvent être définies selon les cystéines présentes : Cys118 / Cys84 / Cys94, Cys118 / Cys94 et Cys118 / Cys84 sont respectivement présentes dans 93 %, 5,6 % et 1,4 % des séquences. Aujourd'hui, seules les fRMsr possédant les trois cystéines ont été étudiées. La Cys84 est vraisemblablement la Cys de recyclage (Gruez *et al.*, 2010 ; Bong *et al.*, 2010).

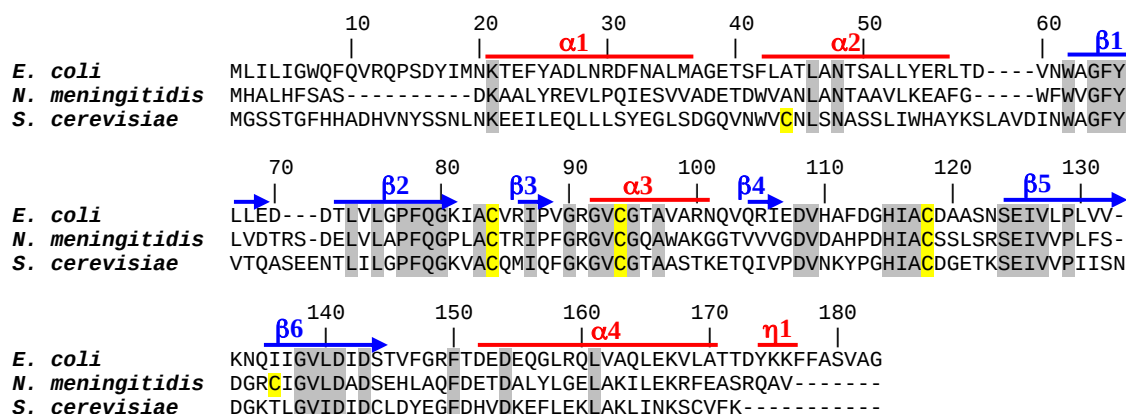


Figure 18 : Alignement des séquences des fRMs d'*E. coli*, *N. meningitidis* et *S. cerevisiae*.

La numérotation et les structures secondaires (hélices α et brins β) correspondent à celles de la fRMs d'*E. coli* (Badger *et al.*, 2005). Les résidus Cys sont surlignés en jaune et les résidus strictement conservés en gris. La Cys118 est la Cys catalytique.

2.5. Structures tridimensionnelles des Msr

Bien que les MsrA, MsrB et fRMs présentent le même mécanisme catalytique, elles ne présentent aucune identité de séquence et leurs structures tridimensionnelles sont différentes.

2.5.1. MsrA

Les structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, de *Bos Taurus*, de *M. tuberculosis*, de *Populus trichocarpa*, de *S. pneumoniae* et de *N. meningitidis* ont été résolues par diffraction aux rayons X (Tête-Favier *et al.*, 2000 ; Lowther *et al.*, 2000 ; Taylor *et al.*, 2003 ; Rouhier *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2009 ; Ranaivoson *et al.*, 2008) et la structure de la MsrA d'*E. coli* a été résolue par RMN (Coudeville *et al.*, 2007). Toutes ces MsrA présentent la même structure globale :

- une partie centrale appelée corenzyme (acides aminés 42 à 195 dans la numérotation de la MsrA d'*E. coli*) qui contient 4 hélices α , 8 brins β ainsi que des coudes β . Le site actif contenant la Cys51 se trouve positionnée à l'extrémité N-terminale de l'hélice α 1. Cette partie corenzyme est suffisante pour permettre une catalyse efficace de la réduction de la Met-O en présence de DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2001) ;

- une extrémité N-terminale ne possédant pas de structure secondaire particulière de type hélice α ou feuillet β et qui est stabilisée par un grand nombre de liaisons H et de contacts de van der Waals avec le corenzyme. Cette extrémité peut être de longueur variable allant d'une quarantaine de résidus chez la MsrA d'*E. coli* à moins de cinq chez la MsrA de *B. subtilis* et *N. meningitidis* ;

- une extrémité C-terminale non structurée dans laquelle se trouvent de nombreux résidus glycine ainsi que les Cys198 et Cys206.

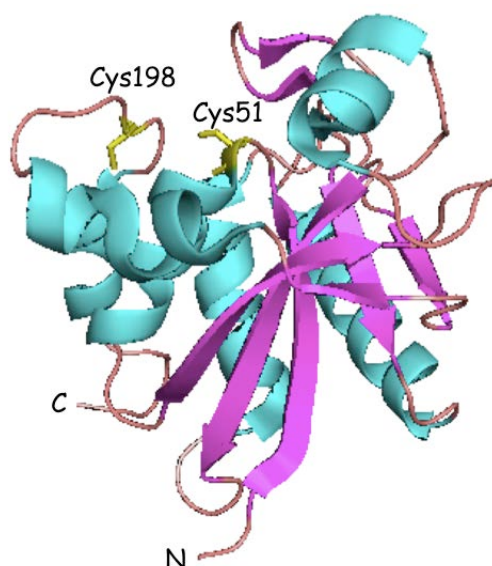


Figure 19 : Structure tridimensionnelle du monomère de la MsrA de *N. meningitidis* (Ranaivoson *et al.*, 2008).

La Cys51 catalytique et la Cys198 de recyclage sont en jaune. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Les structures secondaires en hélices α et les brins β sont représentés respectivement en bleu et en rose. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 3BQE.

Quatre structures tridimensionnelles de la MsrA de *N. meningitidis* ont été résolues par radiocristallographie, correspondant aux quatre intermédiaires générés au cours du cycle catalytique de l'enzyme : une structure sous forme réduite avec pour la première fois un site actif non occupé, une structure du mutant C51S de la MsrA en complexe avec un substrat AcMetONHMe, qui mime une Met-O dans une chaîne polypeptidique (Figure 20), représentatif du complexe michaelien, une structure du mutant C198S de la MsrA avec l'intermédiaire acide sulfénique sur la Cys51 et enfin, une structure de l'enzyme sous forme de pont disulfure Cys51-Cys198 (Ranaivoson *et al.*, 2008). De plus, l'étude de différents mutants de la MsrA de *N. meningitidis* (Gand *et al.*, 2007) a permis de mettre en évidence l'existence dans les MsrA de deux sites distincts de reconnaissance du substrat sulfoxyde. D'une part, une poche hydrophobe, constituée des deux résidus Phe52 et Trp53 qui joue un rôle majeur dans la fixation de la Met-O via des interactions hydrophobes avec le groupement ϵ -méthyl, le noyau indole du Trp53 étant orienté de façon adéquate par des interactions de type liaisons H et hydrophobes, avec les chaînes latérales des résidus conservés His186 et Tyr189, et d'autre part un site de reconnaissance de la chaîne principale du substrat constitué des chaînes latérales des résidus Asp129 et Tyr197. Enfin, un site hydrophile, constitué des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134, est impliqué dans la catalyse ; il est à noter que la fonction sulfoxyde du substrat est

polarisée. Cette forme polarisée est stabilisée par des interactions de type liaisons H avec ces trois résidus.

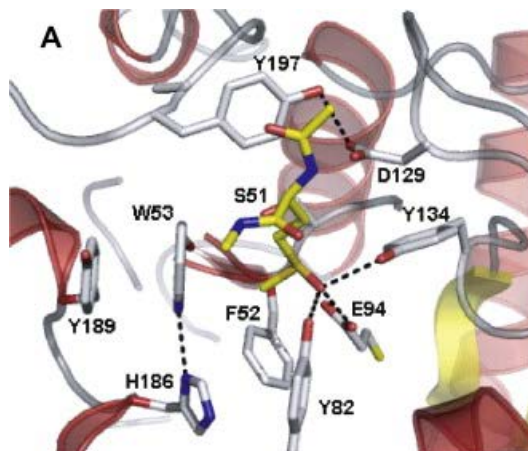


Figure 20 : Site actif de la MsrA de *N. meningitidis* en complexe avec de l'Ac-Met-O-NHMe (Ranaivoson *et al.*, 2008).

Les chaînes latérales des résidus invariants Phe52, Trp53, Tyr82, Glu94, Asp129, Tyr134, His186, Tyr189, Tyr197, ainsi que celle de la Ser51 en remplacement de la Cys catalytique sont représentées. Le substrat AcMetONHMe est représenté en jaune. Les liaisons H sont représentées par des traits pointillés. La distance entre l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat et celui de la Cys catalytique (mimé par l'atome d'oxygène du résidu Ser51 dans le complexe inactif) est de 3,3 Å. La distance entre l'un des oxygènes du Glu94 et l'oxygène de la fonction sulfoxyde est de 2,5 Å. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMol à partir du fichier PDB 3bqf.

L'étude des quatre structures tridimensionnelles a aussi montré que le réarrangement structural de la séquence P₁₉₄NGYCH₁₉₉ est accompagné par la rotation de la chaîne latérale de la Cys198 qui est nécessaire pour la formation du pont disulfure Cys51-Cys198, qui lui-même est ensuite réduit par la Trx.

2.5.2. MsrB

Actuellement, les structures tridimensionnelles de la MsrB de *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, de *X. campestris* et de *N. meningitidis*, obtenues par diffraction aux rayons X, ont été décrites (Lowther *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2009 ; Ranaivoson *et al.*, 2009). Les MsrB sont des protéines monomériques d'environ 146 acides aminés. Le cœur de l'enzyme est composé de deux feuillets β anti-parallèles twistés, respectivement de trois et cinq brins β dont le brin β 8 qui contient la Cys117 catalytique, ainsi que de trois hélices α et de cinq hélices 3_{10} . Dans la structure de la MsrB de *N. meningitidis*, la Cys63 de recyclage et la Cys117 catalytique sont sous forme de pont disulfure (Figure 21).

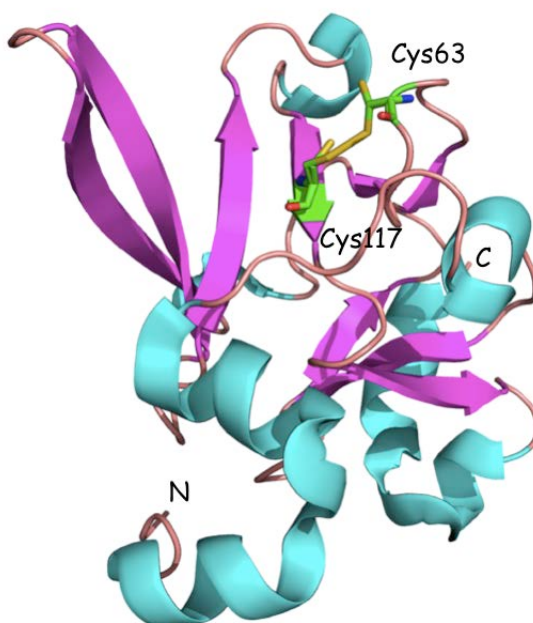


Figure 21 : Structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. meningitidis* (Ranaivoson *et al.*, 2009).

La Cys117 catalytique et la Cys63 de recyclage sont représentées en vert et le pont disulfure est en jaune. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Les structures secondaires en hélices α et les brins β sont représentés respectivement en bleu et en rose. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 3HCG.

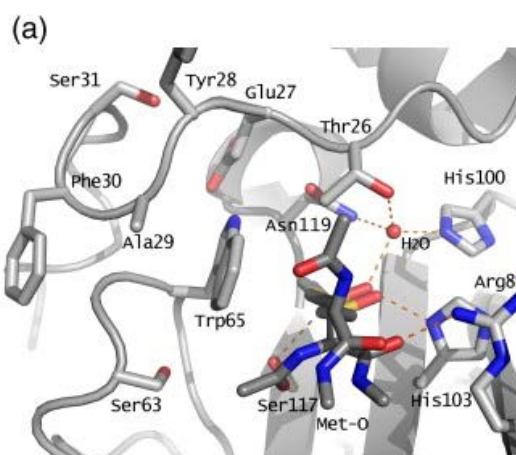


Figure 22 : Site actif du mutant C63S/C117S de la MsrB de *N. meningitidis* en complexe avec une molécule d'AcMetONHMe (Ranaivoson *et al.*, 2009).

La Ser63 et la Ser117 remplacent respectivement la Cys de recyclage et de la Cys catalytique. Le substrat AcMetONHMe est représenté en mode boules et bâtons. Les liaisons H sont représentées par des traits pointillés.

Comme pour les MsrA, le site actif des MsrB est localisé à la surface de l'enzyme. L'examen du site actif des structures tridimensionnelles des MsrB conduit à la définition de deux sous-sites autour de la Cys117 (Figure 22) : 1) une poche hydrophile constituée du résidu His103 et d'une molécule d'eau stabilisée par les résidus His100, Thr26 et Asn119. L'His103 et la molécule d'eau forment deux liaisons H avec l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde

Les Msr

du substrat ; et 2) une poche hydrophobe constituée essentiellement de la chaîne latérale du résidu Trp65, qui stabilise *via* son noyau indole le groupement méthyle ϵ du substrat.

2.5.3. fRMs

Actuellement, quatre structures tridimensionnelles de fRMs ont été déterminées par diffraction aux rayons X, celles d'*E. coli* en complexe avec une molécule d'acide 2-(*N*-Morpholino)-éthanesulfonique (MES) (Lin *et al.*, 2007), de *S. cerevisiae* (Ho *et al.*, 2000), de *N. meningitidis* en complexe avec une molécule de *L*-Met-R-O (Gruez *et al.*, 2010), et de *S. aureus* sous forme réduite, oxydée et en complexe avec une molécule d'isopropanol (Bong *et al.*, 2010). Ces structures sont homologues à celles décrites pour des protéines appartenant à la famille des domaines GAF. Ces domaines GAF sont des domaines senseurs, d'environ 160 acides aminés, généralement retrouvés en tandem avec différents domaines effecteurs et impliqués dans les voies de signalisation des nucléotides cycliques, dans la transcription ou encore dans la phosphotransduction. Les fRMs sont des protéines dimériques. La structure d'un monomère de fRMs est composée d'un feuillet β antiparallèle constitué de six brins ($\beta 3$ - $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 6$ - $\beta 5$ - $\beta 4$) flanqué sur une face d'un groupe de trois hélices α et sur l'autre face d'un motif « boucle- $\beta 3$ - $\alpha 3$ -boucle » encerclant le site actif (Figure 23). De plus, il a été observé que le site actif de la fRMs est protégé par une boucle flexible composée des résidus Gly107 à Ser124, qui contient la Cys118 catalytique.

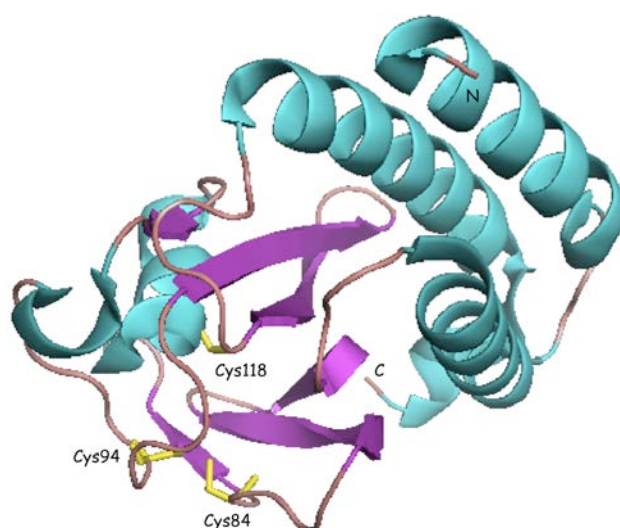


Figure 23 : Structure tridimensionnelle d'un monomère de fRMs d'*E. coli* (Badger *et al.*, 2006).

Les structures secondaires en hélice α et en brins β sont représentées respectivement en bleu et en violet. Les trois cystéines sont représentées en jaune : la Cys118 catalytique, la Cys84 de recyclage et la Cys94. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 1VHM.

Le site actif de la fRMsr de *N. meningitidis* est occupé par une molécule de substrat *L*-Met-*R*-O et de molécules d'eau (Figure 24). La Cys118 catalytique et la Cys84 sont sous forme pont disulfure. La fonction carboxylate de la Met-O est stabilisée par les NH peptidiques des résidus Val93, Cys94 et Ile116, qui forment un site de reconnaissance oxyanion. Le groupement NH_3^+ est stabilisée par un réseau de liaisons H impliquant d'une part l'oxygène du carbonyle de la chaîne principale du résidu Ile116, et d'autre part la chaîne latérale du résidu Glu125, lui-même stabilisé par les résidus invariants Asp141 et Asp143. Le résidu invariant Trp62 stabilise et positionne le groupement ϵ -méthyle de la fonction sulfoxyde *via* son noyau indole. Quant au résidu invariant Asp143, il est sans doute impliqué dans l'activation du sulfoxyde en vue de former l'état de transition de type sulfurane.

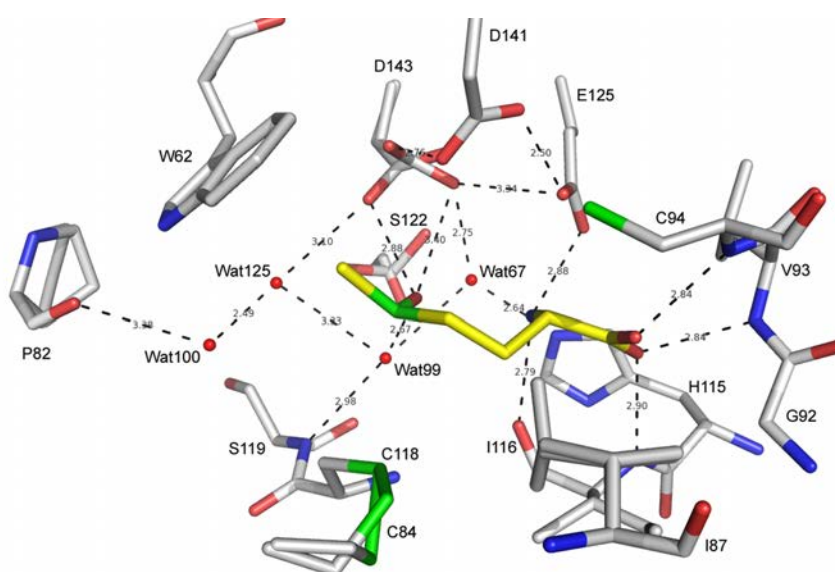


Figure 24 : Site actif de la fRMsr de *N. meningitidis* en complexe avec la *L*-Met-*R*-O (Gruez *et al.*, 2010).

La *L*-Met-*R*-O est représentée en jaune avec les oxygènes en rouge et le soufre en vert. Les pointillés indiquent les interactions polaires et les molécules d'eau sont en rouge. Le pont disulfure Cys118-Cys84 est représenté en vert.

Partie III. Les « Trx-like » périplasmiques

Le domaine Nter de la protéine PilB des bactéries pathogènes du genre *Neisseria* appartient à la famille des « Trx-like » périplasmiques. Après une présentation générale de la superfamille des « Trx-like », nous nous intéresserons aux « Trx-like » cytoplasmiques et périplasmiques des bactéries à Gram-négatif.

1. La famille des « Trx-like »

1.1. Structures tridimensionnelles des « Trx-like »

Le repliement Trx correspond à quatre brins β , formant un cœur hydrophobe, entourés de trois hélices α (Figure 25). Les « Trx-like » possèdent une séquence signature commune, CXXC, au sein de leur site actif, la cystéine N-terminale de cette signature étant la cystéine catalytique. Cette cystéine est toujours localisée au début d'une hélice α . La nature des acides aminés présents entre les deux cystéines varie en fonction des « Trx-like », ce qui a comme conséquence de modifier leur potentiel redox. Une autre particularité des « Trx-like » est la présence d'une boucle conservée en amont du brin β_3 , contenant un résidu *cis*-Pro. Enfin, autour du repliement Trx, différentes insertions et / ou extensions de structures secondaires, plus ou moins longues, sont retrouvées principalement chez les « Trx-like » au niveau des extrémités N- et C-terminales, ainsi qu'entre le brin β_2 et l'hélice α_2 (Figure 25).

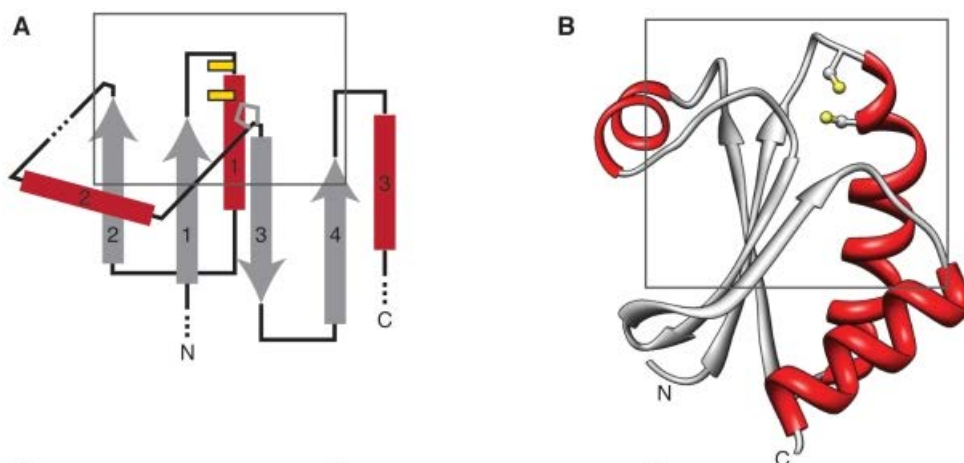


Figure 25 : Représentation du repliement de type Trx ou « Trx fold » (Atkinson et Babbitt, 2009).

A. Représentation schématisée du « Trx fold ». Les brins β , les hélices α et les deux résidus Cys du site actif sont représentés respectivement par des flèches grises, par des rectangles rouges et par des barres jaunes et la *cis*-Pro est schématisée en gris. Les zones où sont localisées la plupart des insertions et extensions sur le « Trx fold » sont indiquées en pointillés. **B. Structure tridimensionnelle de la Trx2 humaine.** Les Cys32 et Cys35 sont représentées en jaune (PDB : 1UVZ).

1.2. Propriétés redox des protéines « Trx-like »

Il existe une très grande variation du potentiel redox chez les protéines « Trx-like » allant de -270 mV pour la Trx1 d'*E. coli* à -124 mV pour la DsbA (Aslund *et al.*, 1997). Ces « Trx-like » vont donc avoir des rôles différents : soit un rôle de réducteur permettant la réduction de ponts disulfures (Trx et Grx), soit un rôle d'oxydant permettant la formation de ponts disulfures (DsbA et Protéine Disulfure Isomérase ou PDI), soit un rôle à la fois de réducteur et d'oxydant dans le cas de l'isomérisation des ponts disulfures non natifs (PDI et DsbC). Dans tous les cas, le mécanisme catalytique des protéines contenant un centre redox de type Trx est basé sur l'échange de ponts disulfures. Les cystéines du site catalytique vont jouer le rôle soit d'accepteur d'électrons lorsqu'elles sont sous forme oxydée, soit de donneur d'électrons lorsqu'elles sont sous forme réduite. Des études par mutagenèse dirigée ont montré qu'en faisant varier la nature des résidus présents entre les deux Cys du site actif, il est possible de rendre les mutants de ces protéines plus oxydants ou plus réducteurs. Par exemple, un mutant Trx_{PDI} dans lequel le résidu proline du site actif de la Trx (WCGPC) a été remplacé par une histidine, présente dans le site actif de la PDI (WCGHP), présente un potentiel redox augmenté de 35 mV (Krause *et al.*, 1991).

1.3. Mécanisme catalytique des protéines « Trx-like »

Il existe deux mécanismes de réduction par les « Trx-like » :

- le mécanisme dithiol classique correspond à un échange de pont disulfure entre le substrat oxydé sous forme pont disulfure et la protéine « Trx-like » réduite à site actif CXXC (Figure 26, A). Cette dernière devra être à son tour réduite par un autre partenaire pour être de nouveau fonctionnelle ;
- le mécanisme monothiol résulte en général de la réduction d'un pont disulfure mixte entre le GSH et la protéine par une « Trx-like ». Par exemple, le mécanisme décrit dans la figure 26 B, correspond à la réduction par la Grx à une seule Cys d'une protéine cible glutathionylée.

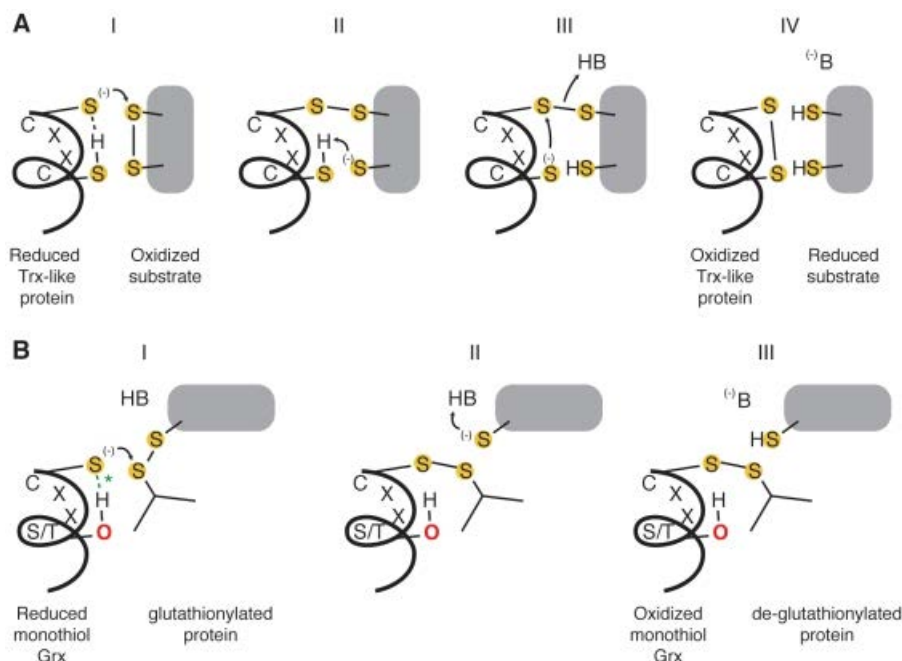


Figure 26 : Réactions dithiol (A) et monothiol (B) des protéines « Trx-like » (Atkinson et Babbitt, 2009).

BH/B⁻ : base.

2. Les « Trx-like » cytoplasmiques des bactéries à Gram-négatif

Les Trx et les Grx sont des protéines essentielles dans l'équilibre redox des cellules. Ces deux protéines, dites de ménage, s'accommodent d'une grande diversité de substrats. Il existe une Trx cytoplasmique et au moins deux Grx cytoplasmiques annotées dans le génome de *N. meningitidis*.

2.1. Les Trx

Les Trx catalysent la réduction de ponts disulfures au sein de protéines oxydées. Les Trx sont des enzymes possédant deux Cys essentielles, la Cys32 et la Cys35, au sein d'une signature WCGPC. La chaîne latérale de la Cys32 est accessible au solvant et est décrite avoir un pKa de 7,5 (Chivers *et al.*, 1997). Ceci lui permet de se trouver à pH 7,0 en partie sous forme thiolate et de pouvoir ainsi jouer efficacement son rôle de nucléophile. Au contraire, la Cys35 présente une valeur de pKa de l'ordre de 9,0, ce qui la rend très peu réactive. Le caractère nucléophile de la Cys35 pourrait être augmenté par une catalyse assistée. Le mécanisme proposé pour la réduction de protéines oxydées sous forme pont disulfure par la Trx peut se décomposer en trois étapes. La première étape consiste en l'attaque nucléophile de la Cys32 sous forme thiolate au niveau d'une des deux Cys de la protéine cible impliquée dans le pont disulfure intramoléculaire. Il y a alors formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la Trx et sa cible. Au sein de cet intermédiaire intermoléculaire, il a été décrit que le pKa

Les « Trx-like »

de l'Asp26 est de 7,5, ce qui lui permet d'être en partie sous forme déprotonée à pH 7,0. Ainsi, dans la seconde étape, l'Asp26 pourrait accepter le proton de la Cys35. La Cys35 ainsi déprotonée va, dans une ultime étape attaquer la Cys32, ce qui conduit à la libération de la protéine cible sous forme réduite et de la Trx sous forme oxydée Cys32-Cys35 (Figure 27). La Trx devra être réduite à son tour pour être de nouveau fonctionnelle.

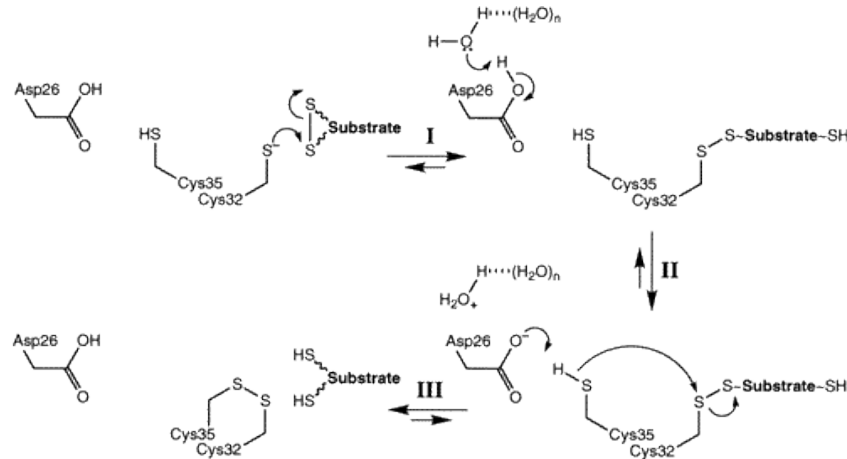


Figure 27 : Mécanisme de réduction d'une cible protéique oxydée sous forme pont disulfure par la Trx (d'après Chivers et Raines, 1997).

Les Trx sont des protéines ubiquitaires capables de réduire de nombreuses cibles protéiques possédant des fonctions très diverses. L'examen des séquences de ces différentes cibles n'indique pas l'existence d'une séquence signature permettant une reconnaissance spécifique par la Trx. La Trx de *N. meningitidis* possède 62 % d'identité de séquence avec la Trx1 d'*E. coli*.

2.2. Les Grx

Le système Grx, tout comme le système Trx, joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre redox de la cellule en permettant la réduction des protéines oxydées sous forme pont disulfure (pour revue, Ritz et Beckwith, 2001).

En se basant sur leur structure tridimensionnelle et leur mécanisme catalytique, trois classes de Grx peuvent être définies. La première classe est représentée par les Grx 1 et 3 d'*E. coli*, ayant un poids moléculaire de 10 kDa avec un motif CXXC (en général CPYC) au sein de leur site actif. Ces Grx adoptent un repliement de type Trx contenant quatre brins β antiparallèles entourés de trois hélices α . Les Grx de cette classe possèdent 33 % d'identité entre elles et réduisent la ribonucléotide réductase, tout comme la Trx. La seconde classe de Grx, représentée par la Grx 2 d'*E. coli*, est reliée d'un point de vue structural aux glutathion S-transférases (GST) possédant une activité glutarédoxine oxydoréductase. La Grx 2 d'*E. coli*

possède un motif CPYC au sein de son site actif et est composée de deux domaines : un domaine N-terminal avec un repliement de type Trx et un domaine C-terminal composé exclusivement d'hélices α . La troisième classe correspond aux Grx possédant un site actif monothiol CGFS, comme la Grx 4 d'*E. coli*, et un repliement de type Trx. Chez *N. meningitidis*, seules les gènes codant les Grx2 et Grx3 sont retrouvés, avec respectivement 46 et 47 % d'identité avec celles d'*E. coli*.

3. Les « Trx-like » périplasmiques des bactéries à Gram-négatif

Les Dsb (pour « Disulfide bond protein ») appartiennent à la famille des oxydoréductases périplasmiques. Elles catalysent la formation des ponts disulfures au niveau du périplasma des bactéries par deux mécanismes distincts : l'oxydation des Cys des protéines nouvellement sécrétées et l'isomérisation des ponts disulfures non natifs de ces mêmes protéines (pour revue, Messens et Collet, 2006).

3.1. Formation et isomérisation des ponts disulfures par les protéines DsbA, DsbC/DsbG et DsbD

Dans le périplasma des bactéries, le repliement des protéines passe par la formation de ponts disulfures introduits *via* les protéines DsbA et DsbB, et leur isomérisation passe par un système de réduction (DsbC-DsbG/DsbD) (Figure 28).

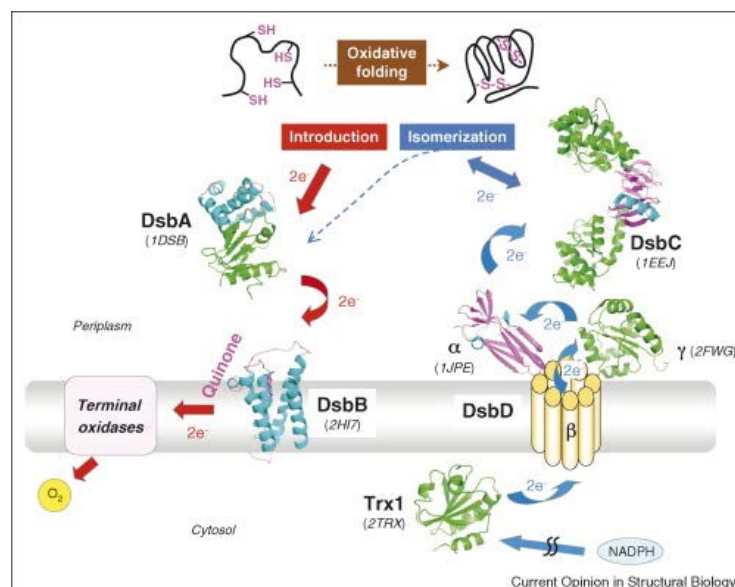


Figure 28 : Présentation du système Dsb d'*E. coli* impliqué dans le repliement des protéines par la formation de ponts disulfures (Ito et Inaba, 2008).

Les structures des protéines ou domaines dont les structures sont connues sont représentées en mode ruban et les codes PDB sont notés entre parenthèses. Les domaines « Trx-like » en vert et les domaines non « Trx-like » interagissent alternativement entre eux. La flèche en pointillés bleus montre que les électrons peuvent passer de la voie d'isomérisation à la DsbA.

3.1.1. La DsbA

La protéine DsbA est une protéine monomérique dont la forme oxydée sous forme de pont disulfure catalyse la formation de ponts disulfures au niveau des protéines nouvellement sécrétées dans le périplasma. La DsbA se retrouve alors sous forme réduite et sera réoxydée par la protéine transmembranaire DsbB, qui va transférer ses électrons aux quinones sous forme oxydées. La DsbB constitue la seule protéine appartenant au système Dsb ne possédant pas un repliement de type Trx. La cytochrome oxydase terminale réoxyde à son tour les quinones sous forme réduites et transfère ses électrons à l'oxygène moléculaire. Dans les protéines contenant plus d'une paire de cystéines, la DsbA peut introduire des ponts disulfures non natifs bloquant les protéines dans des conformations non natives.

Chez *N. meningitidis*, trois gènes codant des DsbA ont été annotés, alors que dans la plupart des autres organismes une seule DsbA périplasmique suffit à la formation des ponts disulfures des différentes protéines cibles. En effet, chez les autres membres de genre *Neisseria* (*gonorrhoeae*, *lactamica*, *flavescens*...) un ou deux gènes codant une DsbA sont retrouvés (Sinha *et al.*, 2004) et la raison de la présence de trois DsbA chez *N. meningitidis* n'est pas clairement établie. Il a été montré que les DsbA1 et DsbA2 sont des lipoprotéines ancrées à la membrane interne présentant 73 % d'identité de séquence entre elles. La troisième DsbA (DsbA3) est une enzyme périplasmique soluble avec respectivement 50 % et 45 % d'identité de séquence avec les DsbA1 et DsbA2 (Tinsley *et al.*, 2004). Les études menées sur des souches de *N. meningitidis* délétées de l'un ou l'autre des trois gènes *dsbA* révèlent que l'absence d'une des trois DsbA n'est pas létale, alors que l'absence des trois DsbA se traduit par une incapacité de la souche à pousser à 37 °C. Ceci suggère que ces trois protéines DsbA ont un rôle redondant chez *N. meningitidis*. Enfin, l'absence des deux DsbA ancrées à la membrane entraîne une plus grande sensibilité aux agents réducteurs et une perte de fonctionnalité des pili.

L'étude des propriétés redox des trois DsbA de *N. meningitidis* a montré que ce sont des oxydoréductases ayant des potentiels redox très élevés (DsbA1 : -89.5 mV, DsbA2 : -88.7 mV et DsbA3 : -87 mV). Ceci s'explique par la présence d'un résidu Thr à proximité du site actif (Figure 29) qui n'est pas présent dans la DsbA d'*E. coli* (-125mV) (Lafaye *et al.*, 2009 ; Vivian *et al.*, 2009). De plus, l'étude des sites actifs montre que la Cys57 catalytique de la DsbA1 de *N. meningitidis* est stabilisée par deux liaisons H avec les groupements NH et carbonyle de la chaîne principale des résidus Gly54 et Ala61, qui correspondent aux résidus Ser27 et Tyr34 de la DsbA d'*E. coli*. La Cys30 d'*E. coli*, correspondant à la Cys57 catalytique de la DsbA1 de *N. meningitidis*, est en plus stabilisée par la présence du résidu Gln97.

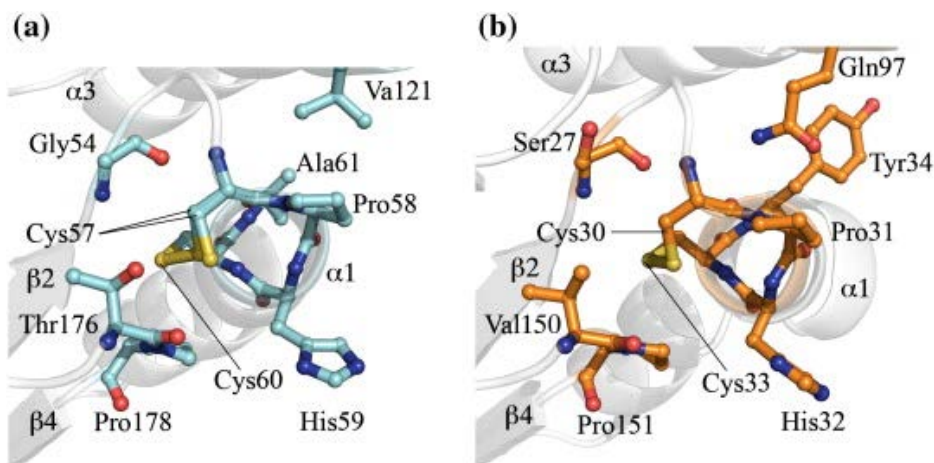


Figure 29 : Représentation du site actif de la DsbA1 de *N. meningitidis* (a) et de la DsbA d'*E. coli* (b) (Vivian *et al.*, 2009).

Les motifs CPHC et les résidus qui interagissent avec les Cys du site actif sont représentés. Les Cys catalytiques de *N. meningitidis* et d'*E. coli* sont respectivement les Cys57 et Cys30.

3.1.2. Les DsbC / DsbG

Les DsbC et DsbG catalysent l'isomérisation des ponts disulfures non présents dans la structure native des protéines ; ces deux enzymes périplasmiques étant conservées sous forme réduite grâce à la protéine DsbD (paragraphe 3.1.3). Ce sont des protéines homodimériques, et chaque domaine contient un domaine N-terminal de dimérisation et un domaine C-terminal catalytique de type Trx qui sont reliés par une hélice α . Les structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X montrent que les deux monomères s'assemblent pour former un « V ». Les sites actifs de la DsbC d'*E. coli* sont constitués des résidus C₉₈GYC₁₀₁ et se trouvent sur chacun des bras du « V » l'un en face de l'autre (Figure 30). La seule différence notable entre les structures de la DsbC et de la DsbG réside au niveau de l'interface de dimérisation. Il a été montré que la dimérisation de la DsbC est essentielle pour l'activité isomérase (Bader *et al.*, 2001), ainsi que pour la réduction par la DsbD (Goldstone *et al.*, 2001). La protéine DsbG est homologue à la DsbC, avec 28 % d'identité de séquence, et présente aussi une fonction d'activité isomérase, mais avec une préférence vis-à-vis de la réduction de ponts disulfures de protéines déjà partiellement ou totalement repliées (Bessette *et al.*, 1999).

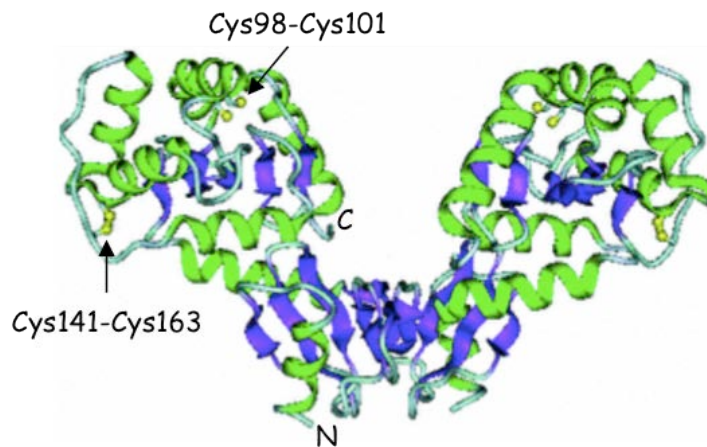


Figure 30 : Représentation de la structure d'un dimère de la DsbC d'*E. coli* (Banaszak *et al.*, 2004).

La Cys98 et la Cys101 du site actif sont représentées en mode boule et bâton sur la face interne du « V » de la molécule, et les deux autres Cys141 et Cys163 forment un pont disulfure sur les faces externes du « V » de la molécule.

Le mécanisme d'isomérisation passe par l'attaque de la Cys98 catalytique sur une des deux Cys du pont disulfure de la protéine cible conduisant à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire qui est alors réduit soit par une autre cystéine de la protéine substrat, soit par la Cys101 de recyclage de la DsbC. En plus de cette activité isomérase, la protéine DsbC joue aussi un rôle de chaperonne en empêchant l'agrégation de la protéine cible pendant son repliement (Arredondo *et al.*, 2009). Chez *E. coli*, l'isomérisation des ponts disulfures est l'étape limitante du repliement de nombreuses protéines contenant plusieurs résidus cystéine.

Très récemment, une étude sur la DsbG d'*E. coli* a montré qu'elle interagirait sélectivement notamment avec la *L,D*-transpeptidase YbiS (Depuydt *et al.*, 2009) en vue de réduire la protéine YbiS oxydée sous forme acide sulfénique.

Dans le génome de *N. meningitidis*, un gène codant une DsbC est retrouvé, mais aucune étude n'a été menée sur cette protéine (27 % d'identité de séquence avec celle d'*E. coli*). Par contre, aucun homologue du gène *dsbG* n'a été trouvé.

3.1.3. La protéine DsbD est le réducteur de la DsbC et de la DsbG

La protéine DsbD est une protéine transmembranaire composée de trois domaines : le domaine transmembranaire (tDsbD) composé de huit segments transmembranaires; le domaine N-terminal (nDsbD) présentant un repliement de type immunoglobuline et le domaine C-terminal (cDsbD) possédant un repliement de type Trx. C'est la DsbD qui réduit les ponts disulfures de nombreuses protéines « Trx-like » périplasmiques telles que les protéines DsbC, DsbG et CcmG (ou DsbE) (paragraphe 3.2). Les électrons provenant du NADH cytoplasmique

sont transférés à la TrxR puis à la Trx et enfin au périplasma *via* la DsbD (Figure 31) (Kadokura *et al.*, 2003). Chacun des trois domaines possède une paire de cystéines qui est essentielle au transport des électrons (Stewart *et al.*, 1999). Les électrons sont transportés à travers la membrane cytoplasmique grâce à des échanges de ponts disulfures intramoléculaires entre les trois domaines de la DsbD. Dans un premier temps, les électrons sont transférés de la Trx au tDsbD ; ils sont ensuite transférés au domaine cDsbD et enfin au domaine nDsbD (Katzen et Beckwith, 2000). Les deux électrons du domaine nDsbD vont alors être transférés vers différentes cibles périplasmiques.

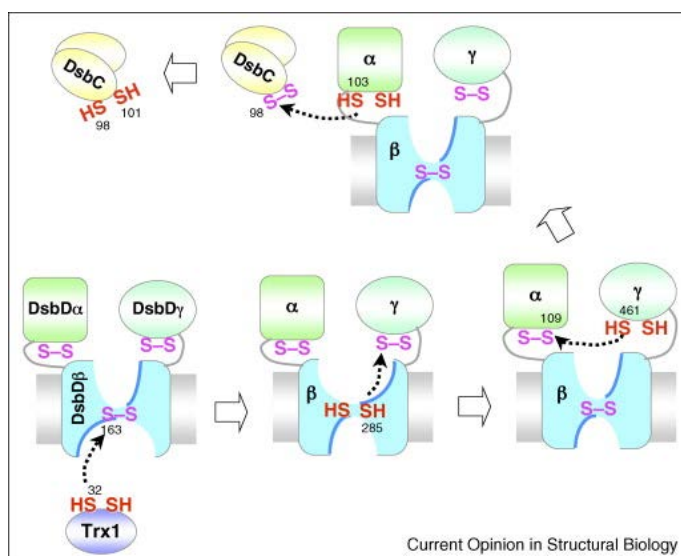


Figure 31 : Représentation du transfert des deux électrons de la Trx1 cytoplasmique à la DsbC périplasmique *via* la protéine DsbD (Ito et Inaba, 2008).

Le transfert des électrons est représenté par des flèches noires en pointillées.

Différentes études récentes ont montré que le flux des électrons entre les trois domaines de la DsbD est extrêmement favorable au niveau thermodynamique (Rozhkova et Glockshuber, 2008) et que le domaine tDsbD permet aux deux Cys de ce domaine d'être accessibles d'une part du côté cytoplasmique et d'autre part du côté périplasmique (Cho *et al.*, 2007 ; Cho et Beckwith, 2009). Le basculement des deux cystéines est notamment possible grâce à la présence de trois résidus proline (Pro166, Pro284 et Pro289) également importants pour l'activité redox du domaine tDsbD. Cette flexibilité permet ainsi le transfert direct des électrons de la Trx cytoplasmique au domaine cDsbD côté périplasmique. Enfin, il a été montré que la proximité entre les domaines cDsbD et nDsbD est primordiale pour un transfert rapide des électrons entre les deux domaines (Rozhkova et Glockshuber, 2007).

Plusieurs structures tridimensionnelles déterminées par diffraction aux rayons X de nDsbD en complexe avec un de ses partenaires ont pu être obtenues, plus particulièrement des

Les « Trx-like »

complexes covalents *via* un pont disulfure intermoléculaire stabilisé entre nDsbD et DsbC (Haebel *et al.*, 2002) ou encore nDsbD et CcmG (paragraphe 3.2) (Stirnemann *et al.*, 2005). La structure d'un autre complexe covalent entre nDsbD et cDsbD a également été obtenue par diffraction aux rayons X (Rozhkova *et al.*, 2004).

Au sein du complexe covalent nDsbD-CcmG (Figure 32), la protéine nDsbD présente la même orientation que dans le complexe avec cDsbD (Goulding *et al.*, 2002). Deux régions sont impliquées dans l'interface : la région N-terminale et une région nommée « cap-loop » (résidus 68 à 72). En plus du pont disulfure intermoléculaire, cinq liaisons H ainsi que des liaisons hydrophobes sont impliquées au niveau de l'interface et notamment une liaison H avec la chaîne principale du résidu alanine adjacent au résidu *cis*-Pro conservé chez toutes les protéines « Trx-like ».

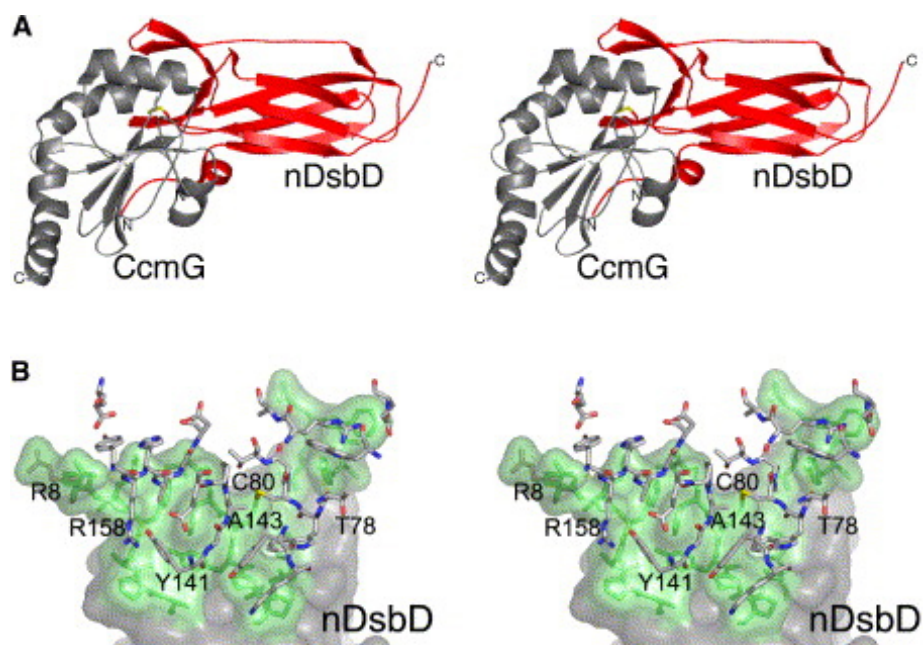


Figure 32 : Représentation du complexe covalent nDsbD-SS-CcmG (A) et de son interface (B) (d'après Stirnemann *et al.*, 2005).

La CcmG d'*E. coli* et la nDsbD sont respectivement représentées en gris et en rouge. Les résidus appartenant à la nDsbD et impliqués dans l'interface sont montrés en vert, les résidus de la CcmG intervenant au niveau de l'interface sont représentés en gris en mode bâtons.

La surface d'interaction entre le domaine nDsbD et ses différents partenaires est quasiment similaire, que ce soit au sein du complexe avec la cDsbD, la DsbC ou la CcmG (Figure 33). La majorité des résidus impliqués dans la liaison de la nDsbD à un de ses substrats « Trx-like » sont communs. Seuls quelques résidus (en bleu sur la figure 33) de la nDsbD forment des contacts spécifiques avec le substrat. Comme dit précédemment, deux régions flexibles sont impliquées dans la reconnaissance de ses substrats « Trx-like » : la région « cap-

loop » et le segment N-terminal. Ce dernier segment présente une très grande adaptibilité au sein des différents complexes, et notamment les résidus Arg8 et Ser9 qui peuvent adopter plusieurs conformations suivant les complexes formés.

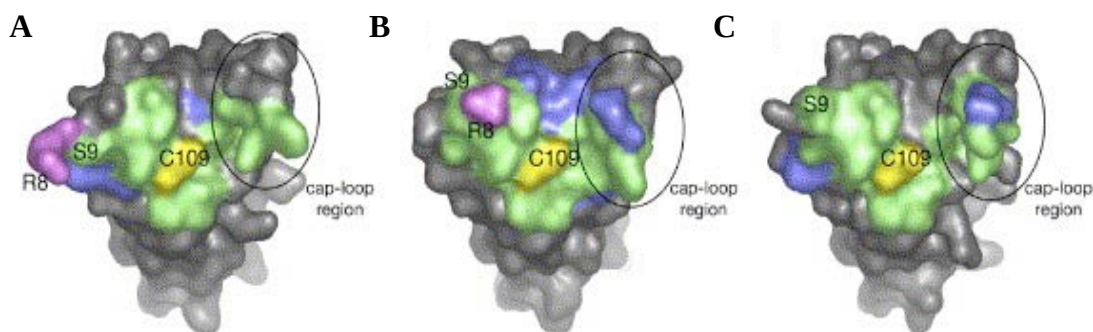


Figure 33 : Représentation schématique de la surface de la nDsbD impliquée dans l'interaction avec différents partenaires (d'après Stirnimann *et al.*, 2005).

(A) complexe nDsbD-SS-CcmG, (B) complexe nDsbD-SS-DsbC, (C) complexe nDsbD-SS-cDsbD. Les résidus de la DsbD impliqués dans les trois complexes sont représentés en vert ; les résidus impliqués dans une interaction spécifique sont représentés en bleu ; l'Arg8 est représentée en violet et la Cys109 impliquée dans le pont disulfure intermoléculaire est représentée en jaune. La région cap loop est entourée par un rond noir.

La réduction de la CcmG et de la DsbC d'*E. coli* par la nDsbD est très efficace avec des constantes de vitesse de deuxième ordre respectives d'environ $3.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et de $4.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Stirnimann *et al.*, 2005 ; Rozhkova *et al.*, 2004).

Dans le génome de *N. meningitidis*, aucun gène *dsbD* n'est annoté ; par contre chez *N. gonorrhoeae*, il existe une protéine homologue à la DsbD d'*E. coli* (32 % d'identité) (Brot *et al.*, 2006).

3.2. Rôle de la DsbE dans la maturation des cytochromes *c*

Le système Dsb contient une protéine supplémentaire appelée DsbE qui n'est pas impliquée dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées mais dans la voie de maturation des cytochromes *c*. Cette enzyme est également réduite par la protéine DsbD. Des études récentes faites par le Dr. Adeline Gand au laboratoire ont montré l'existence d'une DsbE chez *N. meningitidis* impliquée dans la maturation des cytochromes de type *c*.

Les cytochromes *c* sont des protéines de 8 à 14 kDa impliquées dans le transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire et sont localisées du côté périplasmique de la membrane. Dans ces cytochromes, le cofacteur hémique est lié covalamment *via* deux liaisons thioéthers entre les deux groupements vinyles de l'hème et les deux Cys de l'apocytochrome *c*

Les « Trx-like »

au niveau d'un motif de liaison CXXCH (Figure 34). L'His, présente au niveau de ce motif, sert de ligand axial au Fe^{2+} de l'hème.

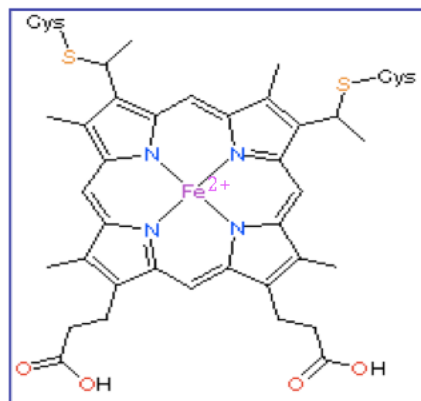


Figure 34 : Représentation d'un hème de type c.

L'hème est relié aux deux Cys de l'apocytochrome *c* via deux liaisons thioéthers impliquant les groupements vinyles de l'hème. L'atome de Fe^{2+} est coordonné à quatre noyaux pyroles et à une histidine de l'apocytochrome *c* appartenant à la signature CXXCH (non montrée sur le schéma).

De nombreuses études ont montré que l'hème est essentiel à la structuration des cytochromes *c*. En effet, il a été observé par des études de dichroïsme circulaire que le cytochrome *c*, en absence de l'hème, est complètement déstructuré alors que la forme ayant fixé l'hème est structurée (Fisher *et al.*, 1973).

3.2.1. Les trois systèmes de maturation des cytochromes de type *c*

La maturation des cytochromes *c* est une modification post-traductionnelle qui se produit chez toutes les bactéries et les archées qui possèdent des cytochromes *c* ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. Trois systèmes distincts de maturation des cytochromes *c* ont pu être mis en évidence : les eucaryotes possèdent un système de type III qui contient une seule enzyme appelée CCHL (cytochrome *c* hème lyase) permettant la fixation de l'hème à l'apocytochrome. Les bactéries, les plantes, les archées ainsi que certains protozoaires utilisent un système de maturation de type I ou II qui font intervenir respectivement neuf et quatre protéines. Chez les bactéries utilisant un système I ou II, la maturation des cytochromes *c* a lieu dans le périplasme. Ceci implique d'une part que l'hème et l'apocytochrome soient transloqués à travers la membrane plasmique, et d'autre part que les Cys de l'apocytochrome soient sous forme réduite pour pouvoir fixer l'hème. En effet, le périplasme des bactéries est un milieu oxydant, et les Cys de l'apocytochrome *c* sécrété dans le périplasme vont donc être oxydés sous forme de pont disulfure via la protéine DsbA. De ce fait, après son export vers le périplasme, l'apocytochrome va être incapable de fixer l'hème.

3.2.1.a. Le système I

Le système I de maturation des cytochromes *c* a été essentiellement étudié chez *E. coli* (Figure 35). Il est composé de neuf protéines membranaires dont la protéine DsbD, les huit autres étant codées par les gènes *ccmABCDEFGHIH* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Ce système est retrouvé chez les α - et γ -protéobactéries (ex : *Rhodobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*), chez quelques β - et δ -protéobactéries (ex : *Nitrosomas*, *Myxococcus*), au niveau des mitochondries de plante (ex : *Arabidopsis*) et de quelques protozoaires, ainsi que chez les archées.

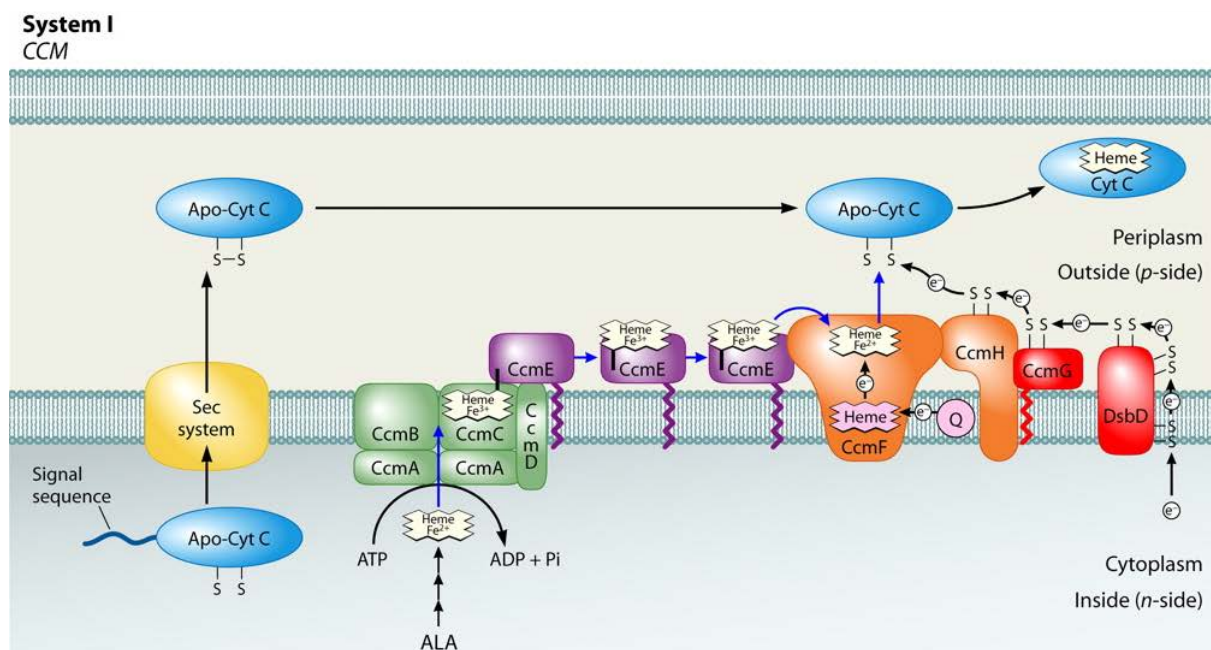


Figure 35 : Système I de maturation des cytochromes *c* (Kranz *et al.*, 2009).

Le flux des électrons est schématisé par les flèches bleues.

Toutes ces protéines sont essentielles pour la formation de cytochromes *c* matures. Les gènes *ccmA*, *ccmB*, *ccmC* ainsi que leurs homologues retrouvés chez les bactéries à Gram-négatif, codent les protéines CcmA, CcmB et CcmC qui constituent les différentes sous-unités d'un transporteur ABC (ATP-binding cassette). L'organisation de ce transporteur fait intervenir deux protéines CcmA pour une protéine CcmB, une protéine CcmC (Page *et al.*, 1997), et également la protéine CcmD (Goldman *et al.*, 1997). Ce transporteur CcmABCD est responsable de l'export de l'hème du cytoplasm vers le périplasm. Il a été montré que la protéine CcmC fonctionne de façon tout à fait indépendante et est impliquée dans la catalyse du transfert de l'hème à la protéine CcmE pour former un complexe ternaire hème/CcmC/CcmE (Schulz *et al.*, 1999). La CcmD pourrait assister l'interaction entre les protéines CcmC et CcmE (Ahuja et Thöny-Meyer, 2005). L'hème est ensuite transféré à la protéine CcmF puis à l'apocytochrome *c* réduit. Les protéines CcmC et CcmF possèdent un domaine riche en tryptophanes (appelée domaine WWD) orienté vers le périplasm et impliqué

dans la fixation de l'hème. La CcmG (aussi appelée DsbE, voir paragraphe 3.2.2.) et la CcmH seraient responsables de la réduction des Cys de l'apocytochrome *c*. La protéine CcmG reçoit les électrons de la protéine DsbD et les transférerait à l'apocytochrome *via* la protéine CcmH (Reid *et al.*, 2001 ; Fabianek *et al.*, 2000). Une étude plus récente a montré que les protéines CcmF et CcmH formeraient un complexe transmembranaire de haut poids moléculaire sur lequel l'hème serait fixé covalamment à l'apocytochrome *c* (Sanders *et al.*, 2008).

3.2.1.b. Le système II

Le système II de maturation des cytochromes *c* est beaucoup plus simple que le système I puisqu'il est constitué seulement de quatre protéines (Figure 36) codées par les gènes *ccsA*, *ccsB*, *ccsX* et *dsbD* chez *Bordetella pertussis* (Beckett *et al.*, 2000). Le système II est retrouvé dans les chloroplastes, les bactéries à Gram-positif (ex : *Bacillus*), les cyanobactéries, les ϵ -protéobactéries (ex : *Helicobacter*), la plupart des β -protéobactéries (ex : *Bordetella*, *Neisseria*) et quelques δ -protéobactéries.

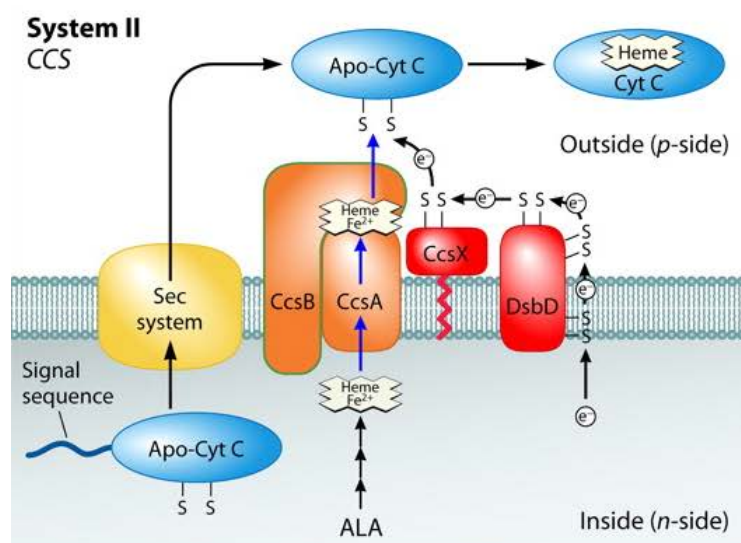


Figure 36 : Système II de maturation des cytochromes *c* (Kranz *et al.*, 2009).
Le flux des électrons est schématisé par les flèches bleues.

La bactérie *B. pertussis* s'avère être un modèle de choix pour l'étude de ce système puisqu'elle possède trois cytochrome oxydases et une seule serait une cytochrome *c* oxydase (Kranz *et al.*, 2002). De ce fait, les mutations au niveau des gènes *ccsA*, *B*, *X* et *dsbD* codant des protéines essentielles pour la maturation des cytochromes *c* ne sont pas létales, à l'inverse de ce qui est observé chez *B. subtilis* où des mutations dans les gènes *ccsA* et *ccsB* sont létales (Sun *et al.*, 1996 ; Le Brun *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui est retrouvé dans le système I, aucune protéine de type ABC transporteur n'est impliquée dans l'assemblage des cytochromes

c dans le système II. Dans le système II, l'export de l'hème du cytoplasme vers le périplasma ainsi que la ligature de l'hème à l'apocytochrome impliquent la protéine CcsA qui possède un domaine périplasmique WWD (Goldman *et al.*, 1998), et la protéine CcsB (Frawley et Kranz, 2009 ; Ahuja *et al.*, 2009 ; Kern *et al.*, 2010). L'hème est exporté du cytoplasme au périplasma par la protéine CcsB : il est pris en charge par deux résidus histidine situés du côté cytoplasmique. Ensuite, le domaine WWD de la CcsA et deux autres résidus histidine, l'un appartenant à la protéine CcsA et l'autre à la protéine CcsB, prennent en charge l'hème du côté périplasmique et le protègent de toute oxydation. La protéine CcsX (aussi appelée DsbE) réduit les cystéines oxydées de l'apocytochrome c. La DsbD, tout comme dans le système I, réduit la CcsX (DsbE). Une différence des plus importantes existant entre le système I et le système II est que dans le cas du système II, la protéine CcsX (DsbE) transférerait directement ses électrons à l'apocytochrome c sans passer par un intermédiaire protéique (CcmH chez *E. coli*). La liaison de l'hème sur l'apocytochrome c réduit pourrait alors avoir lieu au sein d'un complexe de haut poids moléculaire CcsA/CcsB/hème-CcsX/apocytochrome c.

3.2.1.c. Le système III

Le système III de maturation des cytochromes c constitue le système le plus simple puisqu'il ne fait intervenir qu'une seule protéine appelée cytochrome hème lyase (CCHL) qui lie à la fois l'hème et l'apocytochrome (Figure 37) (Dumont *et al.*, 1988). Cette enzyme est impliquée non seulement dans la fixation de l'hème à l'apocytochrome, mais également dans l'import de l'apocytochrome dans les mitochondries (Dumont *et al.*, 1991). Peu de chose sont vraiment connues à ce jour sur ce système.

L'hème se fixe à la CCHL par un motif CPX conservé qui est essentiel pour la fonction (Steiner *et al.*, 1996). Cependant, il a été récemment observé que quelques CCHL ne possédaient pas cette séquence (Hamel *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que la CCHL peut interagir avec les apocytochromes. Cependant, l'activité enzymatique de la CCHL n'a pas été démontrée. Rien n'est connu également sur l'export de l'hème jusqu'à la CCHL (Merchant, 2009). Trois hypothèses sont avancées : (i) l'existence d'un transporteur spécifique de l'hème comme pour le système II ; (ii) une simple diffusion à travers la membrane interne jusqu'à la CCHL ; (iii) la présence d'une protéine de type « flippase », car l'hème est une molécule amphipatique comme les phospholipides. Le maintien de l'hème sous forme réduite est la seule condition nécessaire pour la fonction de la CCHL et la synthèse du cytochrome c.

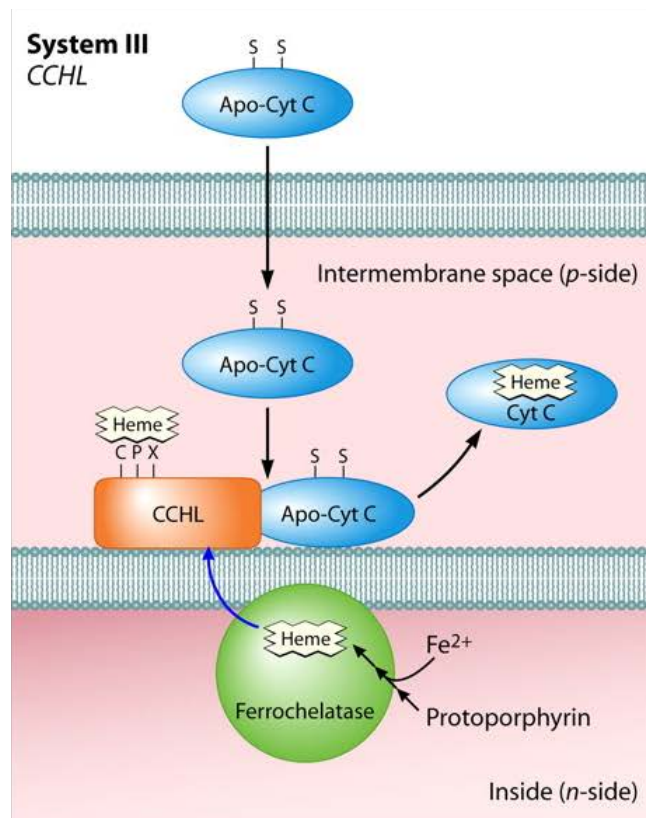


Figure 37 : Système III de biogenèse des cytochromes *c* (Kranz *et al.*, 2009).
Le flux des électrons est schématisé par les flèches bleues.

3.2.2. Propriétés des DsbE

Les DsbE sont des disulfures oxydoréductases périplasmiques. Il existe deux types de DsbE décrites jusqu'à présent ; celles possédant un caractère réducteur et celles, comme dans le cas particulier de la bactérie à Gram-positif *M. tuberculosis*, qui possèdent un caractère oxydant (Goulding *et al.*, 2004). Des études *in vivo*, réalisées chez *E. coli* et *B. pertussis*, ont permis de montrer que les DsbE réductrices étaient impliquées dans la maturation des cytochromes *c*. Ainsi une délétion du gène *ccmG* chez *E. coli* ou du gène *ccsX* chez *B. pertussis* ne permet plus d'obtenir des cytochromes matures ayant fixé l'hème (Beckett *et al.*, 2000 ; Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Les DsbE permettraient la réduction de l'apocytochrome *c*, soit directement dans le cas des systèmes de maturation des cytochromes *c* de type II, soit via la protéine CcmH dans le cas des systèmes de maturation des cytochromes *c* de type I. Après réduction de l'apocytochrome *c*, les DsbE se retrouvent oxydées sous forme de pont disulfure et doivent donc être régénérées pour être de nouveau fonctionnelles. Le partenaire protéique permettant la régénération des DsbE sous forme réduite est la DsbD. Dans le génome de *N. meningitidis*, aucun gène *dsbE* n'était annoté au début de ma thèse.

3.2.2.a. Propriétés biochimiques des DsbE

Les DsbE possédant un caractère réducteur, ont un potentiel redox compris entre -0,217 et -0,175 V. Par contre, la DsbE de *M. tuberculosis* présente un potentiel redox de -0,128 V (Goulding *et al.*, 2004) proche de celui observé pour les DsbA (-0,124 V) (Ito et Inaba, 2008) en accord avec son caractère oxydant. Toutes les DsbE possèdent deux Cys essentielles avec la Cys catalytique exposée au solvant. Cependant, les pKa de ces deux résidus cystéine diffèrent suivant le caractère réducteur ou oxydant de la DsbE. Par exemple, le pKa de la Cys catalytique de la DsbE de *M. tuberculosis* est de 5,0, ce qui est particulièrement bas comparé à ce qui a été trouvé pour les Trx (7,5) (Chivers *et al.*, 1997) ou encore pour la CcmG d'*E. coli* (6,8) (Li *et al.*, 2001). Le pKa de la Cys de régénération n'a pas été déterminé pour la DsbE de *M. tuberculosis*. Pour les DsbE réductrices, le pKa de la Cys de régénération est élevé, de l'ordre de 9,0 (Lewin *et al.*, 2006).

3.2.2.b. Caractéristiques structurales des DsbE

À ce jour, plusieurs structures tridimensionnelles de DsbE ont été résolues par diffraction des rayons X ou par RMN : la CcmG d'*E. coli*, la CcmG de *Bradyrhizobium japonicum*, ResA de *B. subtilis*, ainsi que celle de la DsbE oxydante de la bactérie à Gram-positif *M. tuberculosis* (Ouyang *et al.*, 2006 ; Edeling *et al.*, 2002 ; Colbert *et al.*, 2006 ; Goulding *et al.*, 2004).

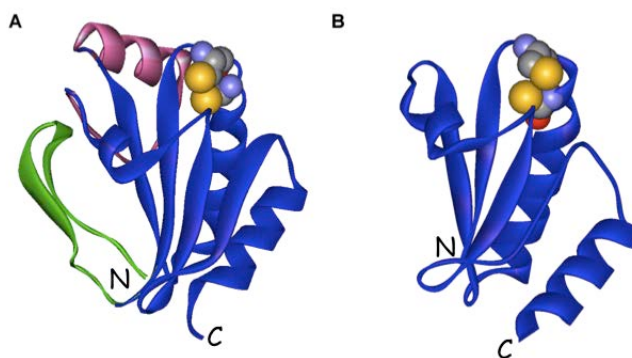


Figure 38 : Comparaison des structures tridimensionnelles de la protéine ResA de *B. subtilis* (A) et de la Trx1 d'*E. coli* (B).

Les structures secondaires appartenant au repliement Trx sont indiquées en bleu. Les structures secondaires spécifiques du repliement DsbE sont indiquées en vert (extrémité N-terminale) et en rose (insertion entre le brin $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 2$). Les atomes des chaînes latérales des résidus cystéines du motif CXXC sont représentés sous la forme de sphères. Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel WebLab ViewerPro 3.7 à partir des fichiers PDB des structures : 1SU9 pour ResA de *B. subtilis* et 1XOB pour la Trx1 d'*E. coli*.

Les DsbE sont des protéines monomériques qui appartiennent à la famille des « Trx-like ». Autour du repliement Trx, on trouve deux insertions supplémentaires (Figure 38). La

Les « Trx-like »

première insertion est située à l'extrémité N-terminale de la protéine et présente une structure en épingle à cheveux contenant deux brins β . La seconde insertion, également appelée insertion centrale, est localisée après le motif $\beta_1\alpha_1\beta_2$ et est composée d'une hélice α ainsi que d'un brin β .

Ces insertions sont conservées chez tous les homologues DsbE. Une délétion de l'insertion centrale empêche la formation de cytochromes *c* matures, sans toutefois changer la stabilité de la protéine (Edeling *et al.*, 2002). Cette insertion centrale pourrait donc avoir un rôle dans l'interaction entre la DsbE et ses deux partenaires protéiques : l'apocytochrome *c* ou la DsbD. Au contraire, une étude par diffraction aux rayons X a montré que l'insertion située en N-terminal et contenant deux brins β était essentielle pour le maintien de la structure globale de la protéine ainsi que pour le maintien de la structure du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). Une délétion de cette partie N-terminale empêche la formation de cytochromes *c* matures. Des alignements de séquences d'homologues CcmG ont permis de mettre en évidence l'existence d'une région strictement conservée GVXGXPETF appelée région « Fingerprint ». La structure de CcmG montre que cette région forme une boucle proche du site actif (Figure 39). A l'intérieur de ce motif se trouve la proline de conformation *cis* qui est retrouvée chez toutes les protéines « Trx-like ». La structure de la CcmG d'*E. coli* révèle que le résidu *cis*-Pro de cette région « Fingerprint » aide à stabiliser la structure du site actif grâce à des interactions de van der Waals avec le pont disulfure du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). De plus, cette proline en conformation *cis* permettrait de positionner correctement le résidu alanine adjacent pour permettre une interaction avec le partenaire DsbD. Le résidu glutamate de cette région « Fingerprint » forme un réseau de liaisons H avec les chaînes principales des résidus présents à l'extrémité N-terminale de la région « Fingerprint » permettant de conserver la *cis*-Pro dans une position appropriée et donc de stabiliser le site actif. Le site actif des DsbE, comme toutes les « Trx-like », possède une signature CXXC. Néanmoins, une des particularités du site actif est qu'il est localisé dans un environnement constitué de nombreux résidus à caractère acide : présence de deux résidus glutamate (Glu158 et Glu98) strictement conservés chez toutes les DsbE et d'un résidu aspartate (Asp97) qui n'est pas conservé (Figure 39).

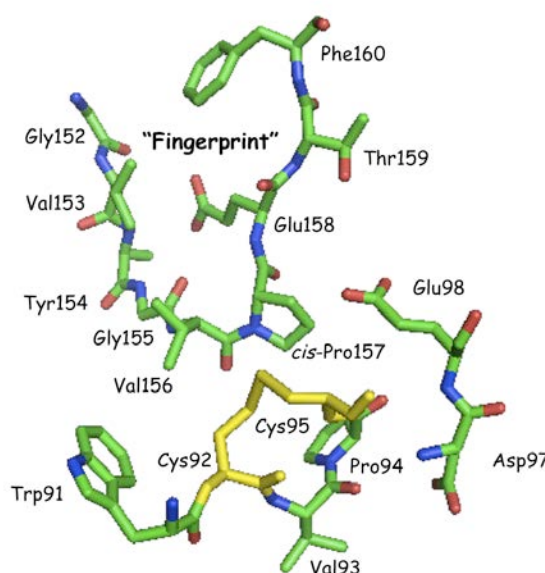


Figure 39 : Site actif et de la région « Fingerprint » de la CcmG d'*E. coli*.

Les résidus Cys92 et Cys95 sont sous forme de pont disulfure (jaune). La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 1KNG.

Des alignements de séquences et des superpositions de structures tridimensionnelles ont mis en évidence que deux régions strictement conservées dans les DsbE ne sont pas retrouvées dans la DsbE *M. tuberculosis*. En effet, la région N-terminale structurée en épingle à cheveux est beaucoup plus courte dans la DsbE *M. tuberculosis*, ce qui ne lui permet pas d'adopter une structuration similaire, et la région « Fingerprint » n'est pas conservée.

3.2.3. Cytochromes de type *c* de *N. meningitidis*

La bactérie pathogène de l'homme *N. meningitidis* est capable d'utiliser des accepteurs finaux d'électrons différents de l'O₂ au cours de la respiration, et notamment en conditions microaérobies où elle va mettre en place un système de dénitrification (Rock *et al.*, 2005). L'analyse du génome de *N. meningitidis* a mis en évidence l'existence de trois accepteurs terminaux d'électrons putatifs : une oxydase de type cytochrome *cbb3*, une nitrite réductase (AniA) et une nitrique oxyde réductase (NorB) (introduction partie I paragraphe 3.3.2). Les cytochromes *cbb3* présents chez les autres organismes ont la particularité de posséder une très forte affinité pour l'O₂ et sont souvent associés à une croissance dans des conditions où la concentration en O₂ est limitée. L'inspection du génome de *N. meningitidis* révèle également la présence putative d'homologues des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire, ce qui suggère que les électrons entrent dans la chaîne respiratoire *via* une NADH déshydrogénase ou une succinate déshydrogénase, puis que ces électrons sont transférés au complexe *bc1*, ou à l'autre accepteur terminal d'électrons NorB, *via* des ubiquinones. Il est à noter que les méningocoques sont capables de synthétiser de l'ubiquinone mais pas la ménaquinone. Des

Les « Trx-like »

études menées par Deeudom *et al.*, les ont conduit à proposer une organisation de la chaîne respiratoire de *N. meningitidis* (Figure 40) (Deeudom *et al.*, 2006 et 2008). Trois cytochromes *c* ont été caractérisés chez *N. meningitidis* : c_x (ou c_2), c_4 et c_5 . Un cytochrome *c'* est également présent, qui a été purifié et caractérisé *in vitro* (Huston *et al.*, 2005). Tout comme chez *R. capsulatus*, ce cytochrome *c'* permettrait d'augmenter la résistance des bactéries vis-à-vis du $\text{NO}^\cdot$ (Stevanin *et al.*, 2005).

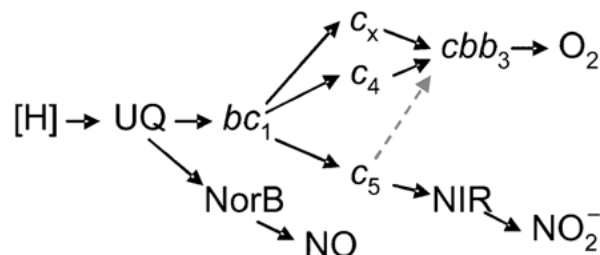


Figure 40 : Chaînes de transport des électrons proposées pour *N. meningitidis* (Deeudom *et al.*, 2006).

UQ : ubiquinone ; NIR : nitrite réductase.

3.3. Le domaine Nter de PilB

Le domaine Nter de la protéine PilB possède un centre redox WCPLC correspondant à un centre disulfure redox de type Trx avec un potentiel redox de -0,230 V. De plus, il a été montré que le domaine Nter était capable de réduire les domaines isolés MsrA et MsrB de la protéine PilB de *N. meningitidis* (Wu *et al.*, 2005) avec cependant une meilleure efficacité catalytique pour le domaine MsrB.

Des études récentes *in vitro* ont également montré que le domaine Nter de la protéine PilB de *N. gonorrhoeae* était réduit par le domaine N-terminal de la protéine DsbD d'*E. coli* (Brot *et al.*, 2006).

La structure tridimensionnelle du domaine Nter a été résolue par diffraction aux rayons X (Figure 41) et montre un repliement de type Trx (Ranaivoson *et al.*, 2006). On peut noter des insertions du côté N-terminal et entre le brin $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 2$, qui sont caractéristiques de la famille des DsbE, avec en plus une boucle additionnelle constituée de quatre résidus (F₉₉LHE₁₀₂), qui elle n'est pas retrouvée dans les structures et les séquences des DsbE (Figure 42).

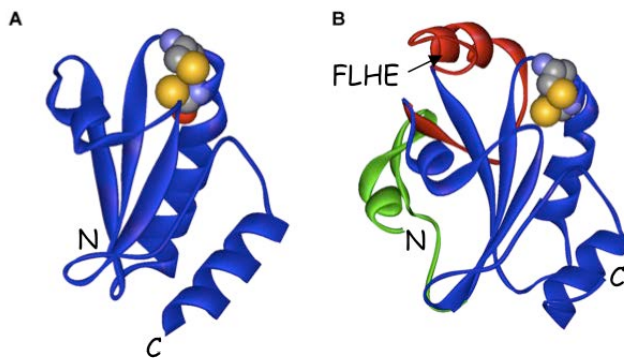


Figure 41 : Repliement Trx (A) et structure tridimensionnelle du domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis* (B).

Les structures secondaires appartenant au repliement Trx sont indiquées en bleu. Les structures secondaires spécifiques du repliement DsbE sont indiquées en vert (extrémité N-terminale) et en rouge (B) (insertion entre $\beta 2$ et $\alpha 2$). Les atomes des chaînes latérales des résidus cystéine du motif CXXC sont représentés sous la forme de sphères. La boucle composée des résidus FLHE est indiquée par une flèche. Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel WebLab ViewerPro 3.7 à partir des fichiers PDB des structures : 1XOB pour la Trx1 d'*E. coli* et 2FY6 pour le domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis*.

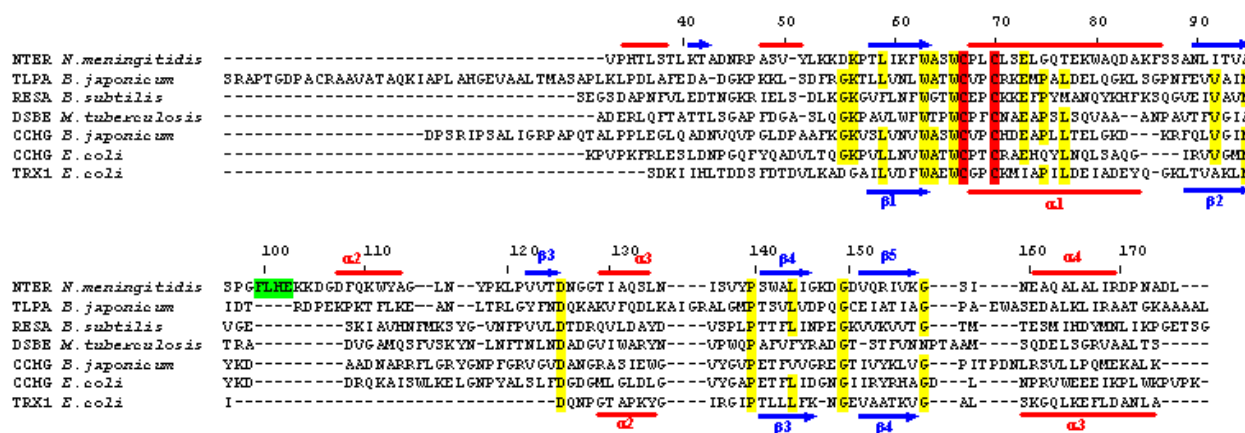


Figure 42 : Alignement de la séquence du domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis* avec les séquences des DsbE dont la structure tridimensionnelle est connue et de la Trx1 d'*E. coli* (d'après Ranaivoson *et al.*, 2006).

La numérotation utilisée est basée sur celle du domaine N-terminal de *N. meningitidis*. Les structures secondaires indiquées au dessus de l'alignement sont celles correspondant au domaine N-terminal de *N. meningitidis*, celles représentées en dessous de l'alignement sont celles correspondant au repliement Trx : les hélices α sont indiquées par des traits rouges, les brins β par des flèches bleues. Les résidus cystéine sont indiqués en noir sur fond rouge. Les résidus conservés dans au moins cinq des sept séquences sont indiqués sur fond jaune. Les résidus ₉₉FLHE₁₀₂ sont indiqués en noir sur un fond vert.

Plus récemment, la structure tridimensionnelle du domaine Nter sous forme réduite et oxydée ainsi que la dynamique conformationnelle en solution a été étudiée par RMN (Figure 43) (Quinternet *et al.*, 2008).

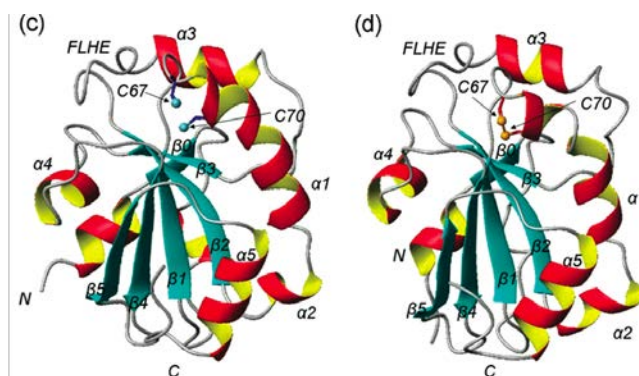


Figure 43 : Structures tridimensionnelles du domaine N-terminal sous forme réduite (c) et oxydée (d) de PilB de *N. meningitidis* (Quinternet *et al.*, 2008).

Les structures secondaires en hélices α et brins β sont respectivement représentées en rouge/orange et en bleu. Les cystéines sont respectivement représentées par des boules bleues et oranges sur les formes réduites et oxydées.

Le site actif $C_{67}PLC_{70}$ est situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 , comme dans les autres DsbE. La forme thiolate de la Cys67 serait stabilisée par trois types d'interactions : 1) le dipôle de l'hélice α_1 , 2) une liaison H avec la chaîne latérale de la Cys70 ; et 3) deux liaisons H avec les NH des chaînes principales des résidus 69 et 70. La Cys70 se trouve dans une poche hydrophobe, qui est un environnement favorisant la forme thiol.

Les résidus additionnels $F_{99}LHE_{102}$ sont situés à proximité du site actif et leur positionnement est stabilisé dans la structure par trois liaisons H, dont deux avec la chaîne latérale du résidu invariant Glu102 (Figure 44).

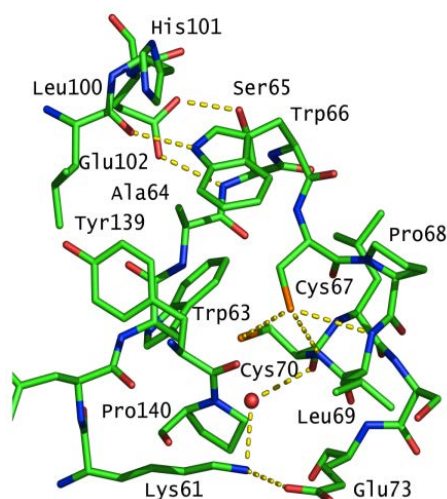


Figure 44 : Structure du site actif du domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis* et de la boucle FLHE (Ranaivoson *et al.*, 2006).

Les résidus du site actif sont représentés sous la forme de bâtons, les liaisons H sont représentées par des lignes discontinues jaunes et la boule rouge représente une molécule d'eau présente à proximité du résidu Cys70.

Partie IV. La protéine PilB

1. Historique

Le gène *pilB* a été identifié initialement chez *N. gonorrhoeae*. Sa dénomination vient des premières études qui suggéraient que la protéine PilB était un régulateur transcriptionnel inhibant la synthèse des pilines (Taha *et al.*, 1988 ; Taha et Marchal, 1990 ; Taha *et al.*, 1991). Dès 2002, ce rôle a été infirmé par une étude chez *N. gonorrhoeae* qui a montré que PilB n'avait aucun rôle dans l'expression des pilines. En effet, une souche n'exprimant plus PilB n'est pas affectée au niveau de sa piliation, de sa production en pilines, de son adhérence et de la quantité d'ARN messagers correspondant. De plus, la transformation de cette souche avec un plasmide permettant la production de PilB sous le contrôle d'un promoteur dépendant de l'isopropylthiogalactoside (IPTG) n'a aucun effet sur la piliation de la bactérie (Skaar *et al.*, 2002).

2. PilB, une protéine périplasmique

Deux formes protéiques issues du gène *pilB* de *N. gonorrhoeae* ont été caractérisées par l'équipe du Dr. S. Seifert (Skaar *et al.*, 2002) : une forme, appelée PilB, contenant les trois domaines qui est sécrétée dans le périplasma, et qui est décrite comme étant localisée sur la membrane externe et une seconde forme cytoplasmique tronquée du domaine Nter ne contenant que les domaines MsrA et MsrB (Figure 45).

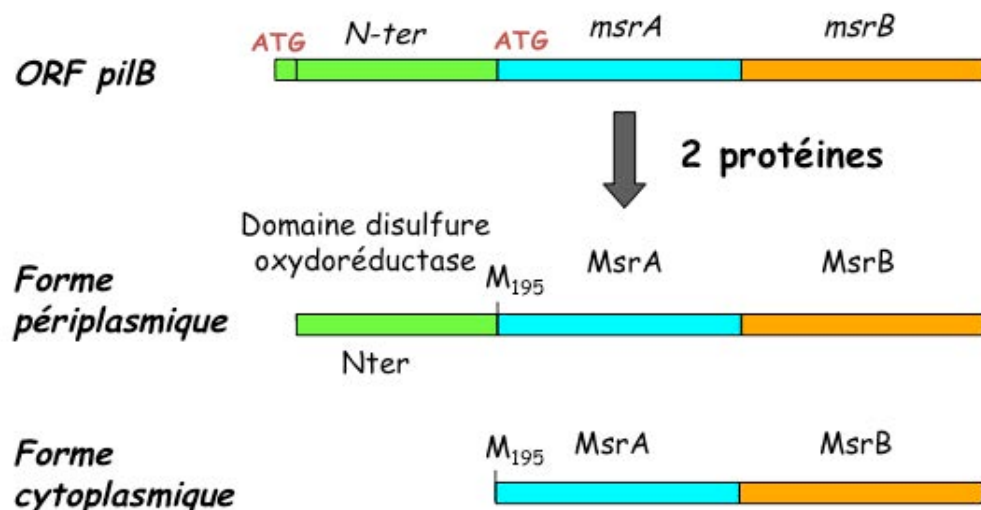


Figure 45 : Représentation des deux polypeptides générés à partir de l'ORF de *pilB* de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae*.

A partir du gène *PilB*, deux formes protéiques sont produites : 1) l'une périplasmique (PilB) qui est décrite ancrée à la membrane externe composée du domaine N-terminal à activité disulfure oxydoréductase, tronqué des 17 premiers résidus correspondant au peptide signal d'export, et des deux domaines à activité Msr ; et 2) l'autre cytoplasmique qui ne possède que les domaines MsrA et MsrB. Cette forme résulte d'un mécanisme de réinitiation interne de la traduction au niveau du codon AUG correspondant au résidu Met195.

De plus, notre équipe a montré, à partir d'études d'expression hétérologue chez *E. coli*, que cette forme tronquée de PilB de *N. meningitidis* est produite par un mécanisme de réinitiation interne de la traduction au niveau d'un codon AUG correspondant au résidu Met195 de la protéine entière.

3. PilB de *N. gonorrhoeae* serait impliquée dans la résistance au stress oxydant

Les études réalisées par le groupe du Dr. S. Seifert ont également montré que la protéine PilB localisée dans le périplasme de *N. gonorrhoeae* serait nécessaire à la survie des bactéries en présence d'H₂O₂ (Skaar *et al.*, 2002). Ce rôle serait sans doute lié à la présence des activités Msr dans PilB, ce qui a conduit notre équipe, dès 2002, à caractériser au niveau biochimique, enzymatique et structural les trois domaines isolés de PilB (voir parties II et III de l'introduction).

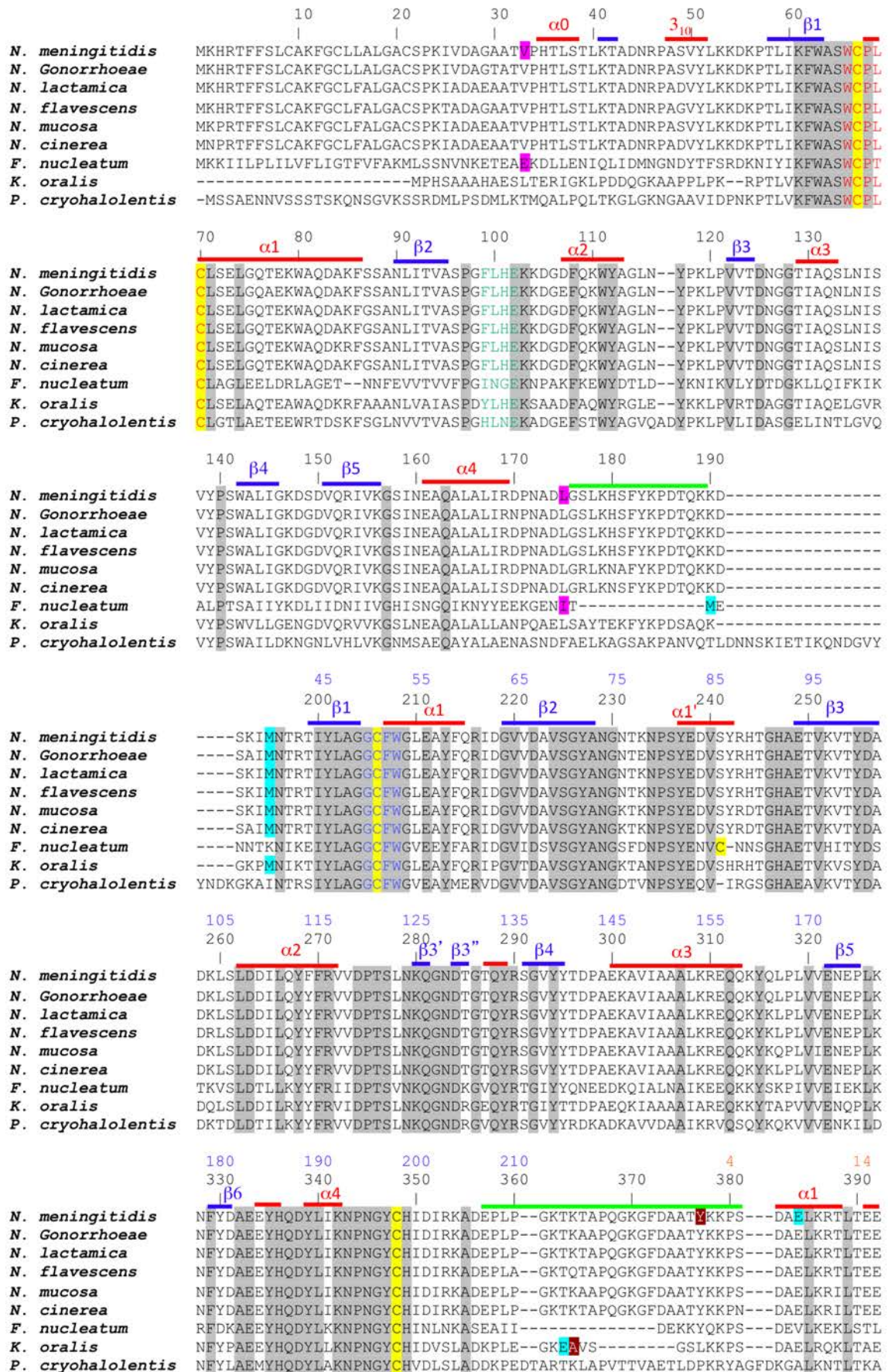
4. Le domaine Nter isolé de PilB recycle efficacement le domaine MsrB isolé

L'étude des propriétés enzymatiques des domaines isolés de PilB de *N. meningitidis* a montré que le domaine Nter recycle efficacement l'activité réductase du domaine MsrB (k_2 de $7,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), alors qu'il recycle de façon peu efficace le domaine MsrA (k_2 de $4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Wu *et al.*, 2005).

De plus, il a été montré en 2006 que le domaine N-terminal de la protéine transmembranaire DsbD de *N. gonorrhoeae* était capable de réduire le domaine Nter de PilB (Brot *et al.*, 2006).

5. Le gène *pilB* n'est présent que dans le génome de quelques bactéries

Des recherches par identité de séquence protéique dans les banques génomiques montrent que le gène *pilB* n'est présent que dans le génome de très peu de bactéries commensales ou pathogènes pour l'Homme telles que les bactéries du genre *Neisseria* (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, *N. flavescens*, *N. mucosa* et *N. cinerea*) ainsi que chez des bactéries de la plaque dentaire comme *Fusobacterium nucleatum*, *Kingella oralis*, *Eikenella corrodens*, ou *Cryptobacterium curtum* et chez une bactérie extrêmophile non pathogène *Psychrobacter cryohalolentis* (Figure 46). Le taux d'identité de séquences au niveau protéique (entre 47 et 98 %) et la proximité environnementale de certaines de ces bactéries suggère que ce gène a été acquis par transfert horizontal inter espèces.



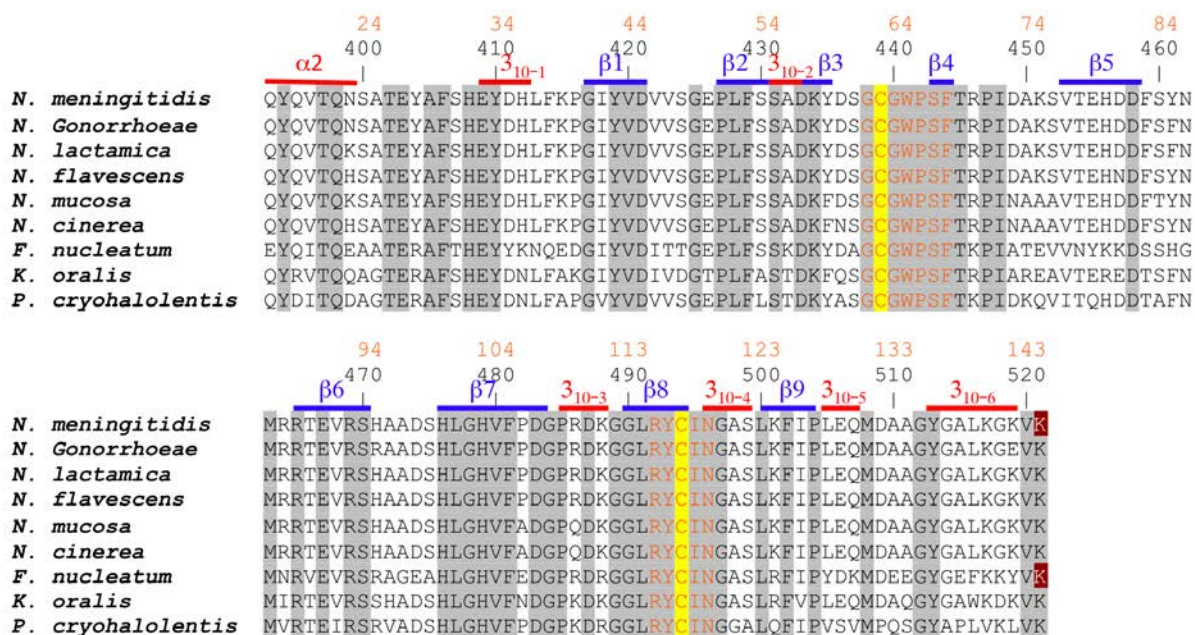


Figure 46 : Alignement de séquences de protéines PilB.

La numérotation en noir est basée sur la séquence PilB entière de *N. meningitidis* et la numérotation en couleur correspond à celle utilisée sur les domaines Msr isolés de *N. meningitidis* (bleu pour MsrA et orange pour MsrB). Les résidus Cys sont indiqués sur fond jaune. La signature du centre disulfure redox de type « Trx-like » au niveau du domaine N-terminal est indiquée en rouge et les résidus correspondant à la séquence F₉₉LHE₁₀₂ de *N. meningitidis* sont indiqués en vert. La Met correspondant à la Met de réinitiation est sur fond bleu clair. La séquence signature des MsrA est indiquée en bleu et celles des MsrB en orange. Les résidus N-terminaux et C-terminaux des domaines produits sous forme isolés de PilB de *N. meningitidis* sont indiqués respectivement sur fond rose, bleu et bordeaux pour le domaine Nter, le domaine MsrA et le domaine MsrB. Les résidus conservés sont surlignés en gris. Les structures secondaires de type hélices α ou 3_{10} et les brins β sont indiquées respectivement en rouge et en bleu, et correspondent aux domaines NmNter, NmMsrA et NmMsrB. Les séquences pouvant correspondre aux régions « linkers » entre les trois domaines sont représentées en vert.

N. meningitidis est l'agent infectieux responsable de méningites et de septicémies. Son caractère pathogène est lié à sa capacité à résister aux ERO et ERA produites par les macrophages de l'hôte en réponse à l'infection. Ainsi, *N. meningitidis* possède différents systèmes de défense antioxydants, parmi lesquels la protéine PilB pourrait jouer un rôle. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels PilB interviendrait ne sont pas connus. Le gène *pilB* n'est retrouvé à ce jour que dans très peu de génomes bactériens, tels que : *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*, *F. nucleatum* et *P. cryohalolentis*. Chez les *Neisseriae*, deux formes protéiques issues du gène *pilB* ont été caractérisées : une forme cytoplasmique tronquée qui ne contient que les domaines MsrA et MsrB et la forme périplasmique appelée PilB contenant en plus des deux domaines Msr un domaine N-terminal. Les travaux réalisés par notre équipe, avant que je ne débute mon projet de thèse, avaient montré que le domaine Nter isolé de PilB de *N. meningitidis* : 1) est une disulfure oxydoréductase de la famille des « Trx-like » avec un repliement de type DsbE, et 2) est capable de recycler les activités Msr des deux domaines isolés de PilB, mais ne réduit efficacement que le domaine MsrB avec une constante de deuxième ordre (k_2) de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Cette sélectivité du domaine Nter vis-à-vis du domaine MsrB observée sur les domaines isolés n'était pas attendue et pose la question de l'influence du contexte tridimensionnel dans la protéine PilB entière. D'autre part, il avait été décrit chez *N. gonorrhoeae* que PilB serait ancrée à la membrane externe. Or, le partenaire périplasmique réducteur, qui pourrait être le domaine N-terminal de la protéine DsbD, est localisé dans la membrane interne. Enfin, les travaux réalisés par le Dr A. Gand au laboratoire ont montré que la DsbE1 de *N. meningitidis* serait impliquée dans la maturation des cytochromes *c*.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de mon projet de thèse étaient : 1) d'étudier le mécanisme de recyclage des domaines Msr par le domaine Nter dans la protéine PilB entière, 2) d'identifier le partenaire réducteur périplasmique de PilB, et 3) de poursuivre la caractérisation biochimique et enzymatique de la DsbE1 de *N. meningitidis*.

Les résultats correspondant aux différents objectifs sont présentés en trois parties :

- La première partie est consacrée d'une part à la caractérisation *in vitro* du mécanisme de réduction des activités Msr des protéines PilB de *N. meningitidis* et *F. nucleatum*, et d'autre part à la localisation périplasmique de PilB de *N. meningitidis* *in vivo*, ainsi qu'à l'étude du rôle *in vivo* de PilB dans la résistance à différents stress oxydants chez *N. meningitidis*. La caractérisation biochimique et enzymatique de ces deux protéines PilB a été réalisée en vue de montrer si la sélectivité de réduction observée pour le domaine MsrB isolé était conservée dans

Objectifs

PilB, et si le mécanisme de recyclage des domaines Msr par le domaine Nter était de type intra ou intermoléculaire. Pour cela, les protéines entières et différents variants possédant un (ou deux) domaine(s) inactif(s) ont été produits chez *E. coli*, et les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines MsrA et MsrB dans PilB, ainsi que ceux concernant la réduction des domaines Msr par le domaine Nter dans PilB ont été déterminés.

- La deuxième partie est consacrée à la caractérisation biochimique, enzymatique et structurale du partenaire réducteur de PilB qui est le domaine N-terminal de la protéine DsbD (nDsbD) de *N. meningitidis*. Des études structurales par RMN menées par le Dr Marc Quinternet (équipe du Dr MT Cung) avaient montré que le domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis* présentait un repliement typique des DsbE, qui sont des protéines périplasmiques réductibles par le domaine N-terminal de la protéine DsbD transmembranaire. Dans ce contexte, le domaine N-terminal de la protéine DsbD de *N. meningitidis* a été produit et purifié, afin de confirmer son rôle en tant que réducteur du domaine Nter de PilB et de la DsbE1 de *N. meningitidis*. En parallèle, une étude structurale de la nDsbD seule et en complexe avec le domaine Nter de PilB a été réalisée par RMN par le Dr M. Quinternet afin d'identifier les facteurs structuraux impliqués dans la reconnaissance entre les deux partenaires. Les trois publications issues de l'étude structurale du mutant C103S de la nDsbD et du complexe covalent nDsbD / Nter sont jointes en annexes.

- La troisième partie porte sur la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de la DsbE1 de *N. meningitidis*, débutée par le Dr A. Gand lors de sa thèse, notamment de la réduction *in vitro* des apocytochromes *c* et l'effet de la délétion du gène *dsbE1* chez *N. meningitidis*. En effet, lors de sa thèse, le Dr A. Gand avait montré que la DsbE1 était capable de réduire un peptide mimant un apocytochrome *c*.

L'ensemble des résultats est discuté dans la partie Discussion / Perspectives, en relation avec des données structurales de PilB et d'un complexe covalent MsrB / Nter obtenues par l'approche SAXS respectivement dans le cadre d'une collaboration (UMR 7036, Dr M. Ranaivoson) et par le Dr A. Gruez de notre laboratoire.

Résultats

Partie I : Etude du recyclage des activités Msr dans les protéines PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum*

L'étude des propriétés enzymatiques des domaines isolés de la protéine PilB de *N. meningitidis* a montré que le domaine N-terminal (Nter) recycle efficacement l'activité réductase du domaine MsrB alors qu'il recycle de façon peu efficace le domaine MsrA (Wu *et al.*, 2005), avec des constantes de deuxième ordre respectives de $7,6 \cdot 10^4$ et de $4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Si le rôle du Nter est de recycler les deux activités Msr de PilB dans le périplasma, il est vraisemblable que l'environnement tridimensionnel des domaines Msr dans PilB entière peut être essentiel. D'autre part, la question se pose de savoir si la réduction des domaines Msr par le domaine Nter se fait par un mécanisme intra ou intermoléculaire, qui n'est pas sans relation avec la localisation membranaire de PilB, décrite comme étant ancrée à la membrane externe.

Pour aborder cette problématique sur la protéine PilB de *N. meningitidis*, j'ai d'une part étudié la réduction des domaines Msr par le domaine Nter dans le contexte de la protéine PilB entière. Pour cela, PilB a été surproduite dans *E. coli* sous forme soluble par délétion du peptide signal, selon la même stratégie que celle utilisée précédemment pour obtenir le domaine Nter. Des variants de PilB présentant un ou deux domaines inactifs par mutation des résidus Cys essentiels ont également été produits et les propriétés enzymatiques des différentes formes de PilB ont été étudiées.

D'autre part, j'ai caractérisé les propriétés enzymatiques de la protéine PilB de *F. nucleatum*. Les séquences de PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum* présentent 49 % d'identité de séquence et les signatures des trois domaines sont conservées dans PilB de *F. nucleatum* (Figure 46 page 68). Les domaines isolés de la protéine PilB de *F. nucleatum*, la protéine PilB entière et différents variants présentant un ou deux domaines inactifs ont été surproduits dans *E. coli* sous forme soluble selon la même stratégie que celle utilisée précédemment pour les protéines de *N. meningitidis*. Les propriétés enzymatiques des différents variants protéiques ont ensuite été étudiées.

1. Etude de la protéine PilB entière de *N. meningitidis*

1.1. Production, purification de la protéine PilB entière et des variants Cys

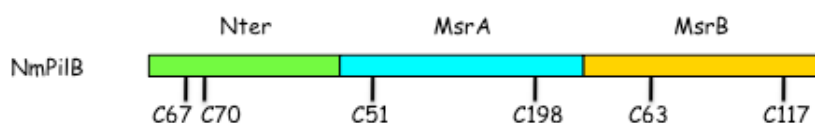


Figure 47 : Représentation schématique de la protéine PilB sauvage (NmPilB) de *N. meningitidis*. La numérotation utilisée pour les résidus Cys est celle des Cys des domaines isolés Nter, MsrA et MsrB de *N. meningitidis* (Figure 46 page 68). Les Cys 67, 51 et 117 correspondent aux Cys catalytiques des trois domaines et les Cys 70, 198 et 63 correspondent aux Cys de recyclage.

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

Pour exprimer la protéine PilB sous forme soluble dans *E. coli*, la partie du gène *pilB* codant le peptide signal (32 premiers résidus N-terminaux) a été délétée et le codon correspondant à la Met195 de réinitiation interne a été muté pour coder un résidu Ala. Pour simplifier les notations, la protéine obtenue à partir de cette construction correspond à la protéine NmPilB sauvage et les variants obtenus ci-après dérivent de cette construction. Par mutagenèse dirigée, des variants de NmPilB ont été obtenus correspondant à l'inactivation (la mutation des deux Cys conduit à un domaine n'ayant aucune activité enzymatique) d'un des trois domaines (deux résidus Cys mutés en Ser) ou à l'inactivation de deux des trois domaines (quatre résidus Cys mutés en Ser) (Figure 48). Le nom du variant reprend le (ou les) domaine(s) encore actif(s), par exemple le variant NmMsrAMsrBPilB correspond au variant PilB de *N. meningitidis* avec les domaines MsrA et MsrB actifs et le domaine Nter inactif.

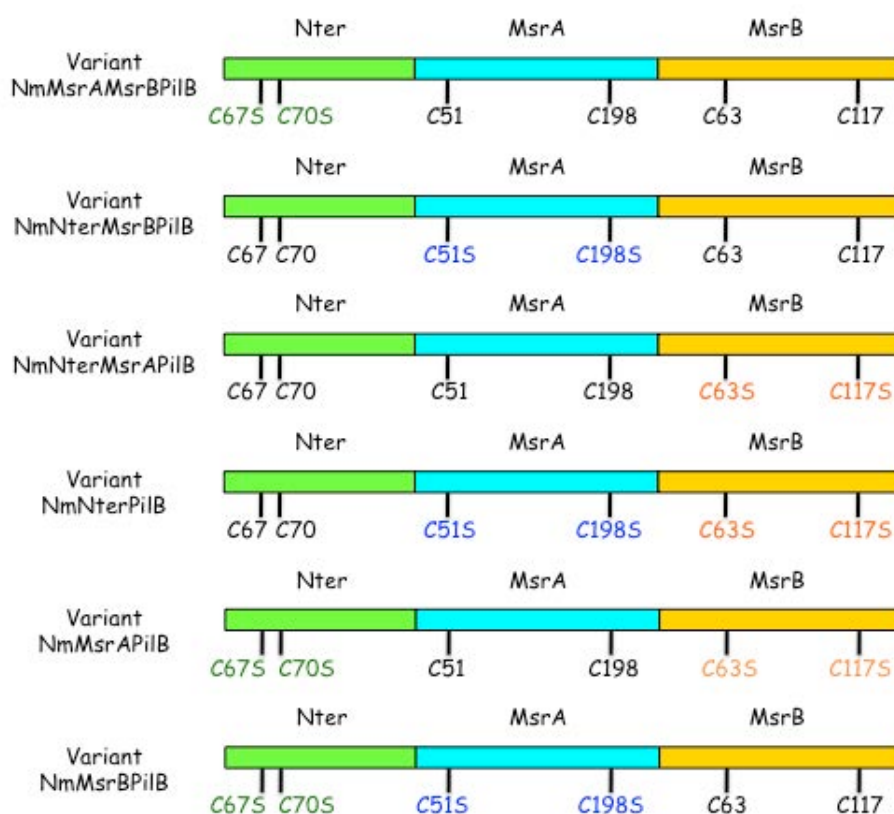


Figure 48 : Représentation schématique des différents variants PilB de *N. meningitidis* étudiés. Les mutations Cys en Ser sont indiquées en couleur. Le(s) domaine(s) encore actif(s) est(sont) indiqué(s) dans le nom des différents variants.

Les différentes constructions ont été obtenues avec le plasmide recombinant pSK195PilB (voir Matériels et Méthodes). Les différentes protéines ont été surproduites dans la souche d'*E. coli* C41(DE3). NmPilB et les différents variants ont été purifiés après sonication, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes, à savoir : 1) une précipitation à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium, 2) une chromatographie de filtration sur gel (ACA

54), 3) une chromatographie échangeuse d'anions ; et 4) une chromatographie par interactions hydrophobes. La pureté des protéines a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (LSMBO, Strasbourg, résultats non montrés). Les rendements de purification sont de l'ordre de 75 à 100 mg de protéine par litre de culture.

1.2. Le domaine Nter ne réduit efficacement que le domaine MsrB dans PilB

1.2.1 Détermination de la stœchiométrie de formation de méthionine

Tout d'abord, nous avons vérifié que le domaine Nter est capable de réduire les domaines MsrA et MsrB oxydés dans PilB. Pour cela, la stœchiométrie de formation de Met (moles de Met par mole de PilB) a été déterminée après 15 minutes d'incubation avec le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O. En parallèle, les thiols libres ont été titrés par le DTNB, afin de vérifier que la formation d'une mole de Met correspond bien à la formation d'un pont disulfure (disparition de deux thiols libres).

	Thiols libres titrés (mole de Cys / mole de PilB)			Stœchiométrie (mole de Met formée / mole de PilB)
	sans <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	avec <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	perte de thiols libres	
NmPilB	6,0	0,0	6,0	3,1
NmMsrAMsrBPilB	4,1	0,1	4,0	2,1
NmNterPilB	2,0	1,9	0,1	0,0
NmNterMsrBPilB	3,9	0,0	3,9	2,0
NmMsrBPilB	2,2	0,0	2,2	1,0
NmNterMsrAPilB	4,0	2,1	1,9	1,1
NmMsrAPilB	1,9	0,0	1,9	1,0

Tableau 5 : Titration des groupements thiols libres par le DTNB et stœchiométries de formation de la méthionine avec PilB et ses différents variants.

La quantité de Met formée par mole de PilB a été déterminée par chromatographie en phase inverse, après 15 minutes de réaction entre *D,L*-Met-*R,S*-O (100 mM) et PilB (100 et 200 µM). Les thiols libres ont été titrés en suivant par spectrophotométrie à 412 nm la libération de TNB⁻ en présence de 0,3 mM de DTNB en conditions dénaturantes (1 % SDS). La perte de thiols libre correspond à la différence entre le nombre de Cys dosées avant et après ajout de *D,L*-Met-*R,S*-O (voir Matériels et Méthodes).

Les résultats montrent que (Tableau 5) : 1) une mole de Met par mole de PilB est formée lorsque seul un domaine Msr est actif (variants NmMsrAPilB et NmMsrBPilB), alors qu'aucune mole de Met n'est formée lorsque les domaines Msr sont inactifs (NmNterPilB) ; et avec NmPilB trois moles de Met sont formées. Ceci montre que les domaines MsrA et MsrB réduisent bien la Met-O dans les conditions expérimentales utilisées et qu'au moins un des

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

domaines Msr est réduit par le domaine Nter, permettant la réduction d'une seconde Met par le (ou les) domaine(s) Msr réduit(s) ; et 2) deux moles de Met sont formées avec le variant NmNterMsrBPilB, alors qu'une seule mole est formée avec le variant NmNterMsrAPilB. Ceci montre donc que le domaine Nter ne réduit que le domaine MsrB oxydé dans ces conditions.

1.2.2. Vitesse de formation de méthionine avec le variant NmNterMsrBPilB

Nous avons ensuite quantifié au cours du temps la quantité de Met formée et le nombre de thiols libres restants pour le variant NmNterMsrBPilB en présence de substrat *D,L*-Met-*R,S*-O (condition de cycle catalytique unique ou « single turn over »). Pour cela, nous avons utilisé une technique de mélange rapide résolue en temps « quenched flow » : à différents temps d'incubation entre NmNterMsrBPilB et le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O, la réaction enzymatique est arrêtée par un ajout d'acide trifluoroacétique (TFA). Le mélange est ensuite récupéré et un dosage des thiols libres est effectué avec le 2-PDS. En parallèle, une quantification des Met formées est réalisée par chromatographie en phase inverse. Une stœchiométrie de 1,6 mole de Met par mole de NmNterMsrBPilB est observée, concomitante à la perte de quatre thiols libres (Figure 49).

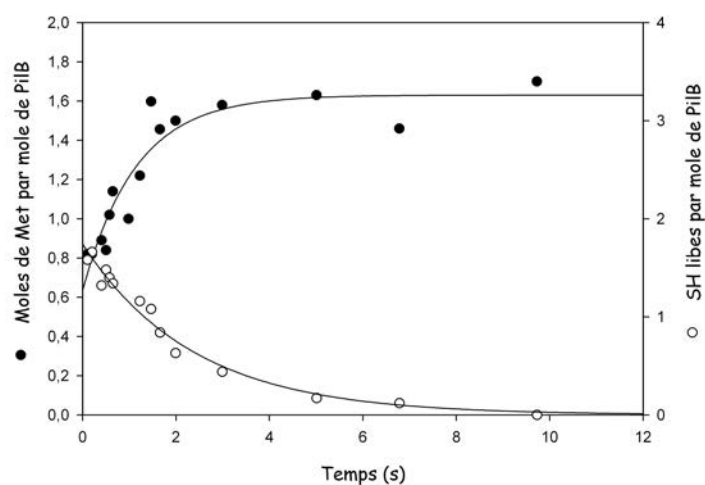


Figure 49 : Suivi de la formation de Met (•) et de la disparition des thiols libres (o) en fonction du temps avec le variant NmNterMsrBPilB (« quenched flow »).

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 150 μ M (concentration finale) de protéine dans la première seringue et 100 mM (concentration finale) de substrat *D,L*-Met-*R,S*-O dans la seconde seringue. La réaction est arrêtée par injection automatique de TFA à 2 % à différents temps. Une partie du mélange réactionnel permet de vérifier la concentration en protéines dans le mélange final, une autre sert à quantifier la Met formée et la dernière sert à titrer les thiols restant par le 2-PDS. L'ajustement des données expérimentales (traits continus) à l'équation d'une monoexponentielle croissante concernant la quantification de la Met formée : $y = y_0 + \text{Amp} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t})$ et à l'équation d'une monoexponentielle décroissante pour la titration des groupements thiols libres : $y = \text{Amp} \cdot e^{-k_{\text{obs}} t}$ conduit aux constantes de vitesse suivantes $k_{\text{obs}} = 0,88 \pm 0,23 \text{ s}^{-1}$ (Amp = $1,00 \pm 0,11$ et $y_0 = 0,64 \pm 0,10$) pour la formation de la Met et $k_{\text{obs}} = 0,42 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ (Amp = $1,74 \pm 0,05$) pour la disparition des thiols.

La vitesse de formation de la première Met et celle de disparition des deux premiers thiols correspondants, sont trop rapides pour que la vitesse puisse être mesurée par cette méthode. Cette étape correspond à l'oxydation du domaine MsrB ($k_{\text{obsmax}} = 49 \text{ s}^{-1}$, Neiers *et al.*, 2007). L'ajustement des points expérimentaux à l'équation d'une monoexponentielle croissante (équation 2) pour la formation de Met et à une monoexponentielle décroissante (équation 3) pour la disparition des thiols libres permet d'obtenir des constantes de vitesses respectives de $0,88 \text{ s}^{-1}$ et $0,42 \text{ s}^{-1}$ correspondant à la vitesse de formation de la seconde Met et à la disparition de 1,7 thiols libres par mole de NmNterMsrBPilB.

Ce résultat montre que la vitesse de réduction de la Met-O par le domaine MsrB dans PilB est très rapide ($\geq 10 \text{ s}^{-1}$ à 100 mM *D,L*-Met-*R,S*-O), et probablement aussi rapide que celle du domaine MsrB isolé (Olry *et al.*, 2004), et que la constante de vitesse de réduction de la seconde molécule de Met-O est plus lente ($k_{\text{obs}} \approx 1 \text{ s}^{-1}$ à 100 mM de *D,L*-Met-*R,S*-O). La vitesse de formation de la seconde molécule de Met, qui est plus lente, implique au moins deux étapes : la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter par un échange de pont disulfure, suivie par la réduction d'une nouvelle molécule de Met-O par le domaine MsrB réduit. Comme la vitesse de l'activité réductase du domaine MsrB est rapide dans PilB, l'étape cinétiquement limitante doit être associée à la vitesse de réduction du domaine MsrB par le domaine Nter.

1.3. Les deux domaines Msr fonctionnent indépendamment dans PilB

Afin de montrer que les étapes réductases des domaines MsrA et MsrB dans NmPilB fonctionnent indépendamment, la vitesse de réduction du substrat *Ac-L*-Met-*R,S*-O-NHMe en absence de réducteur a été déterminée. Pour cela, nous avons utilisé la même approche que celle décrite pour l'étude des domaines MsrA et MsrB isolés (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004) : nous avons suivi la variation d'intensité d'émission de fluorescence de chacun des domaines lorsqu'ils passent de leur forme réduite à leur forme oxydée. Le substrat utilisé a été l'*Ac-L*-Met-*R,S*-O-NHMe car les Msr présentent une meilleure affinité pour ce substrat, mimant une Met-O incluse dans une chaîne peptidique, comparée à celle pour la Met-O.

1.3.1. Caractérisation des propriétés de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés dans PilB

Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier si les variations d'intensité de fluorescence entre les formes réduites et oxydées étaient les mêmes dans le contexte PilB que celles observées sur les trois domaines isolés. Pour cela, les spectres d'émission de fluorescence des variants PilB réduits et oxydés avec un seul domaine encore actif (NmNterPilB, NmMsrAPilB et NmMsrBPilB) ont été enregistrés. Les spectres d'émission

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

obtenus, à la longueur d'onde d'excitation de 293 nm, montrent que les variations d'intensité de fluorescence, correspondant au passage de la forme réduite à la forme oxydée, sont conservées pour les domaines Nter et MsrA (Figure 50) : une diminution de 60 % est observée pour le domaine Nter et une augmentation de 2 % pour le domaine MsrA. Comme pour les domaines isolés, ces variations sont dues essentiellement à la présence de résidus tryptophanes localisés dans les sites actifs des domaines Nter (Trp66) et MsrA (Trp53). Par contre, on observe une inversion de la variation d'intensité d'émission de fluorescence pour le domaine MsrB, avec une augmentation de 20 %. Cette variation doit être essentiellement due à la modification de l'environnement du résidu Trp65 localisé au niveau du site actif du domaine MsrB, par rapport au domaine MsrB isolé. Cette observation suggère que le contexte tridimensionnel de la protéine PilB a une influence sur l'environnement de ce résidu Trp65 du domaine MsrB, et que les trois domaines ne sont peut-être pas complètement indépendants dans PilB.

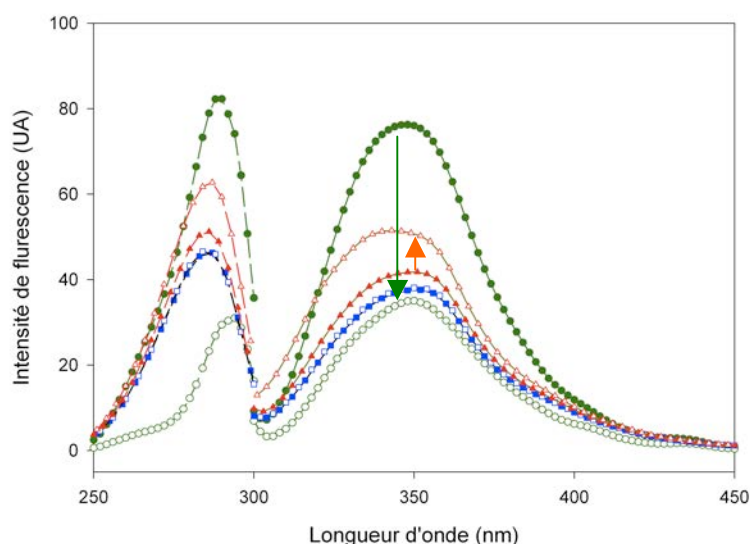


Figure 50 : Spectres de fluorescence des différents variants de PilB de *N. meningitidis* sous forme réduite et oxydée.

Les spectres d'excitation (émission suivie à 340 nm) et d'émission (excitation à 293 nm) ont été enregistrés avec 10 μ M de protéines à 25 °C en tampon TE pH 8,0. Les variations de fluorescence entre les domaines réduits (formes pleines) et oxydés (formes vides) sont représentées par des flèches (NmNterPilB : verte ; NmMsrAPilB : la variation est trop faible pour être indiquée ; NmMsrBPilB : orange).

1.3.2. Vitesses de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 MsrA et Cys63-Cys117 MsrB dans PilB

La vitesse de l'étape réductase est étudiée en « single turn over » par suivi en spectroscopie de fluorescence en flux interrompu (« stopped flow ») de l'augmentation d'intensité d'émission de fluorescence du Trp53 ou du Trp65 correspondant à la formation d'un pont disulfure respectivement au niveau du domaine MsrA ou MsrB.

1.3.2.a. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrA pour le variant NmMsrAPilB

La vitesse de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 a été déterminée en suivant le passage du domaine MsrA de sa forme réduite à sa forme pont disulfure, qui se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission fluorescence, en présence de différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (Figure 51).

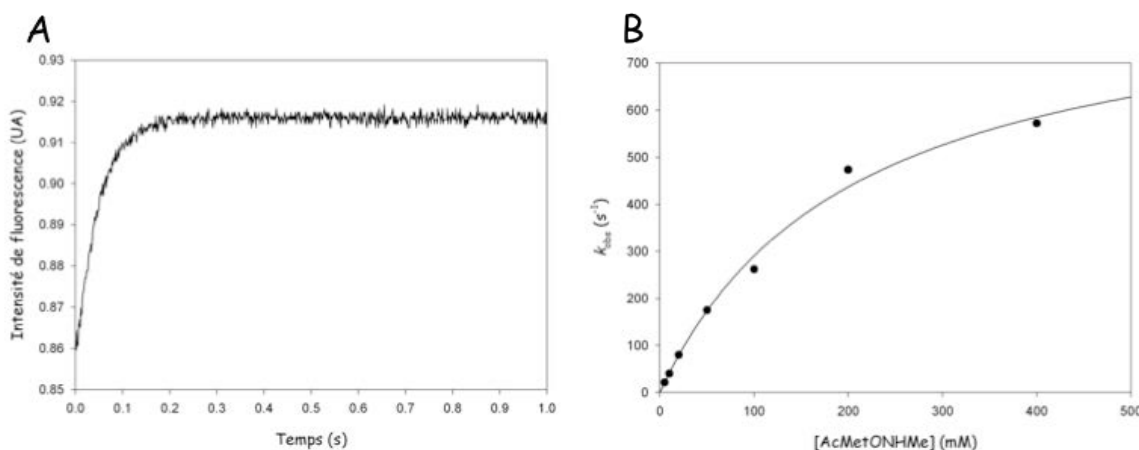


Figure 51 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrA dans la protéine NmMsrAPilB par suivi de la fluorescence en « single turn-over ».

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M de protéine et des concentrations variables en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe, à une longueur d'onde d'excitation de 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm. L'ajustement du signal pour 5 mM de substrat (A) à l'équation d'une monoexponentielle croissante conduit à une constante de vitesse observée de 21 s⁻¹ pour NmMsrAPilB. L'ajustement des constantes k_{obs} en fonction de la concentration en substrat (B) à l'équation 4 conduit aux paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax} = 885 \pm 80$ s⁻¹ et $K_S = 205 \pm 37$ mM.

Une augmentation rapide de l'émission de fluorescence est observée pour chaque concentration en substrat utilisée. Chaque courbe a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle croissante. L'ajustement des constantes de vitesse k_{obs} en fonction de la concentration en substrat conduit aux valeurs de k_{obsmax} et de K_S respectivement de 885 s⁻¹ et de 205 mM (Figure 51).

Le fait que les valeurs des paramètres cinétiques obtenues soient les mêmes que celles obtenues avec le domaine isolé NmMsrA montre que le contexte PilB n'affecte pas l'étape réductase du domaine MsrA (Tableau 6 page 79).

1.3.2.b. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrB pour le variant NmMsrBPilB

La vitesse de formation du pont disulfure Cys63-Cys117 MsrB a été déterminée en suivant le passage du domaine MsrB de sa forme réduite à sa forme pont disulfure, qui se

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

traduit par une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence, à différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (Figure 52).

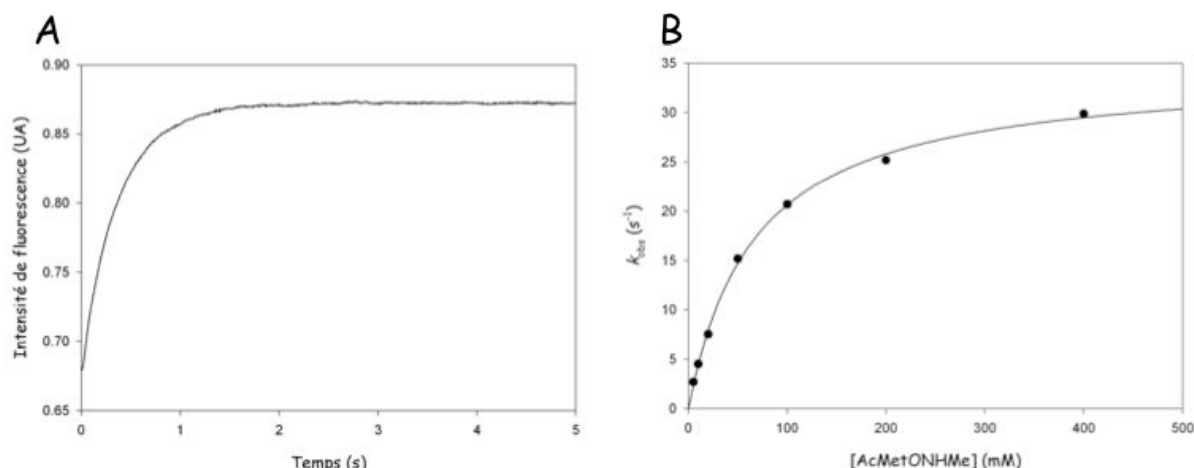


Figure 52 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrB dans la protéine NmMsrBPilB par suivi de la fluorescence en « single turn-over ».

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M de protéine et des concentrations variables en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe à une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm. L'ajustement du signal pour 20 mM (A) en substrat à l'équation d'une monoexponentielle croissante conduit à une constante de vitesse observée de 2,7 s⁻¹. L'ajustement des constantes k_{obs} en fonction de la concentration en substrat (B) à l'équation 4 conduit aux paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax} = 34,4 \pm 0,6$ s⁻¹ et $K_S = 67 \pm 4$ mM.

Une augmentation rapide de l'émission de fluorescence est observée pour chaque concentration en substrat utilisée et chaque courbe a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle croissante. L'ajustement des constantes de vitesse k_{obs} en fonction de la concentration en substrat conduit aux valeurs de k_{obsmax} et de K_S respectivement de 34,4 s⁻¹ et de 67 mM (Figure 52).

Le fait que les valeurs des paramètres cinétiques obtenues soient les mêmes que celles obtenues avec le domaine isolé NmMsrB montre que le contexte PilB n'affecte pas l'étape réductase du domaine MsrB (Tableau 6).

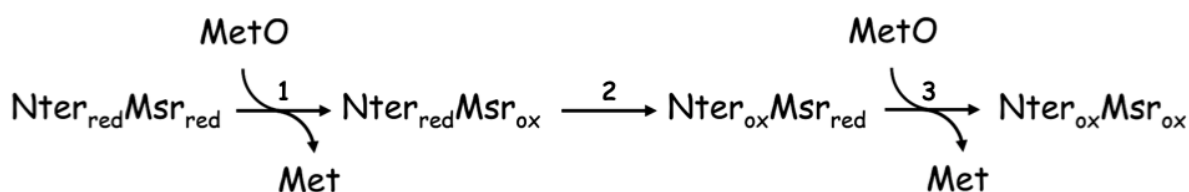
		$k_{\text{obsmax}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_S \text{ (mM)}$
MsrB	NmMsrB isolé ^a	49 ± 1	105 ± 5
	NmMsrBPilB	34 ± 1	67 ± 4
	NmNterMsrBPilB	57 ± 2	110 ± 6
MsrA	NmMsrA isolé ^b	790 ± 10	55 ± 2
	NmMsrAPilB	885 ± 80	205 ± 37

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines Msr isolés ou inclus dans les variants PilB de *N. meningitidis*. Les paramètres cinétiques de l'étape réductase ont été déterminés en tampon TE pH 8,0 en conditions de « single turn over » par fluorescence (Matériels et Méthodes). Les points expérimentaux ont été ajustés à l'équation 4. Les paramètres cinétiques du variant NmNterMsrBPilB sont décrits dans le paragraphe 1.4. ^a Neiers *et al.*, 2007 et ^b Antoine *et al.*, 2006.

1.4. La réduction du domaine MsrB dans PilB suit un mécanisme de type intramoléculaire

1.4.1. Vitesse de réduction du domaine MsrB oxydé sous forme pont disulfure de NmNterMsrBPilB par le domaine Nter de NmNterMsrBPilB

La vitesse de l'oxydation du variant NmNterMsrBPilB a été déterminée en suivant les messages associés aux passages du domaine MsrB ou du domaine Nter de leur forme réduite à leur forme pont disulfure (ou inversement), à différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe par « stopped flow ». La réaction globale d'oxydation d'un variant NterMsrPilB peut être schématisée comme suit :



Le suivi cinétique de la réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe par le variant NmNterMsrBPilB montre deux variations de fluorescence successives (Figure 53) : une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence rapide, devant correspondre à l'oxydation du domaine MsrB (1), suivie d'une diminution du message de fluorescence avec une vitesse plus lente, pouvant correspondre à l'oxydation du domaine Nter concomitante à la réduction du domaine MsrB (2) et à la réoxydation rapide du domaine MsrB (3).

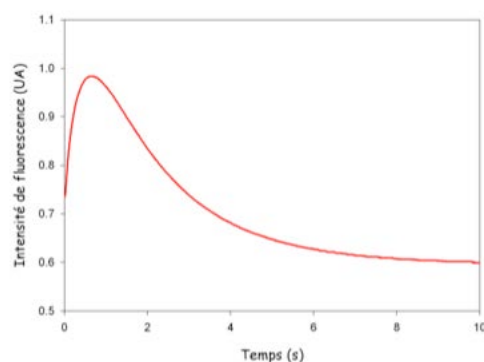


Figure 53 : Suivi par fluorescence de la réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe par le variant NmNterMsrBPilB en single turn over.

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M de protéine et 5 mM de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe à une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm.

Ce signal correspond à l'oxydation « totale » du variant NmNterMsrBPilB en présence de substrat, puisque les résultats obtenus par la méthode de « quenched flow » ont mis en évidence la formation de deux molécules de Met après 5 s de réaction. L'ajustement des données à un modèle cinétique à deux étapes ($A \rightarrow B \rightarrow C$), à l'aide du logiciel Pro-Kinetics, conduit à deux constantes de vitesse (k_{obs}) pour chaque concentration en substrat (Figure 54).

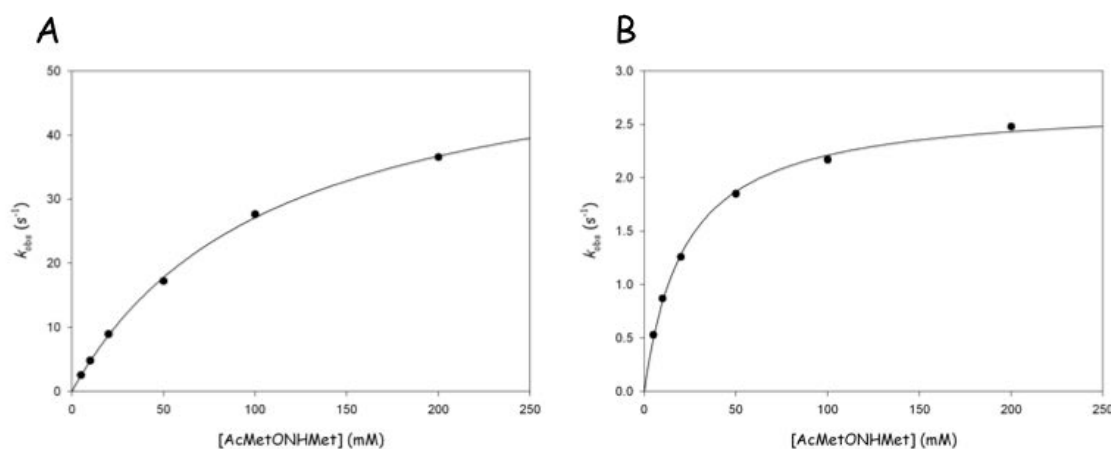


Figure 54 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrB pour le variant NmNterMsrBPilB (A) et de l'étape de réduction du domaine MsrB oxydé par le domaine Nter (B).

L'ajustement des points expérimentaux à l'équation 4 donne les paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax1} = 65,9 \pm 1,6 \text{ s}^{-1}$ et $K_{S1} = 110 \pm 6 \text{ mM}$ et $k_{obsmax2} = 2,7 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ et $K_{S2} = 22 \pm 1 \text{ mM}$.

Les valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour la 1^{ère} étape (étape réductase) sont du même ordre que celles observées pour le domaine MsrB isolé : $k_{obs} = 49 \text{ s}^{-1}$ et $K_S = 105 \text{ mM}$ (Tableau 6 page 79). Ce résultat confirme que le premier message de fluorescence (augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence) correspond bien à l'étape réductase du domaine MsrB du variant NmNterMsrBPilB. Pour la seconde étape, la valeur du k_{obsmax} de $2,7 \text{ s}^{-1}$ est similaire à celle de la constante k_{obs} (1 s^{-1} à 100 mM en Met-O) obtenue par la

méthode de « quenched flow » (paragraphe 1.2.2), ce qui confirme que l'étape cinétiquement limitante de la réaction est associée à la réduction du domaine MsrB oxydé par le domaine Nter.

1.4.2. La réduction du domaine MsrB dans PilB est un mécanisme intramoléculaire

Pour savoir si la réduction du domaine MsrB dans PilB est de type intra ou intermoléculaire, nous avons déterminé la vitesse de réduction du variant NmMsrB_{ox}PilB par le variant NmNterPilB en conditions intermoléculaires et dans des conditions expérimentales où la concentration de chaque variant PilB était de 5 μ M, c'est-à-dire identiques à celles utilisées dans le paragraphe 1.4.1. Pour cela, les variants NmMsr_{ox}PilB et NmNterPilB ont été mélangés en quantités stœchiométriques, dans des conditions équivalentes à celles utilisées pour l'étude par fluorescence du variant NmNterMsrBPilB (5 μ M de chaque partenaire) ; et nous avons suivi les variations d'émission de fluorescence dues au passage du domaine MsrB de sa forme oxydée à réduite, ainsi qu'au passage du domaine Nter de sa forme réduite à oxydée (Figure 55).

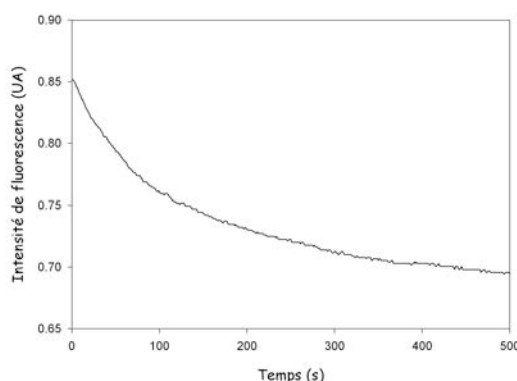


Figure 55 : Suivi par fluorescence de la vitesse de réduction du domaine MsrB oxydé du variant NmMsrB_{ox}PilB par le domaine Nter du variant NmNterPilB en quantités stœchiométriques en « single turn over ».

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M du variant NmMsrB_{ox}PilB et 5 μ M du variant NmNterPilB. L'ajustement des données expérimentales à l'équation d'une mono exponentielle décroissante (équation 3) donne un k_{obs} de $0,010 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$.

Comme attendu, nous observons bien une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence qui correspond à l'oxydation du domaine NmNterPilB, mais sur des temps longs de 500 secondes avec un k_{obs} d'environ 10^{-2} s^{-1} . Cette vitesse est au moins 200 fois plus faible que celle observée avec NmNterMsrBPilB. Ce résultat montre que la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter dans PilB se fait selon un mécanisme intramoléculaire dans les conditions expérimentales utilisées.

1.5. Conclusions

L'étude de la protéine NmPilB entière montre que : 1) les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines NmMsrPilB sont du même ordre que ceux déterminés sur les domaines NmMsr isolés, 2) les propriétés de fluorescence des trois domaines ne sont pas toutes conservées entre domaines isolés et domaines dans le contexte NmPilB ; et 3) le domaine NmNterPilB conserve une spécificité de réduction pour le domaine NmMsrB dans le contexte PilB. Reste posée la question de la nature du mécanisme (intra- ou inter-moléculaire) de réduction du domaine MsrB par le domaine Nter. Si on compare la valeur des constantes de vitesse mesurées avec NmNterMsrBPilB (k_{obs} de 1 s^{-1} à 100 mM Met-O , et k_{obsmax} de $2,7 \text{ s}^{-1}$ à saturation en $\text{Ac-L-Met-R,S-O-NHMe}$) à celle de la constante de vitesse de réduction de NmMsrBPilB par NmNterPilB obtenue dans des conditions équivalentes de concentrations en protéines ($k_{\text{obs}} \approx 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), on peut en conclure que la réaction de réduction du domaine MsrB procède par un mécanisme intramoléculaire dans NmPilB dans les conditions expérimentales utilisées.

2. Etude des propriétés biochimiques et enzymatiques des domaines isolés de PilB de *F. nucleatum*

2.1. Clonage de l'ORF *pilB* et stratégie de construction des plasmides en vue de produire les trois domaines séparément

Afin d'étudier les propriétés biochimiques et enzymatiques des trois domaines de la protéine PilB de *F. nucleatum*, et ceci dans le but de montrer la généralité des résultats obtenus avec PilB de *N. meningitidis*, nous avons tout d'abord cloné l'ORF entière de *pilB* à partir du génome de la souche ATCC 25586 de *F. nucleatum* (Pr H. Jensen, Institut de Biologie Moléculaire de Bergen, Norvège) dans le plasmide pET24c par la technique de PCR. Nous avons ensuite sous cloné les séquences codantes correspondantes aux trois domaines séparément dans un vecteur d'expression pET24c. Le choix des extrémités 3' et 5' des fragments d'ADN à sous cloner est basée d'une part sur l'alignement de la séquence de PilB de *F. nucleatum* avec celle de PilB de *N. meningitidis* (Figure 46 page 68), et d'autre part sur les constructions réalisées précédemment par notre équipe pour produire sous forme soluble les trois domaines de PilB de *N. meningitidis*.

Ainsi, trois constructions plasmidiques ont été réalisées afin de produire les trois domaines de PilB de *F. nucleatum* (Figure 56) : 1) un domaine N-terminal (FnNter) correspondant aux résidus 33 à 175 de la protéine PilB (Figure 46 page 68). L'absence des 32 premiers résidus, correspondant au peptide signal, devait permettre d'obtenir une protéine soluble, comme c'est le cas pour le domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis*, 2) un

domaine MsrA (FnMsrA) correspondant aux résidus 190 à 362 de la protéine PilB ; et 3) un domaine MsrB (FnMsrB) correspondant aux résidus 363 à 521 (extrémité C-terminale) de la protéine PilB.

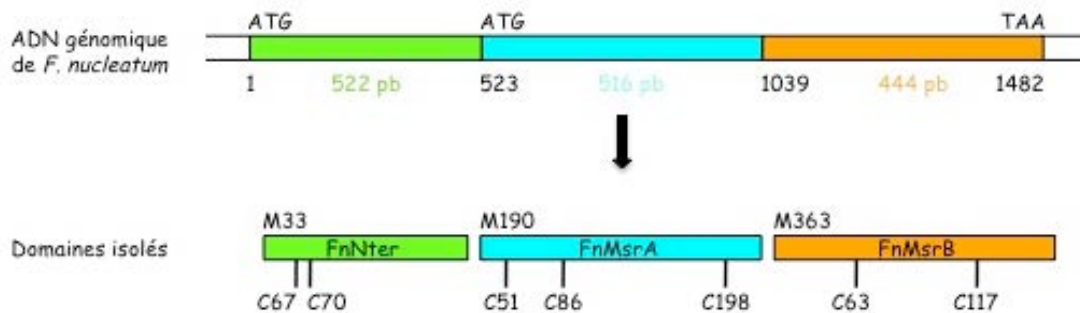


Figure 56 : Représentation de l'ORF *pilB* de *F. nucleatum* et des domaines protéiques produits.

Les codons d'initiation et de terminaison de la traduction sont respectivement ATG et TAA. Pour les protéines, la numérotation des résidus utilisée et indiquée au dessus des domaines est basée sur celle de *N. meningitidis* (voir Figure 46 page 68), la numérotation des résidus Cys correspond à celle des domaines isolés NmNter, NmMsrA et NmMsrB.

2.2. Production et purification des trois domaines isolés de la protéine PilB de *F. nucleatum*

Nous avons pu produire les trois domaines isolés dans la souche C41(DE3) d'*E. coli* en quantité suffisante pour notre étude (Figure 57). Ces trois protéines (FnNter, FnMsrA et FnMsrB) ont pour masses théoriques respectives 16 276, 19 900 et 16 880 Da.

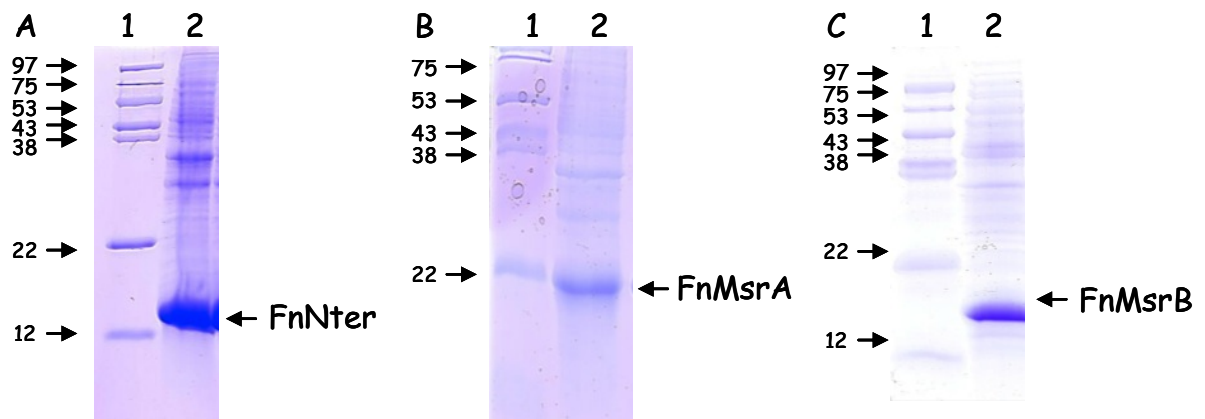


Figure 57 : Analyse par SDS-PAGE à 12,5 % des productions des protéines FnNter (A), FnMsrA (B) et FnMsrB (C).

1. Marqueur de taille ; 2. Extrait cellulaire brut. Les productions ont été réalisées dans des cellules C41(DE3) d'*E. coli* en milieu LB en présence de 50 mg/l de Kanamycine. L'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG à 1 mM à $DO_{600nm} = 0,6$, puis les cultures sont laissées sous agitation à 37 °C pendant 18 h.

Le domaine FnMsrB n'étant pas soluble après l'étape de sonication, nous l'avons donc resolubilisé à partir du culot de sonication en présence d'urée, puis l'urée a progressivement été éliminée par des dialyses successives contre du tampon TE pH 8,0 contenant des concentrations décroissantes d'urée (de 6 M à 0 M). Ensuite, la stratégie de purification des

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

domaines FnMsrA, FnMsrB et FnNter a été basée sur celle mise au point pour purifier les domaines de PilB de *N. meningitidis* (Wu *et al.*, 2005 ; Olry *et al.*, 2002), à savoir : 1) une précipitation à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium, 2) une chromatographie de filtration sur gel (ACA54), 3) une chromatographie échangeuse d'anions ; et 4) une chromatographie par interactions hydrophobes. La pureté des protéines a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (résultats non montrés, collaboration LSMBO-Strasbourg).

2.3. Réduction du substrat Met-O par les domaines FnMsrA et FnMsrB en absence de réducteur

Nous avons vérifié que les domaines FnMsr sont capables de réduire la Met-O. Pour cela, la stœchiométrie de formation de Met par mole de FnMsr a été déterminée après 15 minutes d'incubation avec le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O. En parallèle, le nombre de thiols libres a été titré par le DTNB, afin de vérifier que la formation d'une mole de Met correspondait bien à la formation d'un pont disulfure (disparition de deux thiols libres).

La quantification de Met formée montre que les domaines FnMsrA et FnMsrB présentent bien une activité Msr, puisqu'une mole de Met est formée par mole d'enzyme avec la formation d'un pont disulfure (disparition de deux SH par mole d'enzyme) après 15 minutes de réaction (Tableau 7). De plus, la quantification de Met formée en présence d'un excès de Met-O et de quantités équimolaires de domaine FnNter et de domaine FnMsr (A ou B), montre la libération de 2 moles de Met par mole de FnMsr, indiquant que le domaine FnNter présente bien une activité réductase vis-à-vis des domaines FnMsr dans les conditions utilisées.

	Thiols libres titrés (mole de Cys / mole d'enzyme)			Stœchiométrie (mole de Met formée / mole d'enzyme)
	sans <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	avec <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	perte de thiols libres	
FnMsrA	3,0	1,0	2,0	1,1
FnMsrB	1,9	0,0	1,9	1,1
FnNter + FnMsrA	-	-	-	2,0
FnNter + FnMsrB	-	-	-	2,1

Tableau 7 : Stœchiométries de formation de Met par mole d'enzyme et contenu en thiols libres.

La quantité de Met formée par mole d'enzyme a été déterminée par chromatographie en phase inverse, après 15 minutes de réaction entre le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O (100 mM) et l'enzyme (100 et 200 μ M). Les thiols libres ont été titrés en suivant par spectrophotométrie à 412 nm la libération de TNB⁻ en conditions dénaturantes (1 % SDS). La perte de thiols libres correspond à la différence entre le nombre de Cys dosées avant et après ajout de *D,L*-Met-*R,S*-O (voir Matériels et Méthodes).

2.4. Caractérisation enzymatique des trois domaines

2.4.1. Paramètres cinétiques à l'état stationnaire des trois domaines

Les paramètres cinétiques à l'état stationnaire des domaines FnMsrA et FnMsrB ont été déterminés en présence de Trx1 comme réducteur, et du système thiorédoxine réductase / NADPH d'*E. coli* en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm, suite à l'oxydation du NADPH. Ce système avait été utilisé pour déterminer les paramètres cinétiques à l'état stationnaire des domaines NmMsrA et NmMsrB. Des études précédentes ayant montré que les Msr présentent une meilleure affinité pour l'Ac-L-Met-R,S-O-NHMe que pour la Met-O, les cinétiques ont donc été réalisées avec l'Ac-L-Met-R,S-O-NHMe comme substrat. Les résultats obtenus à l'état stationnaire montrent que les constantes k_{cat} , $K_{M(Trx1)}$ et $K_{M(AcMetSONHMe)}$ ne sont pas significativement modifiées par rapport à celles des domaines MsrA et MsrB de *N. meningitidis* (Tableau 8).

	$K_{M(Trx1)}$ (μ M)	$K_{M(AcMetSONHMe)}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})
FnMsrA	34 ± 6	$0,5 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,2$
NmMsrA	75 ± 15	$0,6 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$
FnMsrB	22 ± 2	$6,3 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,1$
NmMsrB	58 ± 12	$1,2 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$

Tableau 8 : Paramètres cinétiques déterminés à l'état stationnaire des domaines FnMsrA / NmMsrA et FnMsrB / NmMsrB.

Les activités ont été mesurées à l'état stationnaire en tampon TE pH 8,0. Le mélange réactionnel est composé d'Ac-L-Met-R,S-O-NHMe en concentration variable, de la Trx1 d'*E. coli* en concentration variable, de la Trx réductase d'*E. coli* (1,2 μ M), NADPH (0,3 mM) et les domaines MsrA ou MsrB (0,2 ou 0,5 μ M). Les données expérimentales ont été ajustées par régression non linéaire à l'équation de Michaelis-Menten (équation 1). Les valeurs pour NmMsrA et NmMsrB sont celles rapportées dans Boschi-Muller *et al.*, 2005.

2.4.2. Propriétés de fluorescence des trois domaines isolés de *F. nucleatum*

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines FnMsr et la cinétique de réduction des domaines FnMsr oxydés par le domaine FnNter, la variation de l'intensité d'émission de fluorescence du domaine FnNter lors de son passage de la forme réduite à la forme oxydée pont disulfure a été utilisée, comme ce qui a été utilisé de façon similaire aux domaines isolés de *N. meningitidis*.

Pour cela, il était nécessaire au préalable de caractériser les propriétés de fluorescence des trois domaines. Les trois domaines présentent des variations de fluorescence lors de leur passage de la forme réduite à la forme oxydée (Figure 58). Ceci est probablement dû à la présence d'un résidu tryptophane dans chacun des trois sites actifs (Trp66 pour le domaine

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

Nter, Trp53 pour le domaine MsrA et Trp65 pour le domaine MsrB), comme pour les domaines de PilB de *N. meningitidis* (Figure 46 page 68). Les spectres de fluorescence obtenus pour le domaine FnMsrA présentent un profil similaire à celui du domaine MsrA de PilB de *N. meningitidis*, avec une longueur maximale d'excitation centrée à 284 nm et une longueur maximale d'émission centrée à 340 nm. Le passage de la forme réduite à oxydée se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence d'environ 40 %. Les spectres obtenus pour le domaine FnMsrB montrent une longueur maximale d'excitation centrée à 284 nm et une longueur maximale d'émission centrée à 305 nm et à 342 nm (pour la forme oxydée). Le passage de la forme réduite à oxydée se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence d'environ 20 % entre l'enzyme sous forme réduite et oxydée, c'est-à-dire une variation inversée par rapport à celle du domaine MsrB de *N. meningitidis*. Enfin, le spectre obtenu pour le domaine FnNter présente un profil identique à celui du domaine Nter de *N. meningitidis*, à savoir une importante diminution de l'intensité d'émission de fluorescence entre la forme réduite et la forme oxydée d'environ 70 %.

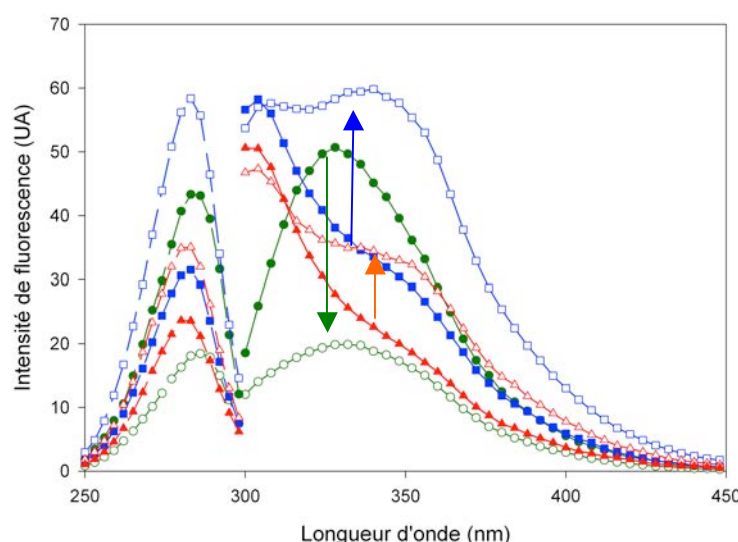


Figure 58 : Spectres de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés isolés de PilB de *F. nucleatum*.

Les spectres d'excitation (émission suivie à 340 nm) et d'émission (excitation à 293 nm) ont été enregistrés avec 10 μ M de protéines à 25°C en tampon TE pH 8,0. Les variations de fluorescence entre les domaines réduits (formes pleines) et oxydés (formes vides) sont représentées par des flèches (FnNter : verte ; FnMsrA : bleue ; FnMsrB : orange).

2.4.3. Etape réductase des domaines FnMsr

Les vitesses de formation des ponts disulfures Cys51-Cys198 MsrA et Cys63-Cys117 MsrB ont été déterminées en suivant le passage des domaines Msr de leur forme réduite à leur forme pont disulfure, qui se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission fluorescence, en présence de différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe.

Une augmentation rapide de l'émission de fluorescence est observée pour chaque concentration en substrat utilisée pour les deux domaines FnMsrA et FnMsrB. Chaque courbe a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle croissante (résultats non montrés). La représentation des valeurs k_{obs} en fonction de la concentration en substrat donne par ajustement à l'équation 4 les valeurs de k_{obsmax} et de K_S , respectivement de 520 s^{-1} et de 70 mM pour FnMsrA, et de $2,7\text{ s}^{-1}$ et de 32 mM pour FnMsrB (Figure 59).

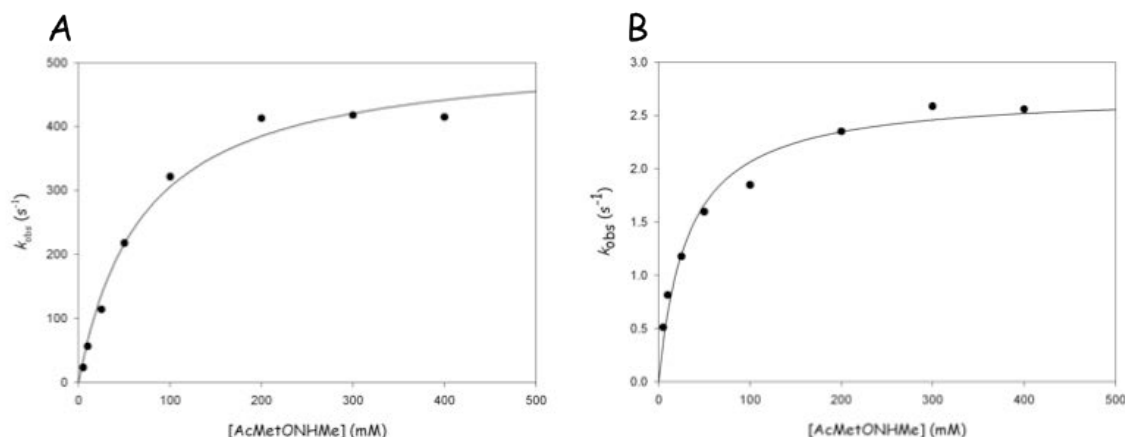


Figure 59 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine FnMsrA (A) et du domaine FnMsrB (B) en « single turn over » (« stopped flow »).

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence des domaines FnMsr ($10\text{ }\mu\text{M}$), en présence d'Ac-L-Met-R,S-O-NHMe, qui passe de la forme réduite à la forme pont disulfure, à l'état pré-stationnaire avec un appareil de cinétique rapide (« stopped flow »). Les mesures sont réalisées à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans du tampon TE pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 293 nm et seules les longueurs d'ondes d'émission supérieures à 320 nm sont collectées grâce à un filtre. Les valeurs de k_{obs} pour chaque concentration en substrat sont déterminées par ajustement à l'équation d'une monoexponentielle croissante (équation 2). L'ajustement (traits pleins) des points expérimentaux (points noirs) à l'équation 4 conduit aux paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax} = 520 \pm 33\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 70 \pm 13\text{ mM}$ pour FnMsrA et $k_{obsmax} = 2,7 \pm 0,1\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 32 \pm 5\text{ mM}$ pour FnMsrB.

La comparaison des valeurs des paramètres cinétiques avec celles des paramètres obtenus sur les domaines isolés NmMsrA et NmMsrB montre que : 1) celles du domaine MsrA sont semblables entre les deux MsrA ($k_{obsmax} = 520\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 70\text{ mM}$ pour FnMsrA et $k_{obsmax} = 790\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 55\text{ mM}$ pour NmMsrA) ; et 2) la constante de vitesse observée maximale de FnMsrB est 20 fois inférieure à celle de NmMsrB, alors que la constante d'affinité apparente pour l' Ac-L-Met-R,S-O-NHMe est du même ordre de grandeur entre les deux enzymes ($k_{obsmax} = 2,7\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 32\text{ mM}$ pour FnMsrB et $k_{obsmax} = 49\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 105\text{ mM}$ pour NmMsrB).

2.4.4. Réduction des domaines FnMsr par le domaine FnNter

Les vitesses de réduction des variants FnMsrA et FnMsrB oxydés par le domaine FnNter en concentration variable ont été déterminées en suivant la variation du message de fluorescence correspondant au passage du domaine Nter de sa forme réduite à sa forme oxydée.

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

Dans les deux cas, nous avons observé une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence (résultats non montrés). En effet, la réduction des domaines FnMsrA et FnMsrB se traduit par une diminution d'intensité tout comme l'oxydation du domaine FnNter. Ces deux signaux vont donc s'additionner et en conséquence une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence sera bien observée. Chaque courbe, correspondant à une concentration en FnNter, a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle décroissante. L'ajustement des valeurs expérimentales à l'équation 6 conduit aux valeurs de k_f et de K_S respectivement de $8,2 \text{ s}^{-1}$ et de $0,3 \text{ mM}$ pour FnMsrA, et de $0,7 \text{ s}^{-1}$ et de 1 mM pour FnMsrB (Figure 60).

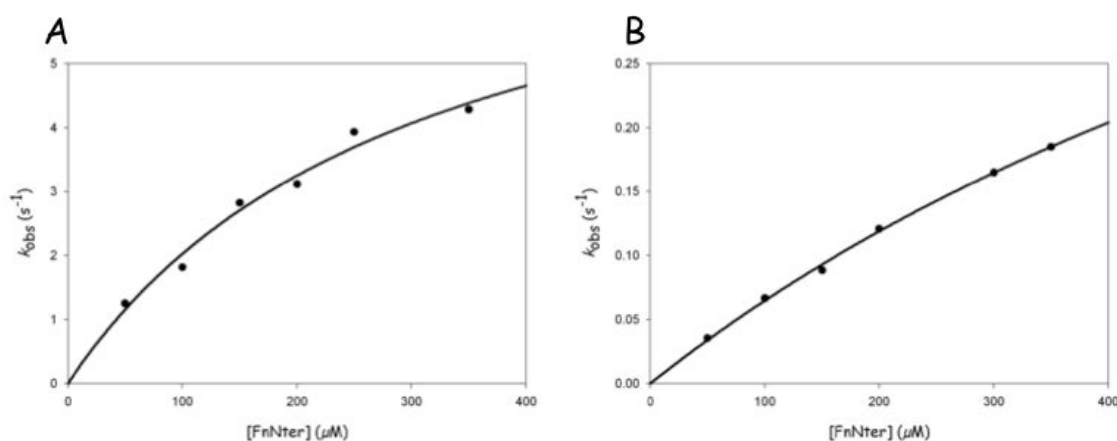
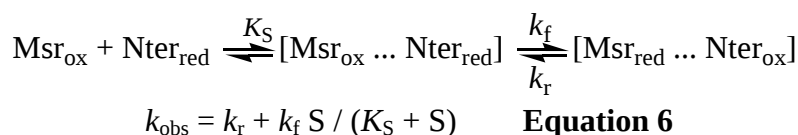


Figure 60 : Variation de la constante de vitesse observée k_{obs} lors de la réduction des domaines FnMsrA (A) et FnMsrB (B) par le domaine FnNter en « single turn over » (« stopped flow »).

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence du domaine FnNter qui passe de la forme réduite à la forme pont disulfure, à l'état pré stationnaire avec un appareil de cinétique rapide. Les mesures sont réalisées à 25°C dans du tampon TE pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 293 nm et seules les longueurs d'ondes d'émission supérieures à 320 nm sont collectées grâce à un filtre. Le mélange comporte : A) FnNter (de 50 à 350 μM) et domaine FnMsrA (10 μM) et B) FnNter (de 50 à 350 μM) et domaine FnMsrB (10 μM). Les k_{obs} pour chaque concentration en FnNter sont déterminés par ajustement à l'équation d'une monoexponentielle décroissante. L'ajustement (traits pleins) des points expérimentaux (points noirs) à l'équation 6 nous permet d'obtenir les paramètres cinétiques reportés dans le tableau 9 page 89.

Le K_S représente la constante apparente d'affinité pour le domaine Nter et k_r et k_f représentent respectivement les constantes de vitesse d'échange de pont disulfure dans le sens réduction et oxydation du domaine Nter.



L'équation a été utilisée en considérant que la cinétique de fixation du domaine Nter réduit sur les domaines Msr oxydés était en équilibre rapide. Dans tous les cas, les ajustements des résultats à l'équation montre que la constante k_r est proche de zéro, indiquant qu'en

première approximation, l'étape d'échange de pont disulfure peut être considérée comme étant une étape cinétiquement irréversible.

Lorsque l'on compare les constantes de pseudo deuxième ordre k_2 , on en déduit une sélectivité de réduction du domaine FnMsrA par le domaine FnNter. En effet, une diminution d'un facteur 25 est observée entre les k_2 pour la FnMsrA ($1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et pour la FnMsrB ($7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Nous avons également déterminé les paramètres cinétiques de la réduction des domaines FnMsr par la Trx1 d'*E. coli* par la même approche (résultats présentés dans le tableau 9). La réduction des FnMsr par la Trx1 est aussi efficace que celle des Msr de *N. meningitidis*, avec un k_2 de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

	FnNter			Trx1 <i>E. coli</i>		
	$k_f (\text{s}^{-1})$	$K_s (\mu\text{M})$	$k_2 (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_f (\text{s}^{-1})$	$K_s (\mu\text{M})$	$k_2 (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
FnMsrA	$8,2 \pm 1,2$	300 ± 80	$1,8 \cdot 10^4$	42 ± 4	275 ± 45	$15,3 \cdot 10^4$
FnMsrB	$0,7 \pm 0,1$	1000 ± 170	$7,0 \cdot 10^2$	30 ± 4	360 ± 80	$8,3 \cdot 10^4$

Tableau 9 : Paramètres cinétiques déterminés en « single turn over » de la réduction des domaines FnMsrA et FnMsrB oxydés par le domaine FnNter et par la Trx1 d'*E. coli*.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus à partir de l'ajustement des données expérimentales pour la réduction des domaines FnMsr par le domaine FnNter Figure 60 ou par la Trx1 d'*E. coli* (résultats non montrés) à l'équation $k_{\text{obs}} = k_r + k_f \cdot S / (K_s + S)$. Les valeurs de k_r (égales ou très proches de zéro) ne sont pas reportées dans le tableau. Les constantes de pseudo-deuxième ordre k_2 ont été calculées à partir des valeurs k_f et K_s . Le calcul de la pente de la représentation des valeurs de k_{obs} à sous-saturation en substrat donne une valeur de k_2 du même ordre de grandeur que les valeurs du rapport k_f / K_s .

2.5. Sélectivité de réduction des domaines Msr par les domaines N-terminaux de PilB de *F. nucleatum* et de *N. meningitidis*

Les paramètres cinétiques de réduction des domaines Msr oxydés par le domaine N-terminal de PilB ont été déterminés en utilisant les domaines isolés de PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum*. Les propriétés de fluorescence des domaines isolés NmNter et FnNter étant les mêmes, à savoir une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence lors de leur passage de la forme réduite à la forme oxydée, il a été possible de suivre la réduction des domaines Msr d'un des deux PilB par le domaine N-terminal de l'autre PilB par la même méthode que celle décrite dans le paragraphe 2.4. Les valeurs des paramètres cinétiques obtenus sont regroupées dans le Tableau 10.

	NmNter			FnNter		
	k_f (s ⁻¹)	K_S (μM)	k_2 (M ⁻¹ .s ⁻¹)	k_f (s ⁻¹)	K_S (μM)	k_2 (M ⁻¹ .s ⁻¹)
NmMsrA	0,045 ± 0,003	79 ± 14	4,0.10 ²	1,0 ± 0,1	1540 ± 120	6,5.10 ²
NmMsrB	4,4 ± 0,2	320 ± 5	7,6.10⁴	2,3 ± 1,8	7700 ± 6500	2,3.10 ²
FnMsrA	0,018 ± 0,001	36 ± 7	3,2.10 ²	8,2 ± 1,2	300 ± 80	1,8.10⁴
FnMsrB	0,3 ± 0,2	800 ± 550	3,5.10 ²	0,7 ± 0,1	1000 ± 170	7,0.10 ²

Tableau 10 : Paramètres cinétiques de la réduction des domaines MsrA et MsrB de PilB de *F. nucleatum* et de *N. meningitidis* par le domaine N-terminal de PilB de *F. nucleatum* ou de *N. meningitidis*.

Les paramètres cinétiques ont été obtenus à partir de l'ajustement des données expérimentales présentées Figure 60 pour la réduction des domaines FnMsr par le domaine FnNter à l'équation $k_{obs} = k_f + k_f * S / (K_S + S)$. Les valeurs de k_f (égales ou très proches de zéro) ne sont pas reportées dans le tableau. Les constantes de deuxième ordre k_2 ont été calculées à partir des valeurs k_f et K_S . Le calcul de la pente de la représentation des valeurs de k_{obs} à sous saturation donne une valeur de k_2 du même ordre de grandeur que les valeurs du rapport k_f/K_S .

On constate que les valeurs de k_2 obtenues sur les réductions « croisées » sont toutes de l'ordre de 10² M⁻¹.s⁻¹. Ce résultat confirme que le domaine FnNter présente une spécificité pour le domaine FnMsrA alors que le domaine NmNter présente une spécificité pour le domaine NmMsrB. L'examen plus approfondi des paramètres cinétiques montre que cette sélectivité correspond dans les deux cas à une valeur de k_f plus élevée et une valeur de K_S plus faible.

2.6. Conclusions concernant les domaines isolés de la protéine PilB de *F. nucleatum*

Les domaines Msr isolés de PilB de *F. nucleatum* présentent des propriétés catalytiques semblables à celles des domaines isolés de la protéine PilB de *N. meningitidis*. Nous pouvons cependant noter une diminution d'un facteur 20 de la constante de vitesse k_{obsmax} pour FnMsrB par rapport à NmMsrB, alors que la constante apparente d'affinité est équivalente dans les deux cas. Les résidus impliqués dans la catalyse, et notamment le résidu His103, étant strictement conservés entre NmMsrB et FnMsrB (Figure 46 page 68), cette différence doit s'expliquer par d'autres facteurs non identifiés.

Les résultats obtenus montrent également que l'étape réductase des domaines MsrA ou MsrB n'est pas limitante. En effet, les constantes de vitesse maximales observées sont supérieures (k_{obsmax} respectivement de 520 et 2,7 s⁻¹) à la constante de vitesse catalytique (k_{cat} respectivement de 1,4 et 1,1 s⁻¹) pour FnMsrA et FnMsrB. Ceci signifie que l'étape limitante se situe après l'étape réductase. Si on examine les paramètres cinétiques déterminés pour les domaines FnMsr avec la Trx1 comme disulfure oxydoréductase, le fait que la constante de vitesse k_f (qui reflète les étapes conduisant à la formation du pont disulfure sur la Trx1) soit

supérieure au k_{cat} , et que la constante K_S pour la Trx1 soit supérieure au K_M pour la Trx1 montre que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme des FnMsr est également associée à l'étape de dissociation des partenaires Msr réduite / Trx1 oxydée. Cela montre donc que le mécanisme de l'étape de recyclage est semblable à celui décrit dans l'introduction pour les domaines Msr de PilB de *N. meningitidis*.

D'autre part, les résultats montrent que le domaine FnNter présente une sélectivité de réduction pour le domaine FnMsrA, alors que le domaine NmNter réduit sélectivement le domaine NmMsrB. La sélectivité observée pour le domaine FnMsrA est plutôt inattendue si on la compare avec celle observée avec le domaine NmMsrB *N. meningitidis*. Pour vérifier si cette sélectivité est conservée dans PilB entière, nous avons ensuite déterminé les propriétés biochimiques et catalytiques de la protéine PilB entière de *F. nucleatum* avec les mêmes approches que celles utilisées dans l'étude de NmPilB.

3. Etude de la protéine PilB entière de *F. nucleatum*

3.1. Production, purification de la protéine PilB entière et des variants Cys

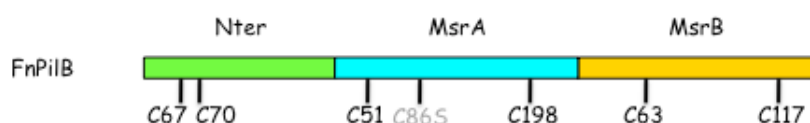


Figure 61 : Représentation schématique de la protéine PilB sauvage (FnPilB) de *F. nucleatum*.

La numérotation des résidus Cys utilisée est celle utilisée pour les domaines isolés Nter, MsrA et MsrB de *N. meningitidis* (Figure 46 page 68). Les Cys67, Cys51 et Cys117 correspondent aux Cys catalytiques des trois domaines et les Cys70, Cys198 et Cys63 correspondent aux Cys de recyclage. La Cys86 du domaine MsrA a été mutée en Ser.

Pour obtenir des protéines PilB solubles, la même stratégie que celle utilisée pour PilB de *N. meningitidis* a été utilisée. La partie du gène *pilB* codant le peptide signal (33 premiers résidus N-terminaux) a été délétée et le codon correspondant à la Met de réinitiation a été muté pour coder un résidu Ala. De plus, pour faciliter les analyses, la troisième Cys (Cys86) du domaine FnMsrA a été mutée en Ser. Pour simplifier les notations, la protéine obtenue à partir de cette construction correspond à la protéine FnPilB sauvage et les variants obtenus ci-après dérivent de cette dernière construction. Par mutagenèse dirigée, d'autres variants de chacune des protéines FnPilB ont été obtenus correspondant à l'inactivation d'un des trois domaines (deux résidus Cys mutés en Ser), ou à l'inactivation de deux des trois domaines (quatre résidus Cys mutés en Ser) comme décrit pour PilB de *N. meningitidis* (Figure 48 page 72).

Les constructions ont été réalisées dans le plasmide pET24c. La protéine sauvage FnPilB et les variants décrits ci-dessus ont tous été produits à partir d'un vecteur d'expression

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

pET24c dans une souche d'*E. coli* C41(DE3) en milieu auto-inductible ZYM à 37 °C pendant 18 h sous agitation et en présence de 200 mg/l d'ampicilline.

Pour purifier la protéine FnPilB et ses variants, la stratégie suivante a été mise au point : une précipitation fractionnée à 35 % et 55 % de saturation en sulfate d'ammonium du surnageant de sonication a été suivie d'une filtration sur gel (ACA54), puis d'une chromatographie échangeuse d'anions et enfin d'une chromatographie par interactions hydrophobes. La pureté des protéines a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et par détermination de la masse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (LSMBO, Strasbourg, résultats non montrés). Les rendements de purification sont de l'ordre de 150 mg de protéine par litre de culture.

3.2. FnNter réduit MsrA et MsrB dans PilB

3.2.1. Détermination de la stœchiométrie de formation de la méthionine

Tout d'abord, nous avons vérifié que le domaine Nter est capable de réduire les domaines MsrA et MsrB oxydés dans la protéine PilB. Pour cela, la stœchiométrie de formation de Met (mole de Met par mole de PilB) a été déterminée après 15 minutes d'incubation avec le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O, en absence et en présence du domaine Nter. En parallèle, le nombre de thiols libres est titré par le DTNB, afin de vérifier que la formation d'une mole de Met correspond bien à la formation d'un pont disulfure (disparition de deux thiols libres).

	Thiols libres titrés (mole de Cys / mole de PilB)			Stœchiométrie (mole de Met formée / mole de PilB)
	sans <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	avec <i>D,L</i> -Met- <i>R,S</i> -O	perte de thiols libres	
FnPilB	6,0	0,0	6,0	3,2
FnMsrAMsrBPilB	4,0	0,0	4,0	2,2
FnNterPilB	2,1	1,9	0,2	0,0
FnNterMsrAPilB	4,1	0,0	4,1	2,0
FnMsrAPilB	2,0	0,0	2,0	1,0
FnNterMsrBPilB	4,0	0,1	3,9	2,1
FnMsrBPilB	2,1	0,0	2,1	1,0

Tableau 11 : Titration des groupements thiols libres par le DTNB et stœchiométrie de formation de la méthionine des protéines sauvages et variants de PilB.

La quantité de Met formée par mole de PilB a été déterminée par chromatographie phase réverse, après 15 minutes de réaction entre *D,L*-Met-*R,S*-O (100 mM) et PilB (100 et 200 µM). Les thiols libres ont été titrés en suivant par spectrophotométrie à 412 nm la libération de TNB⁻ en conditions dénaturantes (1 % SDS). La perte de thiols libres correspond à la différence entre le nombre de Cys dosées avant et après ajout de *D,L*-Met-*R,S*-O.

Les stœchiométries de formation de Met à 15 min montrent que le domaine FnNter réduit les domaines MsrA et MsrB oxydés, deux Met étant formées pour les variants FnNterMsrAPilB et FnNterMsrBPilB (Tableau 11).

3.2.2. Vitesse de formation de la méthionine pour les variants FnNterMsrAPilB et FnNterMsrBPilB

Nous avons quantifié au cours du temps la quantité de Met formée et les thiols libres restants pour les variants FnNterMsrAPilB et FnNterMsrBPilB. Pour cela, nous avons utilisé la technique de « quenched flow » comme décrit précédemment pour le variant NmNterMsrBPilB : le mélange réactionnel contenant le variant FnPilB et le substrat (*D,L*-Met-*R,S*-O) est réalisé dans un appareil de cinétique rapide et à un temps donné (entre 30 ms et 300 s) ; et la réaction est arrêtée par acidification du milieu (ajout de TFA). Le mélange est ensuite récupéré et après une mesure de la concentration du variant PilB dans le mélange final, un dosage des thiols libres est effectué avec du 2-PDS et une quantification des Met formées est réalisée par la méthode décrite précédemment.

3.2.2.a. Variant FnNterMsrAPilB

La quantification de la Met au cours du temps avec le variant FnNterMsrAPilB en présence de Met-O devait permettre de suivre : 1) l'oxydation du domaine MsrA avec la libération d'une mole de Met, et 2) la réduction du domaine MsrA par le domaine Nter, puis la réoxydation du domaine MsrA avec la libération d'une seconde mole de Met par mole de PilB.

Les résultats obtenus montrent que deux Met sont bien formées avec la disparition concomitante de quatre groupements thiols libres (Figure 62). La première étape, correspondant à la formation de la première Met, est trop rapide pour être mesurée par cette technique. En effet, dès 40 ms de réaction, nous observons la formation d'une Met ($y_0 = 1,07$) et la disparition de deux thiols libres. Cette étape correspond à l'oxydation du domaine MsrA ($k_{\text{obsmax}} = 520 \text{ s}^{-1}$ déterminé par fluorescence avec l'Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe, voir résultats 2.4.3). La seconde étape est lente ($\sim 1 \text{ s}^{-1}$) et correspond à la formation d'une seconde molécule de Met et à la disparition de deux thiols libres. Ceci montre que, comme attendu par rapport aux stœchiométries observées à 15 min (paragraphe 3.2.1), le domaine MsrA dans PilB est bien réduit par le domaine Nter, et peut donc ensuite réduire une seconde molécule de Met-O, et que l'étape de réduction du domaine MsrA est cinétiquement limitante dans le mécanisme avec une constante de vitesse de l'ordre de 1 s^{-1} à 100 mM Met-O.

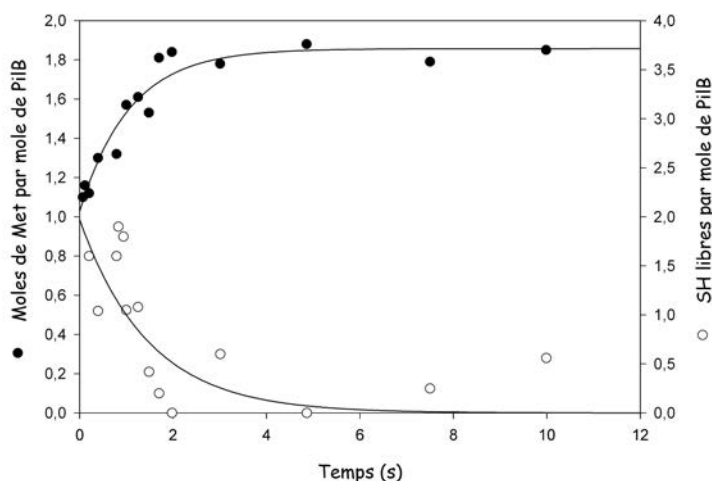


Figure 62 : Suivi de la formation de Met (•) et de la disparition des thiols libres (o) en fonction du temps pour le variant FnNterMsrAPilB (« quenched flow »).

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 150 μ M (concentration finale) de protéine dans la première seringue et 100 mM (concentration finale) de substrat *D,L*-Met-*R,S*-O dans la seconde seringue. La réaction est arrêtée par injection automatique de TFA à 2 % final à différents temps. Une partie du mélange réactionnel permet de vérifier la concentration en protéine dans le mélange final, une autre à quantifier la Met formée et la dernière à titrer les thiols restant par le 2-PDS. L'ajustement des données expérimentales (points) à l'équation d'une monoexponentielle croissante (traits continus) concernant la quantification de la Met formée : $y = y_0 + \text{Amp} (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$ et à l'équation d'une monoexponentielle décroissante pour la titration des groupements thiols libres : $y = \text{Amp} \cdot e^{-k_{\text{obs}}t}$ permet de déterminer les constantes de vitesse suivantes $k_{\text{obs}} = 0,94 \pm 0,18 \text{ s}^{-1}$ (Amp = $0,83 \pm 0,07$ et $y_0 = 1,07 \pm 0,01$) pour la formation de Met et $k_{\text{obs}} = 0,75 \pm 0,19 \text{ s}^{-1}$ (Amp = $1,93 \pm 0,23$) pour la disparition des thiols.

3.2.2.b. Variant FnNterMsrBPilB

Pour le variant FnNterMsrBPilB, des expériences de « quenched flow » ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le variant FnNterMsrAPilB afin de quantifier la formation de Met et la disparition des thiols libres au cours du temps.

Les résultats obtenus montrent que deux Met sont bien formées avec la disparition concomitante de quatre groupements thiols libres (Figure 63, A). La formation d'une seconde molécule de Met démontre que le domaine MsrB est bien réduit par le domaine Nter et peut réduire ensuite une seconde molécule de Met. Ceci montre que, comme attendu par rapport aux stœchiométries observées à 15 min (paragraphe 3.2.1), le domaine MsrB dans FnPilB est bien réduit par le domaine Nter.

Les points expérimentaux s'ajustent à l'équation d'une monoexponentielle croissante qui passe par l'origine (formation de Met) et d'une exponentielle décroissante (disparition des thiols libres). Ceci implique que la formation des deux molécules de Met n'est pas indépendante, avec une constante de vitesse de $5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ environ, et que, dans les conditions utilisées, l'étape réductase est cinétiquement limitante dans la réaction ; la vitesse de l'étape de réduction du domaine MsrB par le domaine Nter étant supérieure à $5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

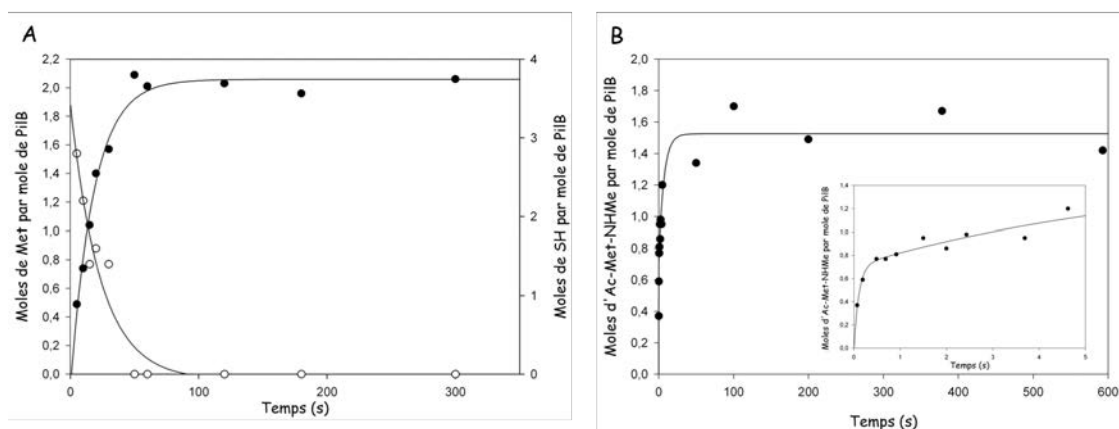


Figure 63 : Suivi de la formation de Met (A) ou d'Ac-Met-NHMe (B) (•) et de la disparition des thiols libres (o) au cours du temps avec le variant FnNterMsrBPilB (« quenched flow »).

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 150 μ M (concentration finale) de protéine dans la première seringue et (A) 100 mM (concentration finale) de substrat *D,L*-Met-*R,S*-O ou (B) 150 mM (concentration finale) de substrat *D,L*-Ac-Met-*R,S*-O-NHMe dans la seconde seringue. La réaction est arrêtée par injection automatique de TFA à 2 % à différents temps. Une partie du mélange réactionnel permet de vérifier la concentration en protéine dans le mélange final, une autre à quantifier la Met (ou l'Ac-Met-NHMe) formée et la dernière à titrer les thiols restant par le 2-PDS (uniquement pour A).

A. L'ajustement des données expérimentales (points) à l'équation d'une monoexponentielle croissante (traits continus) concernant la quantification de la Met formée : $y = y_0 + \text{Amp} (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$ et à l'équation d'une monoexponentielle décroissante pour la titration des groupements thiols libres : $y = \text{Amp} \cdot e^{-k_{\text{obs}}t}$ permet de déterminer les constantes de vitesse suivantes $k_{\text{obs}} = 5,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Amp = $2,07 \pm 0,05$ et $y_0 = 0$) pour la formation de Met et $k_{\text{obs}} = 3,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Amp = $2,62 \pm 0,25$) pour la disparition des thiols.

B. L'encart correspond à un agrandissement de ce qui est observé dans les 5 premières secondes. L'ajustement des données expérimentales (points) à l'équation d'une double exponentielle croissante (traits continus) concernant la quantification d'Ac-Met-NHMe formée (A) : $y = y_0 + \text{Amp} (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$ conduit aux constantes de vitesse suivantes : $k_{\text{obs}1} = 9,35 \pm 3,83 \text{ s}^{-1}$ (Amp1 = $0,71 \pm 0,09$) pour la formation de la première molécule d'Ac-Met-NHMe (B) et $k_{\text{obs}2} = 0,15 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ (Amp2 = $0,82 \pm 0,10$) pour la formation de la seconde molécule d'Ac-Met-NHMe.

L'activité réductase de FnMsrBPilB observée en présence de 100 mM de *D,L*-Met-*R,S*-O ($k_{\text{obs}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) est 50 fois plus faible que celle observée en présence d'Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe ($k_{\text{obsmax}} = 2,7 \text{ s}^{-1}$, paragraphe 2.4.3). Or, il a été montré que la MsrB de *N. meningitidis* présente une efficacité catalytique de l'étape réductase 1000 fois plus faible en présence de Met-O par rapport à l'Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe, et ce à cause d'un effet K_s uniquement (résultats non montrés). Il en est probablement de même pour la MsrB de FnPilB. Nous avons donc réalisé la même étude en prenant le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe à la place de la *D,L*-Met-*R,S*-O dans le but d'augmenter la vitesse de l'étape réductase de FnMsrBPilB et de pouvoir déterminer la vitesse de formation de la seconde molécule de Met.

Les résultats obtenus montrent que deux moles d'Ac-Met-NHMe sont bien formées (Figure 63, B). Les points expérimentaux s'ajustent à l'équation d'une double exponentielle croissante. La vitesse de l'étape réductase obtenue est équivalente à celle obtenue pour le domaine FnMsrB isolé ($k_{\text{obsmax}} = 2,7 \text{ s}^{-1}$, paragraphe 2.4.3). La vitesse de formation de la

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

seconde molécule d'Ac-Met-NHMe est de $0,15 \text{ s}^{-1}$, qui est équivalente à celle obtenue pour le variant FnNterMsrAPilB. Ceci suggère que la sélectivité de réduction du domaine MsrA observée sur les domaines isolés ne semble pas être retrouvée dans FnPilB entier.

3.3. Les domaines Msr dans FnPilB

3.3.1. Caractérisation des propriétés de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés dans PilB

Dans un premier temps il était nécessaire de vérifier si les variations d'intensité de fluorescence étaient les mêmes dans le contexte PilB que celles observées sur les trois domaines isolés entre les formes réduites et oxydées. Pour cela, les spectres d'émission de fluorescence des variants PilB avec un seul domaine encore actif (FnNterPilB, FnMsrAPilB et FnMsrBPilB) réduits et oxydés ont été enregistrés.

Les spectres d'émission de fluorescence obtenus, à la longueur d'onde d'excitation de 293 nm, montrent que les variations d'intensité de fluorescence, correspondant au passage de la forme réduite à la forme oxydée sont conservées entre les domaines FnNter et FnMsrA et les variants FnNterPiB et FnMsrAPilB (Figure 64).

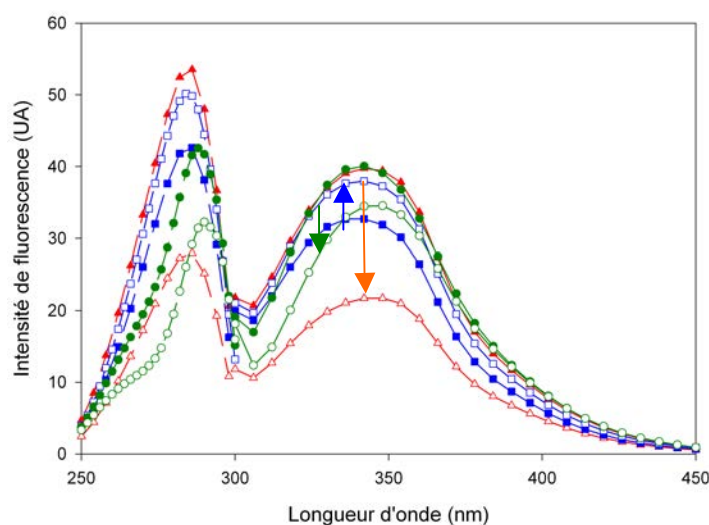


Figure 64 : Spectres de fluorescence des trois domaines réduits et oxydés dans la protéine PilB entière de *F. nucleatum*.

Les spectres d'excitation (émission suivie à 340 nm) et d'émission (excitation à 293 nm) ont été enregistrés avec $10 \mu\text{M}$ de protéines à 25°C en tampon TE pH 8,0. Les variations de fluorescence entre les domaines réduits (formes pleines) et oxydés (formes vides) sont représentés par des flèches (FnNter : verte ; FnMsrA : bleue ; FnMsrB : orange).

Une diminution de 20 % est observée pour le variant FnNterPilB et une augmentation de 20 % pour le variant FnMsrAPilB. Par contre, on observe une inversion de la variation d'émission de fluorescence pour le variant FnMsrBPilB comme pour NmMsrBPilB, avec une

diminution de 60 %. Ces observations suggèrent que le contexte tridimensionnel de la protéine PilB a une influence sur l'environnement du Trp du domaine FnMsrB.

3.3.2. Vitesses de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 MsrA ou Cys63-Cys117 MsrB dans FnPilB

Pour déterminer, la vitesse de formation des ponts disulfures au niveau des domaines Msr, le suivi des variations d'intensité d'émission de fluorescence a été réalisé en présence de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe avec les variants FnNterPilB, FnMsrAPilB et FnMsrBPilB.

3.3.2.a. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrA avec le variant FnMsrAPilB

Comme cela a été fait sur les domaines FnMsr isolés, la vitesse de formation du pont disulfure Cys51-Cys198 du variant FnMsrAPilB a été déterminée en suivant l'augmentation de la fluorescence lors du passage du domaine MsrA de sa forme réduite à sa forme pont disulfure en présence de différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe.

Une augmentation rapide de l'émission de fluorescence est observée pour chaque concentration en substrat utilisée (Figure 65) ; et chaque courbe a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle croissante (équation 2). L'ajustement des paramètres cinétiques k_{obs} en fonction de la concentration en substrat à l'équation 4, a conduit aux valeurs de k_{obsmax} et de K_S respectivement de 300 s^{-1} et de 73 mM pour FnMsrAPilB (Figure 65).

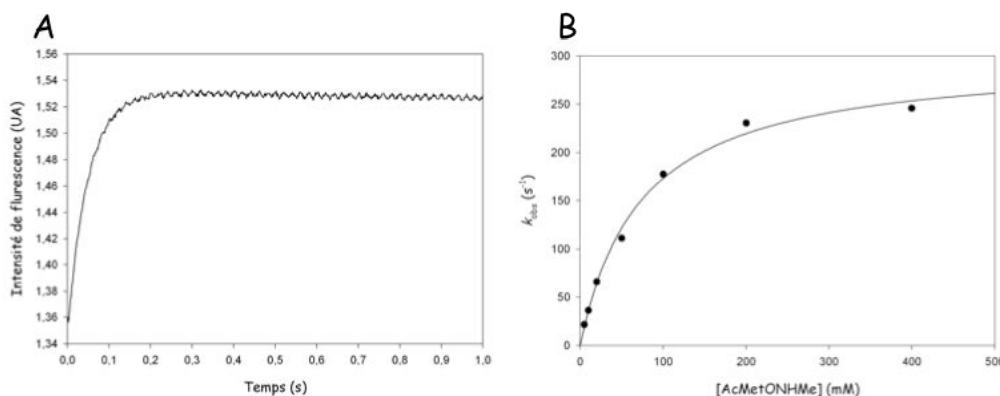


Figure 65 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrA du variant FnMsrAPilB par suivi de la fluorescence (« stopped flow ») en « single turn-over ».

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μM de protéine et 5 mM de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (A) avec une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm. L'ajustement du signal à l'équation d'une monoexponentielle croissante conduit à la détermination d'une constante de vitesse de $21,7\text{ s}^{-1}$. L'ajustement des valeurs de k_{obs} en fonction de la concentration en substrat (B) à l'équation 4 donne les paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax} = 300 \pm 12\text{ s}^{-1}$ et $K_S = 73 \pm 9\text{ mM}$.

La comparaison des valeurs de ces paramètres cinétiques avec celles des paramètres obtenues pour le domaine isolé FnMsrA montre que le contexte tridimensionnel de PilB

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

n'affecte pas l'efficacité catalytique de l'étape réductase du domaine MsrA (Tableau 12 page 99).

3.3.2.b. Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase MsrB avec le variant FnMsrBPilB

De la même manière, la vitesse de formation du pont disulfure Cys63-Cys117 du variant FnMsrBPilB a été déterminée en suivant le passage du domaine MsrB de sa forme réduite à sa forme pont disulfure, qui se traduit par une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence, en présence de différentes concentrations en substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe.

Une diminution rapide de l'émission de fluorescence est observée pour chaque concentration en substrat utilisée (Figure 66) et chaque courbe a été ajustée à l'équation d'une monoexponentielle décroissante (équation 3). L'ajustement des valeurs de k_{obs} en fonction de la concentration en substrat à l'équation 4 a conduit aux valeurs de k_{obsmax} et de K_S respectivement de $3,5 \text{ s}^{-1}$ et de 19 mM pour FnMsrBPilB (Figure 66).

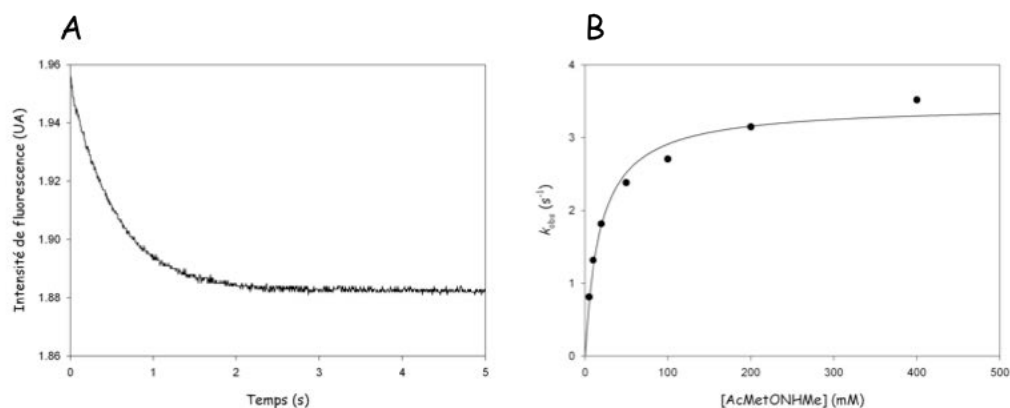


Figure 66 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrB dans FnMsrBPilB par suivi de la fluorescence (« stopped flow ») en « single turn-over ».

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μM de protéine et 20 mM de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (A) avec une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm. L'ajustement du signal à l'équation d'une monoexponentielle croissante ou décroissante conduit à la détermination d'une constante de vitesse de $1,82 \text{ s}^{-1}$. L'ajustement des valeurs de k_{obs} en fonction de la concentration en substrat (B) à l'équation 4 donne les paramètres cinétiques suivants $k_{obsmax} = 3,5 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ et $K_S = 19 \pm 3 \text{ mM}$.

La comparaison des valeurs de ces paramètres cinétiques avec celles des paramètres obtenues sur le domaine isolé FnMsrB montre que le contexte PilB n'affecte pas l'étape réductase du domaine MsrB (Tableau 12 page 99).

		$k_{obsmax} (s^{-1})$	$K_S (mM)$
MsrB	FnMsrB isolé	$2,7 \pm 0,1$	32 ± 5
	FnMsrBPilB	$3,5 \pm 0,1$	19 ± 3
	FnNterMsrBPilB	ND	ND
MsrA	FnMsrA isolé	520 ± 33	70 ± 13
	FnMsrAPilB	300 ± 12	73 ± 9
	FnNterMsrAPilB	200 ± 5	52 ± 4

Tableau 12 : Paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines Msr isolés et dans les variants FnPilB.

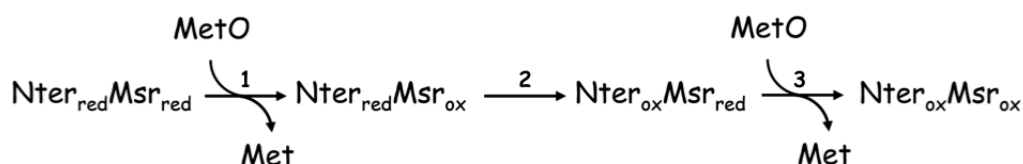
Les paramètres cinétiques de l'étape réductase ont été déterminés en tampon TE pH 8,0 en condition de « single turn over » par le suivi du message de fluorescence (Matériels et Méthodes). Les points expérimentaux ont été ajustés à l'équation 4. Les paramètres cinétiques du variant FnNterMsrAPilB ont été déterminés (voir le paragraphe 3.4).

3.4. Réduction des domaines FnMsr dans PilB

3.4.1. Vitesse de réduction des domaines Msr oxydés sous forme de pont disulfure par les domaines Nter avec des variants FnNterMsrPilB

Comme pour PilB de *N. meningitidis*, nous avons suivi les variations d'intensité d'émission de fluorescence par « stopped flow » des variants FnNterMsrAPilB et FnNterMsrBPilB en présence de substrat. Compte tenu des résultats obtenus par les approches de « quenched-flow », nous devons observer deux messages :

- un premier message correspondant à l'oxydation du domaine Msr dans PilB (augmentation pour FnMsrAPilB et diminution pour FnMsrBPilB, étape 1 du schéma ci-dessous) ;
- un second message plus lent correspondant à l'oxydation du domaine Nter dans PilB (diminution pour tous les variants) et à la réduction du domaine Msr dans PilB (diminution pour FnMsrAPilB et augmentation pour FnMsrBPilB) (étapes 2 et 3 sur le schéma ci-dessous).



3.4.1.a. Etude du variant FnNterMsrAPilB

Le suivi de la réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe à différentes concentrations par le variant FnNterMsrAPilB montre deux variations de fluorescence successives : une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence rapide pouvant

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

correspondre à l'oxydation du domaine MsrA suivie d'une diminution de fluorescence plus lente pouvant correspondre à l'oxydation du domaine Nter concomitante à la réduction du domaine MsrA (Figure 67).

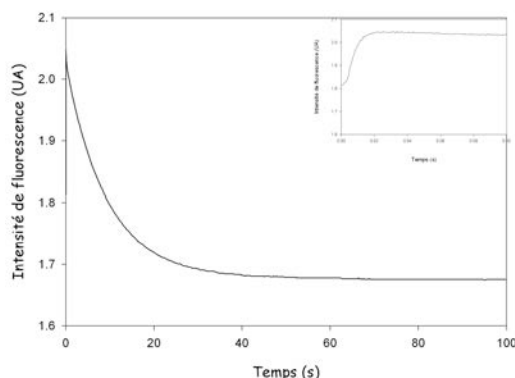


Figure 67 : Suivi par fluorescence de la vitesse de réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe par le variant FnNterMsrAPilB en single turn over.

L'encart correspond à un agrandissement sur des 100 premières millisecondes de la réaction. Les mesures ont été effectuées au « stopped-flow » à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M de protéine et 5 mM de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe avec une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm.

Le signal observé correspond à l'oxydation « totale » du variant FnNterMsrAPilB en présence de substrat, puisque les résultats obtenus par la méthode de « quenched flow » a mis en évidence la formation de deux molécules de Met après 5 s de réaction. L'ajustement des données à un modèle cinétique à deux étapes ($A \rightarrow B \rightarrow C$) à l'aide du logiciel Pro-Kinetics, conduit à deux constantes de vitesse pour chaque concentration en substrat (Figure 68).

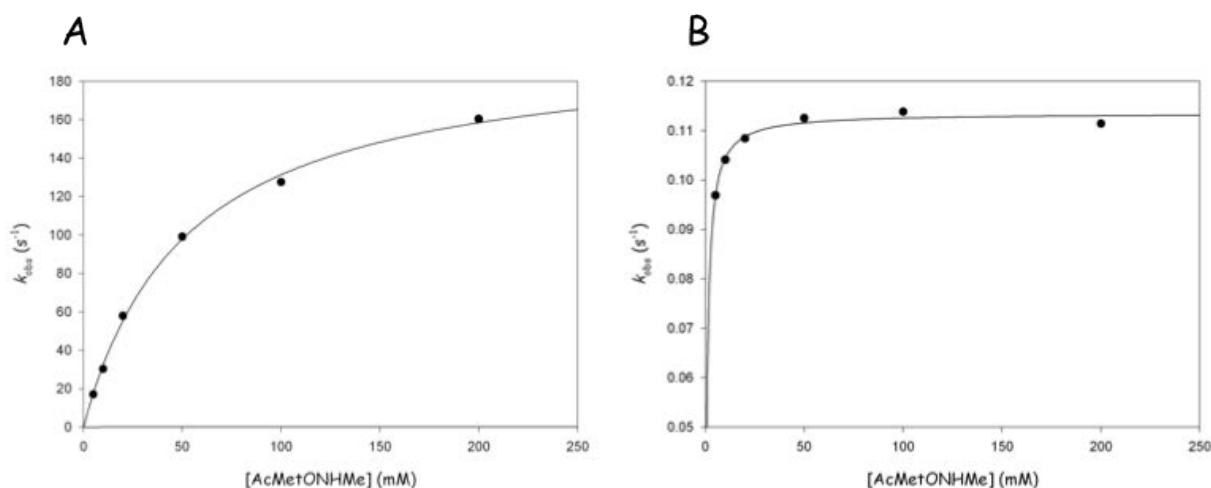


Figure 68 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase du domaine MsrA pour le variant FnNterMsrAPilB (A) et de l'étape de réduction du domaine MsrA oxydé par le domaine Nter (B).

L'ajustement des points expérimentaux à l'équation 4 nous permet d'obtenir les paramètres cinétiques suivants : $k_{obsmax1} = 200 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ et $K_{S1} = 52 \pm 4 \text{ mM}$ et $k_{obsmax2} = 0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ et $K_{S2} = 0,87 \pm 0,08 \text{ mM}$. Il est à noter que les valeurs de k_{obs2} ne varient quasiment pas, ce qui pose la question de l'ajustement à l'équation 4.

Les valeurs des paramètres cinétiques obtenues pour la 1^{ère} étape sont du même ordre que celles observés pour le domaine FnMsrA ($k_{\text{obsmax}} = 520 \text{ s}^{-1}$ et $K_S = 70 \text{ mM}$, Tableau 12 page 99). Ce résultat montre donc que le premier message de fluorescence (augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence) correspond bien à l'étape réductase du domaine MsrA dans le variant FnNterMsrAPilB.

L'analyse du second signal est beaucoup moins évidente. En effet, la constante de vitesse observée est quasiment constante quelque soit la concentration en Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (k_{obsmax} de $0,11 \text{ s}^{-1}$). Celle-ci pourrait correspondre à la réduction du domaine MsrA par le domaine Nter. Cette réduction serait immédiatement suivie par la réoxydation du domaine MsrA, c'est-à-dire à la réduction d'une seconde molécule de Met-O en Met. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus avec la méthode de « quenched flow », où deux molécules de Met sont produites.

3.4.1.b. Etude du variant FnNterMsrBPilB

Le suivi de la réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe (concentrations variables) par le variant FnNterMsrBPilB montre une seule variation de fluorescence (Figure 69) : une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence pouvant correspondre à l'oxydation du domaine MsrB suivie de l'oxydation du domaine Nter concomitante à la réduction du domaine MsrB, immédiatement suivie de la réoxydation du domaine MsrB.

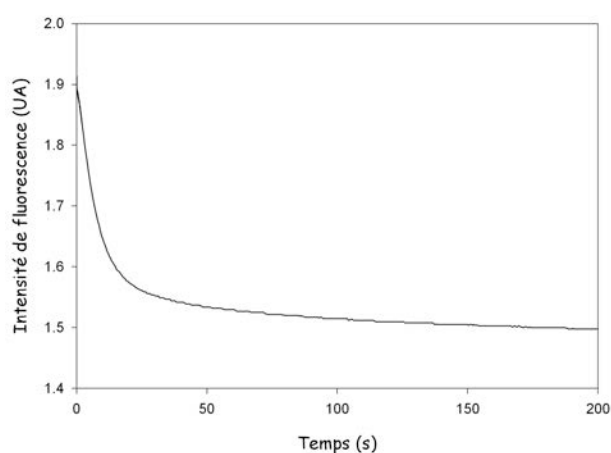


Figure 69 : Suivi par fluorescence de la réduction du substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe par le variant FnNterMsrBPilB en « single turn over ».

Les mesures ont été effectuées au « stopped-flow » à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μM de protéine et 5 mM de substrat Ac-L-Met-R,S-O-NHMe avec une longueur d'onde d'excitation à 293 nm et un filtre permettant de mesurer la fluorescence émise au dessus de 320 nm.

Ce signal correspond à l'oxydation « totale » du variant FnNterMsrBPilB en présence de substrat, puisque les résultats obtenus par la méthode de « quenched flow » a mis en

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

évidence la formation de deux molécules de Met après 100 s de réaction. Les données obtenues ne s'ajustent pas à l'équation d'une monoexponentielle ou d'une double exponentielle décroissante. Ainsi, l'ajustement des données à un modèle cinétique à deux étapes ($A \rightarrow B \rightarrow C$) par le logiciel Pro-Kinetics donne deux constantes de vitesses (k_{obs}) pour chaque concentration en substrat (Figure 70).

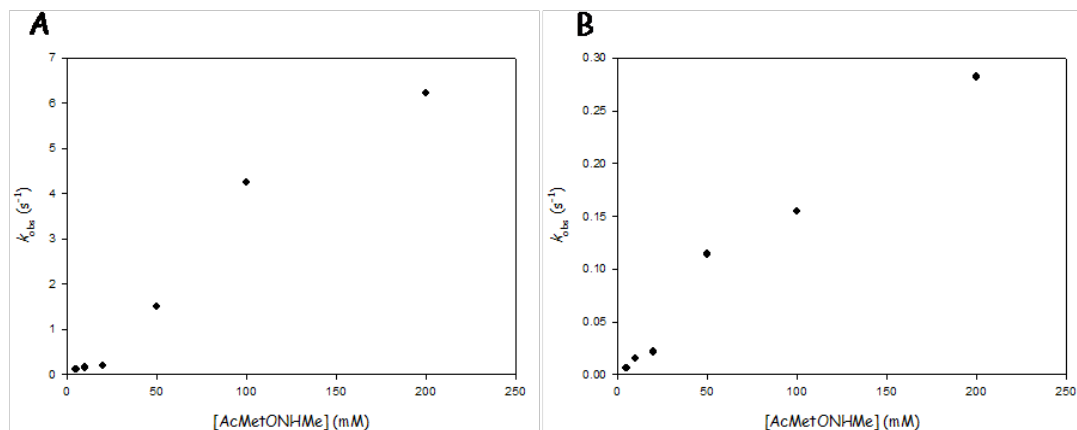


Figure 70 : Variation des constantes de vitesse k_{obs} de l'étape réductase du domaine MsrB pour le variant FnNterMsrBPilB (A) et de l'étape de réduction du domaine MsrB oxydé par le domaine Nter (B).

Les variations des valeurs de constantes de vitesse (k_{obs}) en fonction de la concentration en substrat, présentées dans la Figure 70, ne s'ajustent ni à une droite ni à un modèle avec saturation, surtout au niveau des valeurs obtenues à faible concentration en substrat. Une explication serait l'existence d'un changement d'étape cinétiquement limitante de la réaction dans la gamme de concentration en substrat utilisée. Pour y remédier, il faudrait connaître l'étape cinétiquement limitante pour chaque concentration en substrat, ce qui permettrait d'ajuster les données de variation d'intensité d'émission de fluorescence en fonction du temps à des modèles différents, ce qui n'est pas possible. Cependant, il est fort probable que les valeurs des constantes obtenues à concentration saturante en substrat ($k_{obs1} = 6 s^{-1}$ et $k_{obs2} = 0,3 s^{-1}$, à 200 mM) reflètent bien les valeurs des constantes maximales de l'activité réductase du domaine MsrB et de la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter. En effet, la valeur de k_{obs1} est proche de la valeur de k_{obsmax} de FnMsrBPilB dans les mêmes conditions ($k_{obsmax} = 3,7 s^{-1}$, 3.3.2.b). La seconde constante de vitesse doit donc correspondre à celle de la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter.

3.4.2. Réduction des variants FnMsrAPilB et FnMsrBPilB oxydés sous forme pont disulfure par le variant FnNterPilB

Les résultats obtenus précédemment montrent une constante de vitesse maximale de l'ordre de $1 s^{-1}$ pour la réduction du domaine MsrA (variant FnNterMsrAPilB), et de $0,3 s^{-1}$

pour le domaine MsrB (variant FnNterMsrBPilB). Cependant, il restait à déterminer si, dans les conditions expérimentales utilisées, la réaction de réduction se faisait par un mécanisme intra ou en inter-moléculaire. Pour répondre à cette question, nous nous sommes placés dans des conditions de réduction « intermoléculaires », à savoir le variant FnMsrA_{ox}PilB ou FnMsrB_{ox}PilB en condition stœchiométrique avec le variant FnNterPilB, et nous avons suivi par fluorescence la réduction du domaine Msr_{ox} par le variant FnNterPilB. Comme attendu, nous observons une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence assez lente qui correspond bien à l'oxydation de FnNterPilB (Figure 71).

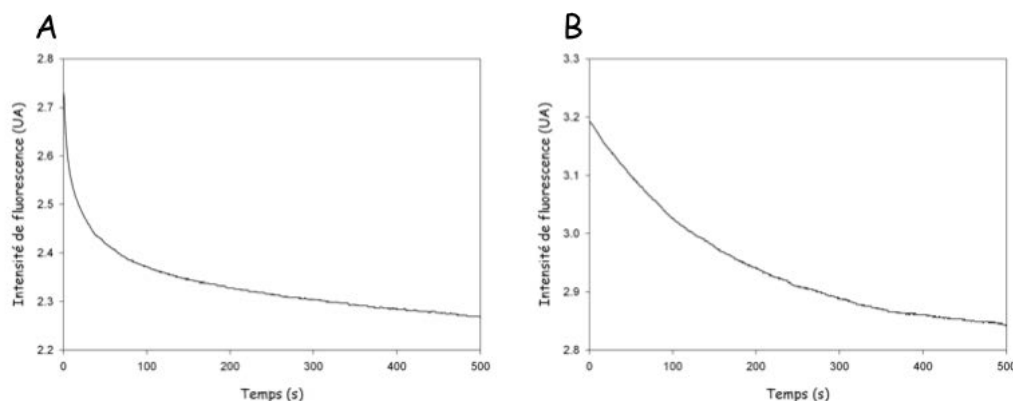


Figure 71 : Suivi par fluorescence de la réduction du domaine MsrA oxydé du variant FnMsrA_{ox}PilB (A) et du domaine MsrB oxydé du variant FnMsrB_{ox}PilB (B) par le domaine Nter du variant FnNterPilB en quantités stœchiométriques en single turn over (« stopped flow »).

Les mesures ont été effectuées à 25 °C en tampon TE pH 8,0 avec 5 μ M du variant FnMsrA_{ox}PilB préalablement oxydé et 5 μ M du variant FnNterPilB. L'ajustement des données expérimentales à l'équation d'une monoexponentielle décroissante donne une valeur de k_{obs} respectivement de $0,25 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ et de $(6,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

L'ajustement à l'équation d'une monoexponentielle décroissante (équation 3) conduit à une constante de vitesse d'environ $0,25 \text{ s}^{-1}$ pour la réduction intermoléculaire de FnMsrAPilB et d'environ $6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pour la réduction intermoléculaire de FnMsrBPilB.

3.5. Conclusions

L'étude de la protéine FnPilB entière montre que : 1) les domaines FnMsrPilB ont les mêmes propriétés catalytiques que les domaines FnMsr isolés, 2) les variations de fluorescence ne sont pas toutes conservées entre les domaines isolés et les domaines dans le contexte FnPilB ; et 3) le domaine Nter réduit les domaines MsrA et MsrB dans le contexte FnPilB. Reste posée la question de la nature du mécanisme (intra- ou intermoléculaire) de réduction des domaines Msr par le domaine Nter, dans les conditions expérimentales utilisées.

En ce qui concerne la réduction du domaine MsrA par le domaine Nter, si on compare la valeur des constantes de vitesse mesurées avec FnNterMsrAPilB (k_{obs} de 1 s^{-1} à 100 mM en Met-O, et k_{obsmax} de $0,11 \text{ s}^{-1}$ à saturation en Ac-L-Met-R,S-O-NHMe) à celle de la constante de

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

vitesse de réduction de FnMsrAPilB par FnNterPilB obtenue dans des conditions équivalentes de concentrations en protéines ($k_{\text{obs}} = 0,25 \text{ s}^{-1}$), on constate que la différence entre ces valeurs n'est pas significative. Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à la nature intra- ou intermoléculaire de la réaction de réduction du domaine MsrA dans la protéine FnPilB, mais indique que la réaction selon un mécanisme intermoléculaire est au moins aussi rapide que la réaction selon un mécanisme intramoléculaire.

En ce qui concerne la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter, si on compare la valeur des constantes de vitesse mesurées pour le variant FnNterMsrBPilB par fluorescence (k_{obsmax} de $0,3 \text{ s}^{-1}$ à 200 mM en Ac-L-Met-R,S-O-NHMe) et par la technique de « quenched flow » (k_{obs} de $0,15 \text{ s}^{-1}$ à 150 mM en Ac-L-Met-R,S-O-NHMe) à celle de la constante de vitesse de réduction de FnMsrBPilB par FnNterPilB obtenue dans des conditions équivalentes de concentrations en protéines (6.10^{-3} s^{-1}), on peut conclure que la réaction de réduction peut procéder par un mécanisme intramoléculaire dans FnPilB.

4. PilB de *N. meningitidis* in vivo

Comme décrit dans l'Introduction, les bactéries pathogènes du genre *Neisseria* subissent un stress oxydant généré par les cellules de l'hôte lors d'une infection. Il a été montré que la protéine PilB de *N. gonorrhoeae* serait impliquée dans la résistance de la bactérie au stress oxydant, et notamment au peroxyde d'hydrogène (Skaar *et al.*, 2002). D'autre part, il avait été également montré, par une approche de fractionnement subcellulaire, une localisation de PilB chez *N. gonorrhoeae* au niveau de la membrane externe uniquement (Skaar *et al.*, 2002). Cette localisation est incompatible avec l'utilisation de la DsbD, qui est une protéine transmembranaire de la membrane interne, comme partenaire réducteur (Brot *et al.*, 2006 et partie II des résultats). Dans ce contexte, il était nécessaire de localiser PilB dans le périplasme de *N. meningitidis* par rapport à son partenaire réducteur, la DsbD, et nous avons voulu également savoir si le rôle décrit dans la littérature (Skaar *et al.*, 2002) de PilB dans la résistance au stress oxydant était retrouvé chez *N. meningitidis*.

4.1. Localisation de PilB

4.1.1. PilB n'est pas une lipoprotéine

L'inspection de la séquence N-terminale de PilB montrait l'existence d'une séquence, qui bien que non consensus, peut permettre l'accrochage d'une chaîne lipidique qui ferait de PilB une lipoprotéine (Figure 72), comme cela a été montré pour les protéines DsbA1 et DsbA2 de *N. meningitidis* (Tinsley *et al.*, 2004).

PilB	MK	HRTFFSL	CAKFGCL	LLALGACS
DsbA1	MKLK	---	TLALTSLL	LALAACS
DsbA2	MKSK	---	HLALGVAA	LFALAACD
DsbA3	MKLK	---	HLLPLLLSAV	-LSACA

Figure 72 : Alignement des séquences N-terminales des protéines PilB, DsbA1, DsbA2 et DsbA3 de *N. meningitidis*.

DsbA1 et DsbA2 sont des lipoprotéines. Les résidus conservés dans au moins trois des séquences sont surlignés en jaune.

Pour les bactéries à Gram-négatif, la maturation d'une lipoprotéine se déroule en trois étapes (Figure 73) : 1) une lipidation du thiol de la Cys qui est localisée après le peptide signal par une diacylglyceryl transférase, 2) le clivage du peptide signal par la signal peptidase II, qui est une étape nécessaire à la troisième étape ; et 3) l'attachement d'une chaîne acyl sur le groupement amine de la Cys par une transacylase. La comparaison de la séquence du Nter de PilB avec celles des DsbA1, DsbA2 et DsbA3, montre bien la présence de la Cys en aval du peptide signal au niveau du domaine Nter de PilB de *N. meningitidis* ainsi qu'une séquence plus proche de celles des DsbA1 et DsbA2, qui sont des lipoprotéines, par rapport à celle de la DsbA3 qui n'en est pas une.

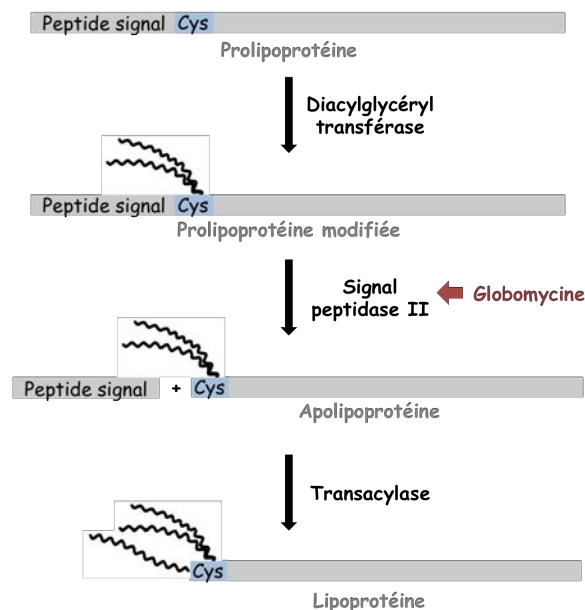


Figure 73 : Représentation des trois étapes de la maturation d'une lipoprotéine chez les bactéries à Gram-négatif.

La prolipoprotéine est lipidée sur la Cys située juste après le peptide signal par la diacylglyceryl transférase. La signal peptidase II clive ensuite le peptide signal et l'apolipoprotéine obtenue est ensuite modifiée par une transacylase qui ajoute une chaîne acyl sur le groupement amine de la Cys. La globomycine inhibe (flèche rouge) la Signal peptidase II.

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

Pour déterminer si PilB est une lipoprotéine ou non, nous avons donc utilisé une méthode décrite précédemment pour les DsbA de *N. meningitidis* (Tinsley *et al.*, 2004). Cette méthode consiste à cultiver les bactéries en présence ou en absence de globomycine. Comme indiqué dans la figure 73, la présence de globomycine dans le milieu de culture inhibe l'activité de la signal peptidase II, qui est responsable du clivage du peptide signal. Dans ces conditions, une différence de la masse apparente des lipoprotéines sera observée, due à l'absence de clivage du peptide signal et de la lipodation partielle de la Cys. Pour PilB, les masses attendues en absence et en présence de globomycine étaient respectivement de 58 580 et 56 560 Da.

Nous avons donc cultivé en milieu liquide la souche sauvage *siaD* de *N. meningitidis* en présence et en absence de globomycine jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,7 environ. Les cultures ont été arrêtées et 20 μ g de protéines totales ont été déposées sur SDS-PAGE 7,5 %, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. La présence de PilB a été mise en évidence par immunodétection en utilisant les anticorps anti-MsrB (Figure 74). La masse apparente de PilB ne semble pas affectée par l'utilisation de globomycine durant la croissance de *N. meningitidis*. En effet, la différence de migration entre les deux formes devrait être visible d'après la résolution du SDS-PAGE utilisé et la migration du marqueur de poids moléculaires (résultat non montré). Ce résultat suggère donc que PilB ne serait pas une lipoprotéine.

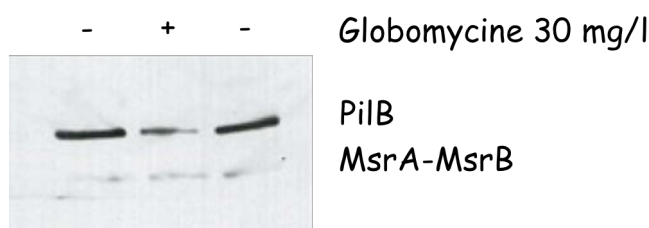


Figure 74 : PilB n'est pas une lipoprotéine

Immunodétection de la protéine PilB avec des anticorps anti-MsrB sur 20 μ g de protéines totales issues de cultures de la souche *siaD* de *N. meningitidis* en absence (-) et en présence (+) de globomycine déposées sur SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose.

4.1.2. PilB n'est pas ancrée à la membrane externe

Afin de localiser PilB dans le périplasme, nous avons tout d'abord réalisé des expériences de fractionnement subcellulaire soit par enrichissement des fractions en membrane interne et en membrane externe, soit par fractionnement des membranes par gradient de saccharose. Tous les résultats obtenus (en utilisant les anticorps anti-MsrB) ont montré que PilB est présente dans toutes les fractions membranaires, ainsi que dans les fractions solubles (résultats non montrés).

Comme les techniques classiques de séparation des membranes n'avaient pas permis de conclure sur la localisation de PilB, nous avons essayé de localiser directement la protéine PilB

dans les cellules *siaD* de *N. meningitidis* par microscopie électronique à transmission (MET) en utilisant les anticorps anti-MsrB couplés à des grains d'or (collaboration J. Gérard et Dr A. Brun-Jacob, UHP Nancy 1) (Figure 75). Les résultats indiquent que les grains d'or sont plutôt localisés autour du peptidoglycane surtout du côté de la membrane interne, mais pas au niveau de la membrane externe. Il est à noter que le marquage semble assez faible (peu de grains d'or visibles par cellules), mais il est très spécifique car aucun marquage n'a été observé en dehors des cellules et quelques grains d'or sont retrouvés dans le cytoplasme (forme MsrA-MsrB cytoplasmique).

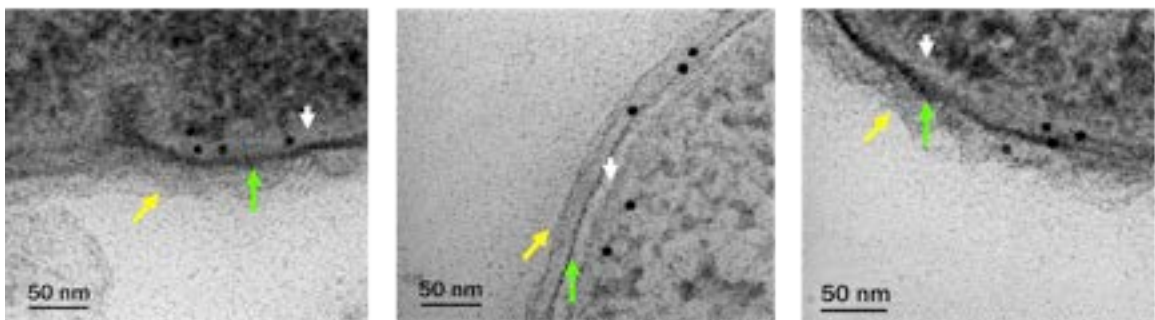


Figure 75 : Localisation de PilB par microscopie électronique à transmission sur des coupes *N. meningitidis*.

La protéine PilB est immunodétectée par des anticorps anti-MsrB. Les anticorps secondaires sont couplés à des grains d'or de 10 nm qui apparaissent en points noirs. La membrane externe, la membrane interne et le peptidoglycane sont indiqués respectivement par des flèches jaunes, blanches et vertes. Les trois clichés présentés sont représentatifs des différentes localisations observées sur l'ensemble des clichés. En prenant en compte l'ensemble des clichés, les grains d'or sont localisés à 80 % entre la membrane interne et le peptidoglycane et à 20 % à proximité du peptidoglycane du côté de la membrane externe.

4.2. Effet de la délétion du gène *pilB* chez *N. meningitidis*

Afin d'étudier le rôle de PilB de *N. meningitidis* dans la résistance au stress oxydant, il était nécessaire d'obtenir un mutant de *N. meningitidis* délété du gène *pilB*.

4.2.1. Délétion du gène *pilB*

La délétion du gène *pilB* par recombinaison homologue au site du gène a permis un remplacement du gène *pilB* par un gène de résistance à la kanamycine. Pour cela, nous avons inséré dans un plasmide non répliquatif chez *N. meningitidis* le gène de résistance à la kanamycine bordé des séquences amont et aval du gène *pilB*. Les détails des constructions génétiques utilisées sont expliqués dans la partie Matériels et Méthodes. La souche *siaD* de *N. meningitidis* a été transformée par ce plasmide, et les clones résistants à la kanamycine ont été sélectionnés. Nous avons vérifié par PCR et par immunodétection (anticorps anti-MsrB)

Recyclage des activités Msr dans la protéine PilB

que le gène *pilB* n'était plus présent et que la protéine PilB n'était plus exprimée (résultats non montrés). Les mutants ont été appelés mutant $\Delta pilB$.

4.2.2. Effet d'un stress oxydant sur une souche de *N. meningitidis* délété du gène *PilB*

Aucune différence significative de croissance n'a été observée entre la souche *siaD* de *N. meningitidis* et le mutant $\Delta pilB$ en milieu liquide en présence d' H_2O_2 (résultats non montrés). Par contre, en présence de 10 mM de paraquat, le taux de survie de la souche $\Delta pilB$ est plus faible que celui de la souche sauvage (Figure 76). Le paraquat génère des $O_2^{\cdot-}$ dans le cytoplasme et non dans le périplasme, ce qui signifie que la différence observée entre les deux souches est sans doute due à la protéine fusion MsrA-MsrB qui est cytoplasmique.

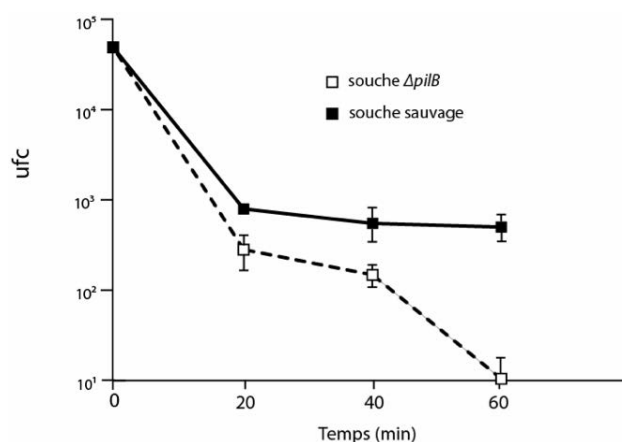


Figure 76 : Tests de survie de la souche sauvage et du mutant $\Delta pilB$ de *N. meningitidis* en présence de paraquat.

Les deux souches sont cultivées sur milieu solide GCB pendant une nuit à 37 °C, 5 % CO_2 . A partir de ces cultures, des suspensions cellulaires à DO_{600nm} égales à 0,05 sont préparées dans du milieu GCB liquide, puis incubées sous agitation à 37 °C, 5 % CO_2 jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} entre 0,2 et 0,4). Un aliquot de chaque culture est dilué dans 10 ml final de GCB liquide pour avoir une DO_{600nm} de 0,01 et 10 mM de paraquat sont ajoutés. Des aliquots de 10 ml sont étalés à 0, 20min, 40min et 60min après l'ajout de paraquat sur milieu solide GCB, et sont incubés à 37 °C, 5 % CO_2 toute la nuit. Les « unités formant colonies » (ufc) sont ensuite comptabilisées.

Partie II : La protéine nDsbD de *N. meningitidis*

Comme il a été décrit dans l'Introduction, la protéine DsbD périplasmique est le réducteur physiologique de nombreuses « Trx-like » périplasmiques comme la DsbE qui est impliquée dans la maturation des cytochromes *c* chez *E. coli*. La protéine DsbD est une protéine transmembranaire à trois domaines qui permet le transfert des électrons de la Trx cytoplasmique vers le périplasme (Figure 31 page 51). Les électrons passent, *via* différents centres disulfure redox, de la Trx au domaine transmembranaire tDsbD, puis au domaine C-terminal cDsbD qui possède un repliement de type Trx, et enfin au domaine N-terminal nDsbD, qui possède un repliement de type immunoglobuline. Ce dernier va ensuite réduire différentes cibles périplasmiques appartenant toutes à la famille des « Trx-like ».

L'étude structurale du domaine Nter de PilB de *N. meningitidis* (NmNter) avait révélé une structure de type Trx et plus précisément un repliement de type DsbE (Ranaivoson *et al.*, 2006), suggérant que PilB pouvait utiliser une DsbD comme donneur d'électrons. De plus, au début de ma thèse, une étude avait montré que le domaine nDsbD d'*E. coli* pouvait réduire le domaine Nter de la protéine PilB de *N. gonorrhoeae* (Brot *et al.*, 2006). Enfin, parallèlement à l'étude de PilB, le Dr A. Gand avait identifié et commencé à caractériser la DsbE de *N. meningitidis*, appelée DsbE1.

L'ensemble de ces données suggérait fortement l'existence d'une DsbD chez *N. meningitidis* qui pourrait être le partenaire réducteur physiologique du domaine NmNter de PilB et de la DsbE1 de *N. meningitidis*. Bien qu'aucun gène *dsbD* n'était annoté dans le génome de *N. meningitidis*, des recherches par identité de séquence ont permis d'identifier un gène codant une protéine possédant 32 % d'identité de séquence avec la DsbD d'*E. coli* (Figure 77). De plus, cette DsbD putative présente 98 % d'identité de séquence avec la DsbD putative de *N. gonorrhoeae*.

Dans ce contexte, le domaine N-terminal de la DsbD (nDsbD) putative de *N. meningitidis* a été surproduit dans *E. coli* et purifié, sous forme soluble, après délétion du peptide signal. J'ai étudié les propriétés biochimiques et enzymatiques de la nDsbD vis-à-vis de la réduction de différentes cibles, à savoir le domaine NmNter de PilB et la DsbE1 de *N. meningitidis*. En parallèle, tout un volet de biologie structurale par une approche RMN a été entrepris par le Dr M. Quinternet de l'équipe du Dr MT. Cung (UMR 7568 CNRS-INPL).

nDsbD de *N. meningitidis*

				1				10					20					30							40
DsbD coli	-----	MAQRIFTLIL	LLCSTSVFAGLFD	APGRSQFVP	ADQAF	AFDFQQNQ	-HDLNLTWQ	IKDGYLY																	
DsbD Nmen	-----	MKKLICL	FAVFLMLCGRAF	ALDANDLL	PPEKAF	VPPELAVAD	-DGVNVRFR	IADGYMY																	
DsbD Ngono	MRTNYLSETDSIMKKLICL	FAVFLMLCGRAF	ALDANDLL	PPEKAF	VPPELTVAD	-DGVNVRFR	IADGYMY																		
				↑				↑																	
		50		60		70		80		90			100												
DsbD coli		RKQIRITP--	EHAKIADVQLPQ	GVWHEDE	FYKSEIYRDRL	TLPTVINQASAG	-ATLTVTYQG	CADAGFC																	
DsbD Nmen		QAKIVGKTDP-	ADLLGQPSFSK	GEEKEDF	FFGRQTVYHHEA	QVAFPYAKAVGEPYKLVL	TYQGCAEAGVC																		
DsbD Ngono		QAKIVGKTDP-	ADLLGQPSFSK	GEEKEDF	FFGRQTVHHEA	QVAFPYAKAVGEPYKLVL	TYQGCAEAGVC																		
		110		120		130		140					150												
DsbD coli		YPPETKTVPLSEVVANNAAPQ	-PVSVPQ	-----	QEQPTAQLP	-----	-----	FSALWAL																	
DsbD Nmen		YPPVDTEFDIFGNGTYHPQTDEPAS	AKDRFLQ	PSSQNGSGALPPPKGDEGGDSRFKLSWDTLNANLLAFF																					
DsbD Ngono		YPPVDTEFDISGNGTYHPQTDEPAS	AKDRFLQ	PSSQNGSGALPPPKGDEGGDGRFKLSWDTLNANLLAFF																					
				↑		↑																			
		160		170		180		190		200			210					220							
DsbD coli		LIGIGIAFT	PVLPMPYPLISGIV	LGGKQRLSTARALL	TFIYVQGMALTY	TALGLVVAAG	LQFQAALQH																		
DsbD Nmen		LAGLGLSFTA	CMYPLLPIVSSIVGDK	-KAGKARAFV	LSVVYVQGLALTY	TLVGIVAGLT	GALLTVWLQ																		
DsbD Ngono		LAGLGLSFTA	CMYPLLPIVSSIVGDK	-KAGKARAFV	LSVVYVQGLALTY	TLVGIVAGLT	GALLTVWLQ																		
		230		240		250		260		270			280					290							
DsbD coli		PYVLIGLAIVFTL	LAMSMFGLFTL	QLPSSLQTRLTLM	SNRQQGGSPGGVFV	MGAIAGLICSP	TTAPLSA																		
DsbD Nmen		AWVLAASALMVV	LALSMFGLFNI	QLPNAVQSYFQNG	SSRLSGGKIVSVFI	MGILSALIVGP	VAPPLAF																		
DsbD Ngono		AWVLAASALMVV	LALSMFGLFNI	QLPNAVQSYFQNG	SSRLSGGKIVSVFI	MGILSALIVGP	VAPPLAF																		
		300		310		320		330		340			350					360							
DsbD coli		ILLYIAQSGNMW	LGGGLYLYALGMGL	PLMLITVFGNRL	LPKSGPWMEQVK	TAFFGVIL	LALPVLLERVI																		
DsbD Nmen		ALGYIGQTGDAV	LGGGLALYTLALGT	VPLIAIGTFGGHIL	LPKAGDWMNAV	KYAFGFILL	LAVAVYLATPHL																		
DsbD Ngono		ALGYIGQTGDAV	LGGGLALYTLALGT	VPLIAIGTFGGHIL	LPKAGDWMNAV	KYAFGFILL	LAVAVYLATPHL																		
		370		380		390		400					410												
DsbD coli		GDVWGLRLWSAL	LGVA-FFGWAFITSL	QAKRGWMRIVQI	---ILLAAA	-----	LVSVRPL	LQDWAFFG---																	
DsbD Nmen		PYYLVVALYTL	MLVPAFMLLVNGRRQ	KRRPKAVAFALGGIL	LIGGAWFGWQ	GANGKTTAL	HHFLT	LNPP																	
DsbD Ngono		PYYLVVALYTL	MLVPAFMLLVNGRRQ	KRRPKAVAFALGSIL	LIGGAWFGWQ	GANGKTTAL	HHFLT	LNPP																	
		420		430		440		450		460			470					480							
DsbD coli		-ATHTAQTQTHL	NFTQIKTVDELNQAL	VEAKGKPYMLD	LYADWCVACKE	FEKYTFSDPQV	QKALADTVLL																		
DsbD Nmen		AEAGKSSEHGKMFADTA	AALKAAMDALKEHPDK	PVVLDFYADWCISCKE	MAAYTLNQPEV	HQAVDMERFF																			
DsbD Ngono		AEAGKFSEHGKMFADTA	AALKAAMDALKEHPDK	PVVLDFYADWCISCKE	MAVYTLNQPEV	HQAVDMERFF																			
		490		500		510		520		530			540												
DsbD coli		QANVTANDAQDV	ALLKHLNVLGL	PTILFFDGQG	QEHQPQARVT	GFMDAET	FAHLRDRQP																		
DsbD Nmen		QIDVTANTPEHQ	ALLKEYGLFGPP	GVFVVRSDGS	--RSEPLLGFVKADKE	IEWYEQNR																			
DsbD Ngono		QIDVTANTPEHO	ALLKEYGLFGPP	GVFVVRADGS	--RSEPLLGFVKADKE	IEWYEONR																			

Figure 77 : Alignement des séquences des protéines DsbD d'*E. coli*, de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae*. La numérotation indiquée est celle de la nDsbD d'*E. coli*, les résidus conservés sont surlignés en jaune et les six cystéines essentielles en rouge. Les flèches indiquent les extrémités N- et C-terminales des protéines nDsbD d'*E. coli* (gris) et de *N. meningitidis* (noir) produites sous forme soluble.

1. Caractérisation *in vitro* de la nDsbD de *N. meningitidis*

1.1. Production et purification de la nDsbD sauvage de *N. meningitidis* et de différents mutants

Afin d'obtenir la nDsbD de *N. meningitidis* sous forme soluble, la séquence d'ADN codant le domaine N-terminal de la DsbD a été clonée, sans l'extrémité N-terminale qui correspond au signal d'export vers le périplasma et sans la séquence C-terminale correspondant aux domaines transmembranaire et C-terminal. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les alignements de séquences avec la protéine DsbD d'*E. coli* qui était déjà caractérisée (Figure 77). Le clonage a été réalisé dans un vecteur d'expression de type pET20b.

La protéine a été surproduite dans une souche C41(DE3) d'*E. coli* dans un milieu auto-inductible ZYM à 37 °C pendant 18 h. Le protocole de purification suivant a été mis au point. Le surnageant de sonication a d'abord subi une précipitation fractionnée à 40 % puis à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le surnageant de précipitation a ensuite été déposé sur une colonne de gel filtration (ACA 54), et les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été rassemblées et injectées sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions (Q-Sépharose). Enfin, les fractions contenant la protéine ont été déposées sur une colonne de chromatographie hydrophobe (Phényl-Sépharose).

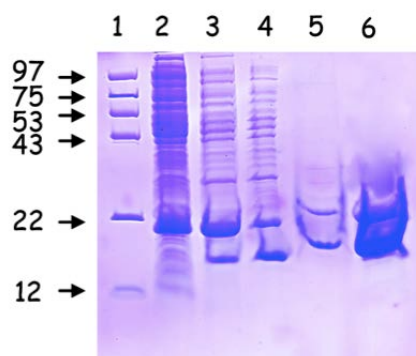


Figure 78 : Vérification par électrophorèse SDS-PAGE des différentes étapes de purification de la nDsbD de *N. meningitidis*.

1. Marqueur de taille en kDa ; 2. Surnageant de sonication ; 3. Culot de précipitation à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium ; 4. Après gel filtration ACA54 ; 5. Après Q-Sépharose ; 6. Après Phényl-Sépharose.

La pureté de la protéine a ensuite été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 78) et par détermination de la masse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes. L'analyse du profil SDS-PAGE de la nDsbD purifiée montre la présence de deux bandes de masse apparente 15 et 22 kDa. La masse théorique de la protéine est de 14 040 Da et l'analyse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes montre la présence d'une seule et unique masse de 14 039 Da (spectres non montrés). Bien que la spectrométrie de masse ne soit pas quantitative, l'existence de deux

populations de masses différentes en quantité quasiment équivalente au vu du gel SDS-PAGE aurait dû être observée en spectrométrie de masse. Ceci montre que les deux bandes observées sur gel correspondent à deux états de la protéine, peut-être des états d'oxydation différents malgré la présence de DTT. Les rendements de purification sont de l'ordre de 150 mg par litre de culture.

Deux mutants de la nDsbD de *N. meningitidis*, à savoir les mutants C103S et C109S, ont été obtenus par mutagenèse dirigée. Pour cela les codons correspondant aux deux cystéines ont été remplacés par un codon sérine, à partir de la construction pET20b décrite précédemment. Les mutants C103S et C109S ont ensuite été produits et purifiés selon le même protocole que celui utilisé pour l'enzyme sauvage, et une seule bande sur SDS-PAGE a été observée (résultat non montré).

1.2. Caractérisation biochimique de la nDsbD de *N. meningitidis*

1.2.1. Détermination des pK_a des cystéines de la nDsbD de *N. meningitidis*

La séquence de la nDsbD montre la présence de deux résidus cystéine (Figure 77) qui sont titrables par le DTNB en conditions natives (résultats non montrés).

La titration des pK_{app} des cystéines de la nDsbD sauvage et des deux mutants monocystéiniques (C103S et C109S) a été réalisée en utilisant le réactif chimique 2-PDS dont le pK_a est de 4,3. Ceci nous a permis de titrer les cystéines dans une zone de pH allant de 5,5 à 10 pour lesquels l'enzyme sauvage ainsi que les deux mutants monocystéiniques sont stables. Dans le cas de l'enzyme sauvage, deux moles de PDS sont libérées par mole de nDsbD et l'ajout de réducteur après réaction avec le 2-PDS ne conduit pas à la libération de PDS, ce qui montre que la titration par le 2-PDS entraîne la formation d'un pont disulfure intramoléculaire (résultats non montrés).

Pour la nDsbD sauvage, la réaction suit une cinétique de pseudo premier ordre avec, comme indiqué ci-dessus, la formation de deux moles de PDS par mole d'enzyme. La courbe représentant la constante k_2 (constante de vitesse de deuxième ordre) en fonction du pH s'ajuste sur une monosigmoïde avec une valeur de pK_{app} supérieure à 9 (pK_{app} de 9,9) et une valeur de k' de $2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 79). Pour les deux mutants monocystéiniques, C103S et C109S, la réaction suit également une cinétique de pseudo premier ordre avec la formation d'une mole de PDS par mole d'enzyme. Les courbes représentant la constante k_2 en fonction du pH s'ajustent sur une monosigmoïde avec des valeurs de pK_{app} supérieures à 9 pour les Cys103 et Cys109 (pK_{app} de 10,1 pour les deux cystéines) et des valeurs de k' respectivement de $0,6 \cdot 10^5$ et $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

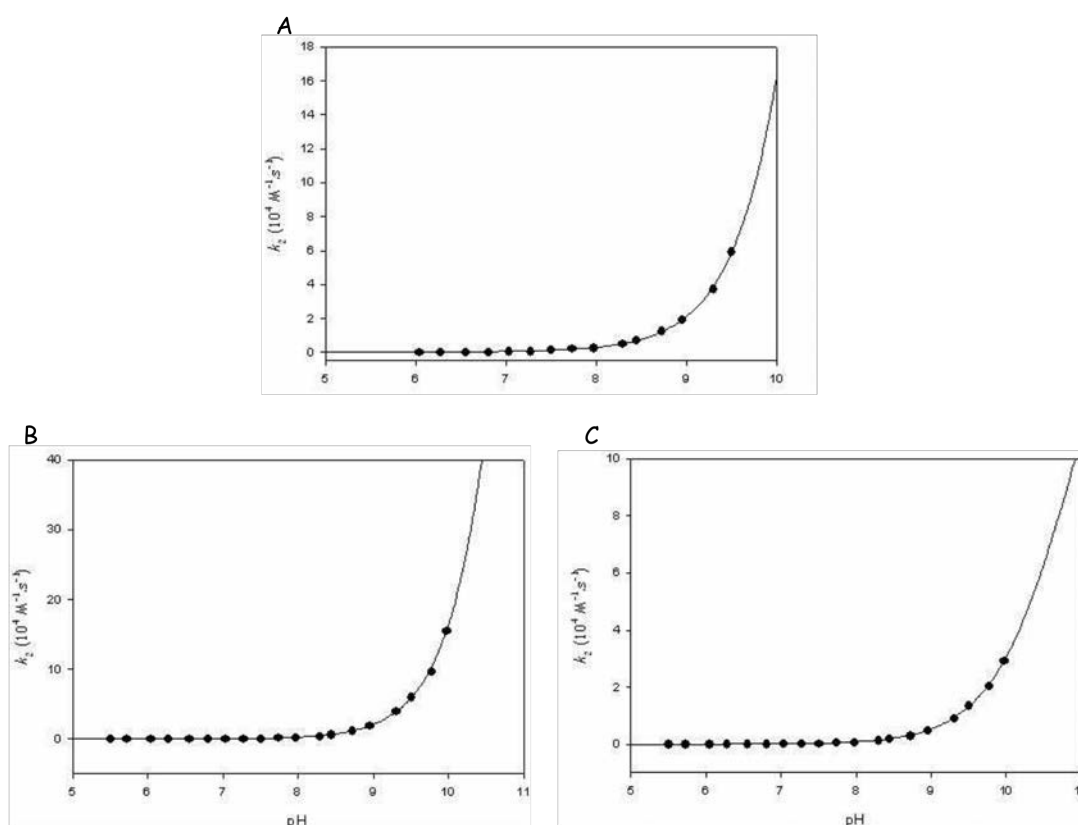


Figure 79 : Variation de la constante de deuxième ordre k_2 en fonction du pH correspondant à la réaction des groupements thiols libres de la nDsbD de *N. meningitidis* sauvage (A) ou des mutants C103S (B) et C109S (C) avec le 2-PDS.

Les expériences ont été réalisées à 25 °C avec un polytampon Tris 120 mM, imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM de pH 6 à 9,5 pour l'enzyme sauvage et de pH 5,5 à 10 pour les mutants C103S et C109S. Pour chaque expérience, la concentration en enzyme est de 10 μ M, et celle en 2-PDS est de 200 μ M. Les valeurs de k_2 ont été ajustées à l'équation d'une monosigmoïde croissante ($f = y + (k' / (1 + 10^{(pK_a - pH)}))$) et les paramètres obtenus sont les suivants : (A) $pK_{app} = 9,9 \pm 0,1$ et $k' = (2,1 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, (B) $pK_{app} = 10,1 \pm 0,1$ et $k' = (3,0 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (C) $pK_{app} = 10,1 \pm 0,1$ et $k' = (0,6 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les points représentent les valeurs expérimentales et les traits continus représentent les ajustements.

Les valeurs de pK_{app} des deux cystéines sont du même ordre de grandeur, cependant la vitesse de réaction de ces deux cystéines vis-à-vis du 2-PDS est différente, la constante de vitesse associée à la réaction de la Cys109 étant cinq fois plus élevée que celle associée à la réaction de la Cys103. Cette différence peut refléter une petite différence de réactivité ou d'accessibilité. Des études précédentes ont montré que le groupement thiol du GSH, qui mime un thiol d'une cystéine dans une chaîne polypeptidique, présentait une valeur de pK_a de 8,9 avec une valeur de k' de $0,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Marchal *et al.*, 1999). Le fait que les valeurs des constantes k' des deux cystéines de nDsbD soient supérieures ou égales à la valeur de la constante k' déterminée pour le GSH, montre que les deux cystéines de la nDsbD sont toutes les deux très accessibles, et que la Cys109 pourrait être un peu plus réactive que la Cys103. Dans l'enzyme sauvage, une seule valeur de pK_{app} est observée. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans ces conditions la Cys103 attaquerait la Cys109 activée par le PDS pour former un pont disulfure intramolécule, la réaction intramolécule étant très favorable d'un point de

vue entropique. Dans ce cas, la vitesse de la réaction intramoléculaire serait limitée par celle de la réaction de deuxième ordre entre la Cys109 et le 2-PDS. Le pKapp observé serait donc celui de la Cys109.

Enfin, dans le cas de l'enzyme sauvage, les cystéines présentent des valeurs de pKapp élevées et proches de la valeur observée pour le GSH. L'ensemble de ces données montre que les cystéines ne sont pas activées dans l'enzyme libre, par rapport à une Cys libre.

1.2.2. Détermination du potentiel redox de la nDsbD de *N. meningitidis*

L'approche expérimentale couramment utilisée pour déterminer le potentiel redox des disulfure oxydoréductases consiste à quantifier à l'équilibre, avec le GSH, les formes oxydées et réduites de la protéine par le suivi de l'émission de fluorescence des formes redox de la protéine. Un pré-requis à l'utilisation de cette approche est l'existence d'une différence d'émission de fluorescence entre les formes réduites et oxydées, ce qui est le cas pour la nDsbD d'*E. coli* (Rozhkova *et al.*, 2004).

1.2.2.a. Propriétés d'émission de fluorescence de la nDsbD de *N. meningitidis*

Les propriétés de fluorescence de la nDsbD d'*E. coli* sont liées essentiellement à la présence de Trp, et dans une moindre mesure de Tyr. L'inspection de la séquence de la nDsbD de *N. meningitidis* montre l'absence de Trp et la présence de neuf Tyr, contrairement à la séquence de la nDsbD d'*E. coli* qui possède deux Trp et sept Tyr. Ceci suggère que la nDsbD de *N. meningitidis* doit présenter une intensité d'émission de fluorescence plus faible que la nDsbD d'*E. coli* et de ce fait peu de différence significative entre les spectres d'émission de fluorescence des formes réduite et oxydée.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la nDsbD de *N. meningitidis* présentent une longueur d'onde maximale d'excitation centrée à 282 nm et une longueur d'onde maximale d'émission vers 305 nm. De plus, une très faible différence d'intensité d'émission de fluorescence est observée entre la forme réduite et la forme oxydée (Figure 80). Par contre, la nDsbD d'*E. coli* utilisée comme témoin présente une intensité d'émission de fluorescence beaucoup plus élevée dans les mêmes conditions avec une longueur d'onde maximale d'émission centrée à 350 nm et une différence d'intensité d'émission de fluorescence entre les deux formes réduite et oxydée (Figure 80). La longueur d'onde maximale d'émission des Tyr est de 303 nm dans l'eau, alors qu'elle est de 348 nm pour les Trp. Cela confirme ce que nous avons émis comme hypothèse dans la mesure où la nDsbD de *N. meningitidis* ne

possède pas de tryptophane. Par conséquent, il ne nous a pas été possible d'utiliser cette approche pour déterminer le potentiel redox de la nDsbD de *N. meningitidis*.

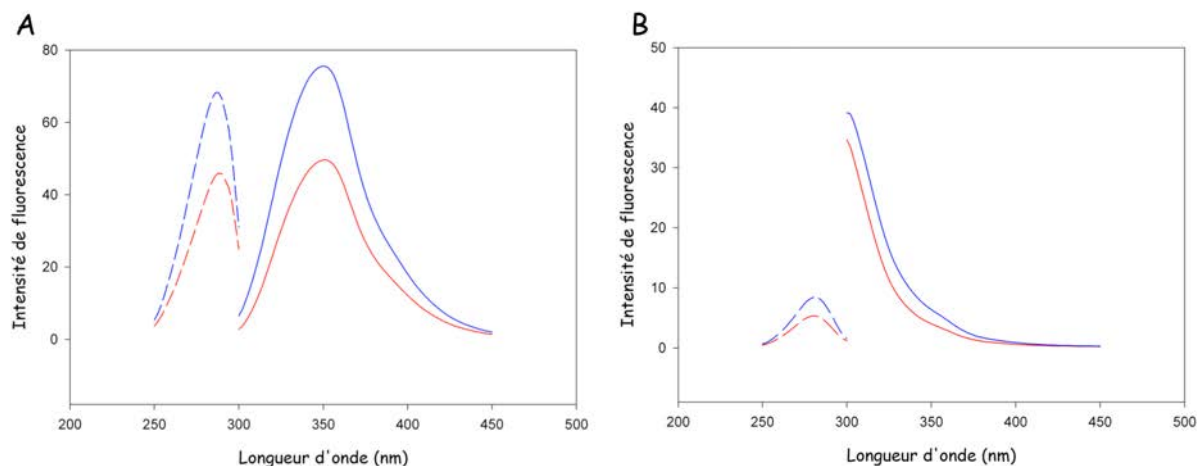


Figure 80 : Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la nDsbD d'*E. coli* (A) et de *N. meningitidis* (B).

Les spectres d'excitation (émission suivi à 340 nm) et d'émission (excitation à 282 nm) ont été enregistrés avec 10 μ M de protéines à 25 °C en tampon TE pH 8,0. Les spectres d'excitation de fluorescence sont en pointillés bleus pour la forme réduite et rouge pour la forme oxydée. La nDsbD d'*E. coli* a été surproduite et purifiée de la même manière que celle de *N. meningitidis* (résultats non montrés).

1.2.2.b. Potentiel redox de la nDsbD de *N. meningitidis*

Pour déterminer le potentiel redox de la nDsbD de *N. meningitidis*, nous avons donc utilisé une autre méthode basée sur la quantification des formes réduite et oxydée présentes à l'équilibre avec la Trx P34H ($E^\circ = -235$ mV, Krause *et al.*, 1991) par chromatographie en phase inverse. Ainsi, nous avons laissé évoluer deux mélanges équimolaires de Trx P34H réduite / nDsbD oxydée, et de Trx P34H oxydée / nDsbD réduite jusqu'à l'équilibre. Puis les différentes espèces ont été quantifiées par chromatographie en phase inverse C8 (voir Matériels et Méthodes). D'autre part, des mélanges témoins ne contenant qu'une forme d'une seule protéine (Trx P34H réduite, Trx P34H oxydée, nDsbD réduite et nDsbD oxydée) ont été traités de la même façon afin de quantifier une possible oxydation spontanée. Ainsi, nous avons pu déterminer les quantités relatives des formes oxydées et réduites des deux protéines dans les deux mélanges. Les constantes d'équilibre des deux mélanges ont ensuite été déterminées grâce à l'équation suivante :

$$K_{eq} = [\text{TrxP34H réduite}][\text{nDsbD oxydée}] / [\text{Trx P34H oxydée}][\text{nDsbD réduite}]$$

Les potentiels redox ont été calculés grâce à l'équation de Nernst en utilisant une valeur de -235 mV pour le potentiel redox de la Trx P34H.

$$E'_0 = E'_0 \text{ Trx P34H} - (RT/nF) \ln K_{\text{éq}}$$

Un potentiel redox d'une valeur de -260 ± 6 mV a ainsi été déterminé pour la nDsbD de *N. meningitidis* à partir de quatre expériences indépendantes. Cette valeur confirme le caractère réducteur de la nDsbD de *N. meningitidis* vis-à-vis de ses partenaires potentiels qui possèdent des potentiels redox de -232 mV pour le domaine Nter de PilB (Wu *et al.*, 2005) et de -203 mV pour la DsbE1 de *N. meningitidis* (Thèse Dr. Adeline Gand) (Figure 81).

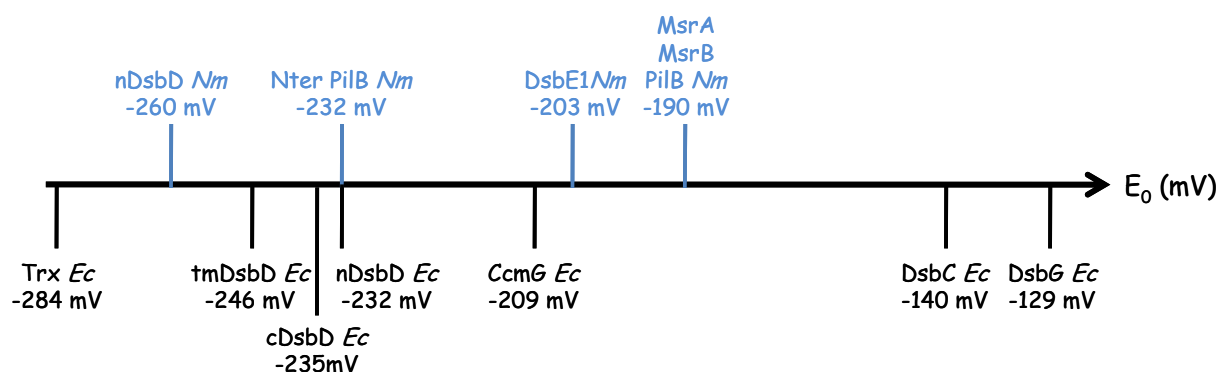


Figure 81 : Valeurs des potentiels redox des protéines nDsbD d'*E. coli* et de *N. meningitidis* et de leurs partenaires (adapté de Rozhkova et Glockshuber, 2008).

Les valeurs des potentiels redox des protéines d'*E. coli* (*Ec*) proviennent de l'étude faite par Rozhkova et Glockshuber, 2008, et ceux des protéines de *N. meningitidis* (*Nm* en bleu) ont été déterminés au laboratoire (Wu *et al.*, 2006 et résultats non publiés).

1.3. Propriétés de la nDsbD de *N. meningitidis* en tant que disulfure oxydoréductase

Nous avons suivi par fluorescence la réduction des domaines Nter oxydés de PilB de *N. meningitidis* et de la DsbE1 oxydée de *N. meningitidis*, par la nDsbD réduite de *N. meningitidis* en conditions de cycle catalytique unique. La nDsbD ne présentant pas de différence significative d'émission de fluorescence lors de son passage de sa forme réduite à sa forme oxydée (paragraphe 1.2.2.a), si une variation d'émission de fluorescence est observée lors de la réaction, elle correspondra au passage des formes oxydées du Nter de PilB ou de la DsbE1 à leurs formes réduites. Or, des études réalisées au laboratoire ont montré que, pour ces deux « Trx-like », le passage de la forme oxydée sous forme pont disulfure à la forme réduite entraîne une importante augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence (de 60 % environ), et ce, majoritairement liée à la présence d'un résidu Trp au niveau du site actif (Wu *et al.*, 2006 ; Dr A. Gand résultats non publiés).

Pour le domaine NmNter de PilB et pour des concentrations en nDsbD allant de 50 à 500 μ M, une augmentation du signal d'émission de fluorescence est bien observée (Figure 82).

Les courbes obtenues s'ajustent sur l'équation d'une monoexponentielle croissante ($y = y_0 + \text{Amp}(1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$). Pour chaque concentration en nDsbD, une valeur de k_{obs} a été obtenue. La variation de la valeur du k_{obs} en fonction de la concentration en nDsbD s'ajuste à l'équation d'une droite et donne une valeur de k_2 de $6,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 82). Aucune saturation n'est observée jusqu'à 500 μM en nDsbD, ce qui montre que la constante d'affinité apparente K_s de la nDsbD pour le domaine NmNter est supérieure à 500 μM . Des résultats similaires ont été obtenus avec le domaine Nter oxydé dans la protéine PilB entière de *N. meningitidis* (k_2 de $2,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et le domaine Nter oxydé de PilB de *F. nucleatum* (k_2 de $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

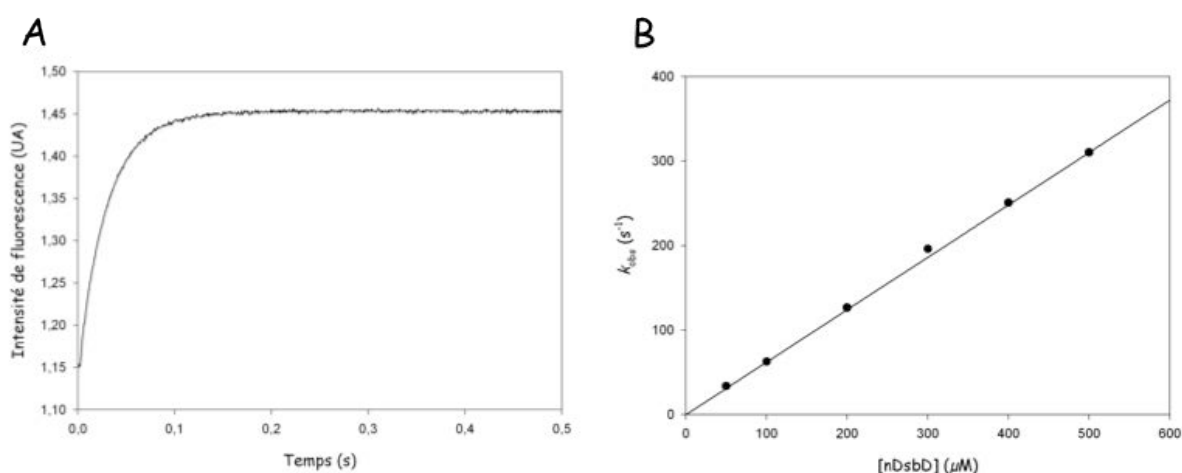


Figure 82 : Cinétique de la réduction du domaine Nter oxydé de PilB de *N. meningitidis* par la nDsbD de *N. meningitidis*.

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence du domaine Nter de PilB, qui passe de sa forme oxydée à sa forme réduite, à l'état pré-stationnaire avec un appareil de cinétique rapide (« stopped flow »). Les expériences ont été réalisées à 25 °C, en tampon TE pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 284 nm et seules les longueurs d'ondes d'émission supérieures à 320 nm ont été collectées grâce à un filtre. La concentration en NmNter sous forme oxydée est de 10 μM et celle en nDsbD réduite varie de 50 à 500 μM . Les valeurs expérimentales (k_{obs}) obtenues pour chaque concentration en nDsbD ont été ajustées à l'équation d'une droite ($y = ax + b$) et une valeur de k_2 de $(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a été ainsi déduite.

Pour la DsbE1 et pour des concentrations en nDsbD allant de 50 à 500 μM , une augmentation du signal d'émission de fluorescence est également observée (courbes non montrées). Les courbes obtenues s'ajustent sur l'équation d'une monoexponentielle croissante ($y = y_0 + \text{Amp}(1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$). Pour chaque concentration en nDsbD, une valeur de k_{obs} a été obtenue. La variation des valeurs de k_{obs} en fonction de la concentration en nDsbD s'ajuste à l'équation d'une droite et donne une valeur de k_2 de $1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 83). Aucune saturation n'est observée jusqu'à 500 μM en nDsbD, ce qui signifie que la constante d'affinité apparente K_s de la nDsbD pour la DsbE1 est supérieure à 500 μM .

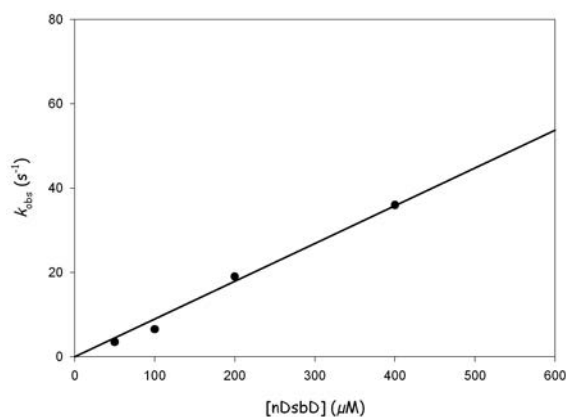


Figure 83 : Cinétique de la réduction de la DsbE1 oxydée de *N. meningitidis* par la nDsbD de *N. meningitidis*.

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence de la DsbE1, qui passe de sa forme oxydée à sa forme réduite, à l'état pré-stationnaire avec un appareil de cinétique rapide (« stopped flow »). Les expériences ont été réalisées à 25 °C, en tampon TE pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 284 nm et seules les longueurs d'ondes d'émission supérieures à 320 nm ont été collectées grâce à un filtre. La concentration en DsbE1 sous forme oxydée est de 10 μM et celle en nDsbD réduite varie de 50 à 400 μM. Les valeurs expérimentales (k_{obs}) obtenues pour chaque concentration en nDsbD ont été ajustées à l'équation d'une droite ($y = ax + b$) et une valeur de k_2 de $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a ainsi été déduite.

L'ensemble de ces résultats montre que la nDsbD est capable de réduire le domaine NmNter de PilB et la DsbE1 avec des constantes de vitesses de deuxième ordre de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.4. Étude structurale et dynamique du complexe covalent entre la nDsbD et le domaine Nter de PilB de *N. meningitidis* par RMN

L'étude structurale par RMN d'un complexe entre la nDsbD de *N. meningitidis* et le domaine NmNter de PilB de *N. meningitidis* a été réalisée dans le but d'obtenir non seulement des informations sur les facteurs structuraux impliqués dans la reconnaissance entre ces deux partenaires mais aussi sur la dynamique de formation du complexe binaire.

Les résultats présentés précédemment (voir paragraphe 1.3) montrent que l'affinité entre les deux partenaires est faible ($K_S > 500 \text{ μM}$), puisqu'aucune cinétique de saturation n'a pu être observée dans la gamme de concentration en nDsbD utilisée. En vue d'obtenir la structure tridimensionnelle d'un complexe, la seule stratégie possible était de disposer d'un complexe chimiquement stable entre un mutant monocystéinique du domaine NmNter (appelé dans cette partie NterPilB) et un mutant monocystéinique de la nDsbD, *via* la formation d'un pont disulfure intermoléculaire correspondant au pont disulfure intermoléculaire se formant dans le complexe NterPilB / nDsbD transitoire. En effet, ce dernier doit se former dans l'étape d'échange de pont disulfure qui suit la formation du complexe NterPilB_{ox} / nDsbD_{réd} lors de

l'étape de réduction du domaine NterPilB par la nDsbD (Figure 84). Un préalable à l'étude d'un tel complexe est de connaître les cystéines de NterPilB et nDsbD impliquées dans la formation transitoire de ce pont disulfure intermoléculaire.

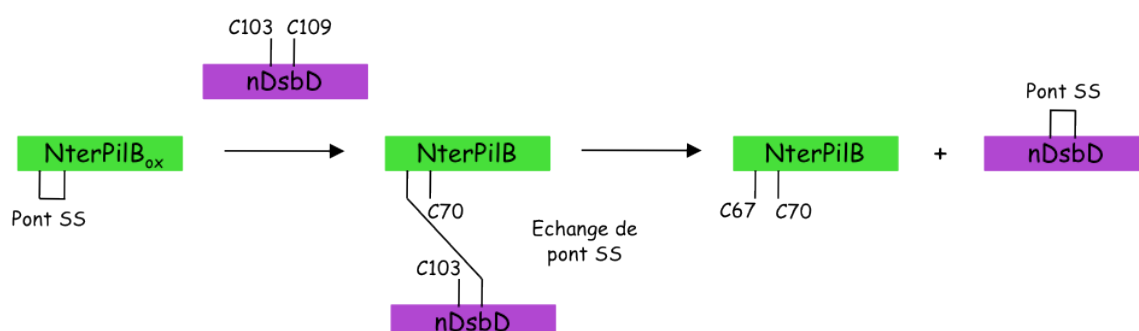


Figure 84 : Représentation schématisée simplifiée de la réduction du domaine NterPilB par la nDsbD.

Le domaine Nter de PilB appartient à la famille des « Trx-like ». Or, il a été montré que pour la Trx, la cystéine impliquée dans le pont disulfure transitoire avec le partenaire était la cystéine catalytique. Ce serait donc la Cys67 du domaine Nter de PilB de *N. meningitidis* qui serait impliquée dans le pont disulfure transitoire. De ce fait, nous avons utilisé le mutant C70S de NterPilB pour former le complexe covalent avec la nDsbD.

Pour la nDsbD, la cystéine impliquée dans le pont disulfure intermoléculaire a été identifiée par une méthode basée sur des critères cinétiques.

1.4.1. Caractérisation de la cystéine de la nDsbD impliquée dans le pont disulfure transitoire avec le domaine Nter de PilB

Les résultats obtenus précédemment pour déterminer les pKapp des cystéines de la nDsbD de *N. meningitidis* ont montré que les deux cystéines sont accessibles, avec une valeur de k' cinq fois supérieure pour la Cys109 (voir paragraphe 1.2.1), suggérant que la Cys109 pourrait être la cystéine responsable de l'attaque sur le pont disulfure de NterPilB_{ox}. Afin de le confirmer, nous avons déterminé les efficacités catalytiques (k_2) des réactions de réduction du domaine Nter de PilB oxydé par les deux mutants C103S et C109S en utilisant la même approche que pour la nDsbD sauvage de *N. meningitidis* (voir paragraphe 1.3). En effet, nous avons vérifié que le passage de la forme réduite du domaine Nter de PilB à la forme pont disulfure intermoléculaire avec les mutants C103S et C109S se traduit bien par une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence (résultats non montrés) comme cela avait été observé lors du passage à la forme oxydée sous forme pont disulfure (intensité deux fois plus faible). Les résultats montrent que la vitesse de formation du pont disulfure en terme de k_2 avec le mutant C103S (k_2 de $(1,85 \pm 0,04) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est dix fois plus efficace que celle avec le

mutant C109S (k_2 de $(1,78 \pm 0,05) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figure 1B Annexe 3 page 167). Ceci suggère que la Cys109 est la cystéine impliquée dans la formation du pont disulfure transitoire avec le domaine Nter de PilB. Nous avons donc préparé et caractérisé le complexe covalent entre les mutants C103S nDsbD et C70S Nter de PilB.

1.4.2. Analyse structurale et dynamique du mutant C103S de la nDsbD par RMN

Dans un premier temps, il était nécessaire de résoudre la structure tridimensionnelle du mutant C103S de la nDsbD avant de résoudre celle où le mutant C103S est en complexe covalent avec le domaine Nter de PilB, dont la structure tridimensionnelle déterminée par rayons X était par ailleurs connue (Ranaivoson *et al.*, 2006). Nous avons donc résolu par RMN la structure du mutant C103S de la nDsbD après s'être assuré que les spectres bidimensionnels HSQC $^1\text{H}^{15}\text{N}$ de la nDsbD sauvage et de ce mutant étaient parfaitement superposables. L'attribution des fréquences de résonance du mutant C103S de la nDsbD a fait l'objet d'une première publication (Annexe 1 page 147) dans laquelle l'ensemble des travaux de biologie structurale ont été réalisés par le Dr M. Quinternet.

L'étude de la structure tridimensionnelle et de la dynamique du squelette du mutant C103S de la nDsbD de *N. meningitidis* a fait l'objet d'une seconde publication (Annexe 2 page 151). Les résultats obtenus montrent que la nDsbD adopte comme attendu un repliement de type immunoglobuline, caractérisé par la présence d'un motif sandwich β (Figure 85). L'inspection de la structure montre l'existence d'une boucle appelée « cap-loop » reliant les brins $\beta 6$ et $\beta 7$, qui recouvre les résidus Cys103 et Cys109 du site actif, et le cycle aromatique du résidu Phe70 contenu dans cette boucle pourrait contrôler l'entrée de la cavité. L'analyse de la dynamique de la protéine montre que les parties N- et C-terminales sont très flexibles ainsi que deux boucles situées à l'opposé du site actif. Enfin, la région formée des brins $\beta 6$ et $\beta 7$ présente une mobilité particulière, qui pourrait être importante pour l'adaptation de la nDsbD à ses différents partenaires substrats.

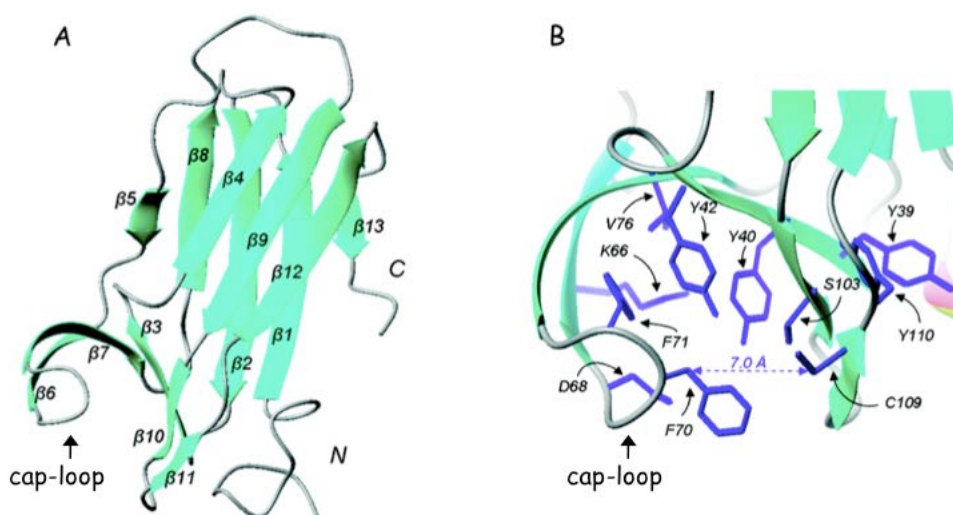


Figure 85 : Représentation de la structure tridimensionnelle (A) et du site actif (B) du mutant C103S nDsbD (Quinternet *et al.*, 2009).

Les structures secondaires brins β sont en verts. Les chaînes latérales des résidus du site actif sont représentées en bleu.

Annexe 1 page 147

M. Quinternet, **L. Selme**, C. Beaufils, P. Tsan, C. Jacob, S. Boschi-Muller, MC. Averlent-Petit, G. Branlant and MT. Cung

^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*.

Biomolecular NMR Assignments, 2:85-87, 2008

Annexe 2 page 151

M. Quinternet, P. Tsan, **L. Selme**, C. Beaufils, C. Jacob, S. Boschi-Muller, MC. Averlent-Petit, G. Branlant and MT. Cung

Solution Structure and Backbone Dynamics of the Cysteine 103 to Serine Mutant of the N-Terminal Domain of the DsbD from *Neisseria meningitidis*.

Biochemistry, 47, 12710-12720, 2008

1.4.3. Etude structurale et dynamique du complexe covalent entre la nDsbD et le domaine Nter de PilB par RMN

Le complexe covalent *via* une liaison covalente entre la Cys67 de NterPilB et la Cys109 de la nDsbD a été obtenu par activation du mutant C70S NterPilB par le DTNB (Figure 86). Pour cela, le mutant C70S NterPilB a été traité avec un excès de DTNB, ce qui a conduit à la formation d'un adduit NterPilB-TNB. Après purification du mutant activé, le mutant C103S de la nDsbD a été rajouté en quantité stœchiométrique. Le complexe a ensuite été purifié par gel filtration (Superdex 75) et sa pureté a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 1C, Annexe 3 page 167).

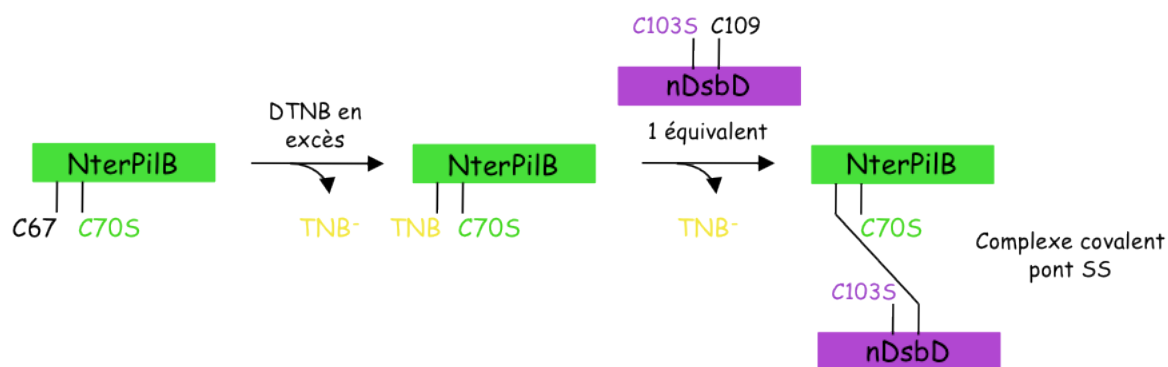


Figure 86 : Formation d'un complexe covalent via un pont disulfure intermoléculaire entre le mutant C70S du domaine NterPilB et le mutant C103S de la nDsbD

Pour l'étude RMN, différents complexes covalents ont été générés en utilisant des mutants protéiques marqués ou non par les isotopes ^{15}N , $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ et $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$. Afin de faciliter l'attribution des signaux RMN, deux types d'échantillons ont été analysés par le Dr M. Quinternet ; un complexe où seul le mutant C70S NterPilB est marqué (aucun signal provenant du mutant C103S nDsbD), et un complexe où seul le mutant C103S nDsbD est marqué (aucun signal provenant du mutant C70S NterPilB).

L'étude structurale et dynamique du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB a fait l'objet d'une troisième publication (Annexe 3 page 165).

Les résultats montrent que globalement la structure de chacun des partenaires est conservée. La « cap-loop » de la nDsbD s'ouvre et se positionne au-dessus de l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB (Figure 86). Elle conserve par ailleurs des propriétés dynamiques remarquables. Cette flexibilité pourrait aider la nDsbD à reconnaître ses différents partenaires. La boucle FLHE (spécifiques du domaine Nter par rapport aux DsbE) se positionne à proximité des brins $\beta 10$ et $\beta 12$, mais ne montre pas de grande variation dynamique par rapport à l'état libre de NterPilB, suggérant que cette boucle ne joue pas de rôle dans la reconnaissance entre les deux partenaires. Enfin, une autre zone d'interaction a été identifiée à proximité du pont disulfure formé. Cette zone est constituée des boucles $\alpha 4$ - $\beta 4$ et $\beta 5$ - $\alpha 5$ et de l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB, ainsi que des segments 13-15 et 107-111 de nDsbD. De plus, l'analyse dynamique du complexe suggère qu'un transfert de mouvement pourrait s'opérer entre la « cap-loop » de nDsbD et l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB.

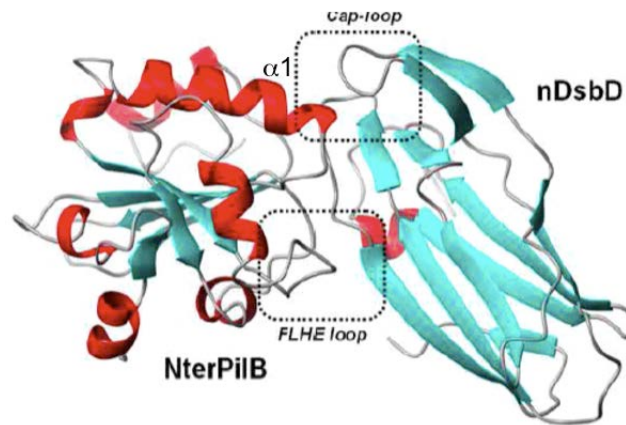


Figure 87 : Représentation de la structure tridimensionnelle du complexe pont disulfure nDsbD-SS-Nter (Quinternet *et al.*, 2009).

Les structures secondaires sont indiquées en rouge pour les hélices α et en bleu pour les brins β . Les deux régions « cap-loop » et « FLHE-loop », ainsi que l'hélice $\alpha 1$ sont indiquées sur la figure.

Annexe 3 page 165

M. Quinternet¹, P. Tsan¹, L. Selme-Roussel¹, C. Jacob, S. Boschi-Muller, G. Branlant and MT. Cung

Formation of the complex between the DsbD and PilB N-terminal domains from *Neisseria meningitidis* necessitates an adaptability of nDsbD.

Structure, 17, 1024-1033, 2009

¹ contribution équivalente

Partie III : La DsbE1 de *N. meningitidis*

Les cytochromes *c* sont impliqués dans le transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne et sont localisés du côté du périplasma. Dans ces cytochromes *c*, l'hème est fixé de façon covalente *via* deux liaisons thioéther entre les deux groupements vinyles de l'hème et les deux cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome *c*. La DsbE permet la réduction de l'apocytochrome *c* présent dans le périplasma sous forme oxydé pont disulfure au niveau de ces deux cystéines, afin de permettre une fixation covalente de l'hème.

Lors de sa thèse, le Dr A. Gand a montré que la protéine DsbE1 de *N. meningitidis* est impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. Ceci a été montré par complémentation fonctionnelle d'une souche $\Delta dsbE$ de *B. pertussis*. Cependant, le Dr A. Gand a également montré que la DsbE1 est incapable de réduire *in vitro* l'apocytochrome *c'* oxydé de *N. meningitidis*. Le cytochrome *c'* serait impliqué dans la résistance de la bactérie vis-à-vis du NO[•] (Stevanin *et al.*, 2005). L'apocytochrome *c'* de *N. meningitidis* avait été produit sous forme soluble et purifié. L'étude par dichroïsme circulaire avait montré qu'il est bien structuré en hélices α alors que d'autres études montrent que les apocytochromes *c* sont plutôt peu ou pas structurés (Fisher *et al.*, 1972 ; Daltrop *et al.*, 2002). La présence de structures secondaires dans l'apocytochrome *c'* oxydé pourrait expliquer qu'aucune réduction n'ait été observée en présence de DsbE1 alors qu'un peptide mimant l'apocytochrome *c'* est réduit par la DsbE1, ce qui pose la question de l'accessibilité du motif CXXCH dans l'apocytochrome *c'* pour la DsbE1.

Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier un autre cytochrome *c* de *N. meningitidis*. En effet, chez *N. meningitidis*, on retrouve trois autres cytochromes *c* : *c_x*, *c₄* et *c₅*. Les cytochromes *c₄* et *c₅* sont des protéines dihémiques, alors que le cytochrome *c_x* ne fixe qu'un seul hème. Le cytochrome *c_x* a donc été produit sous forme soluble et purifié, et la réduction du cytochrome *c_x* ainsi que de différents peptides mimant le cytochrome *c'* oxydé de *N. meningitidis* par la DsbE1 a été étudiée. En parallèle, la délétion du gène *dsbE1* chez *N. meningitidis* a été réalisée.

1. Etude *in vitro* de la réduction de cibles par la DsbE1 de *N. meningitidis*

1.1. Réduction d'un apocytochrome c_x oxydé par la DsbE1

1.1.1. Production et purification de l'apocytochrome c_x de *N. meningitidis*

Afin d'obtenir en quantité suffisante le cytochrome c_x , nous l'avons produit chez *E. coli* sous une forme tronquée cytoplasmique (délétion de la séquence codante correspondant à la séquence d'export au périplasme) avec une étiquette poly-His du côté N-terminal. Après sonication, le cytochrome c_x insoluble a été resolubilisé avec du chlorure de guanidinium (voir Matériels et Méthodes). Il a ensuite été purifié par une chromatographie Nickel-Sépharose suivie d'une chromatographie de type filtration sur gel (Superdex 75). Le degré de pureté de la protéine a été vérifié par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 88) ainsi que par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (résultats non montrés). La masse de l'apocytochrome c_x déterminée par spectrométrie de masse ($12\,931 \pm 1$ Da) est en accord avec le profil obtenu sur gel SDS-PAGE, ainsi qu'avec la masse théorique (12 932 Da). Le rendement de cette purification est de l'ordre de 20 mg par litre de culture.

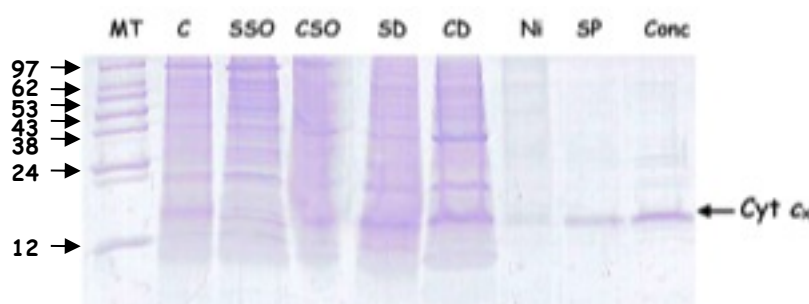


Figure 88 : Bilan de purification du cytochrome c_x sur électrophorèse SDS-PAGE.

MT : marqueur de taille en kDa, C : cellules entières, SSO : surnageant de sonication, CSO : culot de sonication, SD : surnageant après dialyse, CD : culot après dialyse, Ni : échantillon après Ni-Sépharose, SP : échantillon après gel filtration Superdex 75, Conc : échantillon après concentration.

Le cytochrome c_x a été produit dans le cytoplasme d'*E. coli*. Il doit donc se trouver sous forme apo car l'étape conduisant à la formation des liaisons covalentes avec l'hème se fait au niveau du périplasme. Les spectres d'absorbance de la protéine ont été réalisés de 350 à 750 nm afin de vérifier que le cytochrome c_x est bien sous forme apo. Ce spectre ne présentait aucun des trois pics caractéristiques d'un holocytochrome c composé des bandes γ ou de Soret à 415 nm, β à 520 nm et α à 550 nm (résultats non montrés), ce qui montre qu'il était bien sous forme apo. Ceci a d'ailleurs été confirmé par le fait que les deux cystéines de l'apocytochrome c_x ont pu être titrées par le DTNB.

L'oxydation de l'apocytochrome c_x a été obtenue avec le 2-PDS. L'ajout de réducteur sur l'apocytochrome c_x ainsi oxydé ne conduit à aucune libération de PDS. Ceci démontre la formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

Les spectres de dichroïsme circulaire des formes réduites et oxydées (pont disulfure) des apocytochromes c' et c_x montrent que le cytochrome c' , qu'il soit réduit ou oxydé, est structuré en hélice α , alors que le cytochrome c_x réduit ou oxydé est peu structuré ; le spectre étant proche de celui d'un « random coil » (Figure 89). En effet, les spectres de l'apocytochromes c' présentent deux bandes négatives à 208 et 222 nm qui sont caractéristiques d'une structuration en hélices α . Par contre, les spectres de l'apocytochrome c_x présentent un unique minimum vers 200 nm et un maximum vers 215 nm qui sont caractéristiques de protéines peu ou pas structurées.

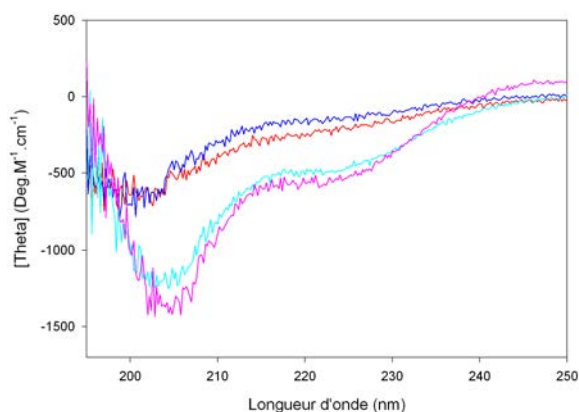


Figure 89 : Spectres de dichroïsme circulaire des apocytochromes c' et c_x réduits et oxydés.

Les spectres de dichroïsme circulaire de l'apocytochrome c_x réduit et oxydé sont représentés respectivement en bleu et en rouge, et ceux de l'apocytochrome c' réduit et oxydé sont représentés respectivement en turquoise et en rose. Les formes oxydées ont été obtenues en mélangeant les apocytochromes avec du 2-PDS en tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 pendant 20 minutes à température ambiante. L'excès de 2-PDS ainsi que le PDS formé sont éliminés par passage sur colonne de dessalage EconoPac10DG. Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe CD6 Jobin Yvon avec une vitesse de mesure de 2 nm/s. Les cuves en quartz utilisées présentent un trajet optique de 1 cm. Les échantillons contiennent 10 μ M de protéine dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

1.1.2. Réduction de l'apocytochrome c_x de *N. meningitidis* par la DsbE1

La technique utilisée pour suivre la réduction de l'apocytochrome c_x oxydé par la DsbE1 est basée sur la différence du message d'émission de fluorescence de la DsbE1 lors du passage de sa forme réduite à celle oxydée (voir paragraphe 1.3). L'apocytochrome c_x ne présente pas de différence d'émission de fluorescence entre sa forme oxydée et réduite (résultats non montrés).

Nous avons dans un premier temps utilisé la cystine comme cible modèle de la DsbE1 afin de valider l'approche expérimentale (Figure 90). Nous observons bien une diminution de

l'intensité d'émission de fluorescence due à l'oxydation de la DsbE1 pour toutes les concentrations en cystine utilisées (de 100 à 500 μM) (résultats non montrés). Les courbes expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une monoexponentielle décroissante et la variation des k_{obs} en fonction de la concentration en cystine s'ajuste à l'équation d'une droite. Les résultats montrent que la droite ne passe pas par l'origine, reflétant l'existence d'une variation de fluorescence de la DsbE1 dans les conditions de cinétique rapide indépendante de la réaction d'oxydation, correspondant sans doute à une oxydation spontanée lente. Ceci est confirmé par l'existence en absence de substrat d'une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence de la DsbE1 avec une constante de vitesse de l'ordre de 1.10^{-3} s^{-1} (résultat non montré), correspondant à la vitesse extrapolée à l'origine par l'ajustement de la variation des valeurs de k_{obs} en fonction de la concentration en cystine. Ces résultats permettent de valider l'approche expérimentale et montrent que la DsbE1 réduit la cystine mais avec une très faible efficacité catalytique ($k_2 = 4,7 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

Par la même approche en présence d'apocytochrome c_x oxydé (à des concentrations de 10 à 100 μM), aucune variation significative de l'intensité d'émission de fluorescence de la DsbE1 n'a été observée (résultats non montrés). Ceci suggère que la structuration du cytochrome c' n'explique pas l'absence de réduction *in vitro* par la DsbE1.

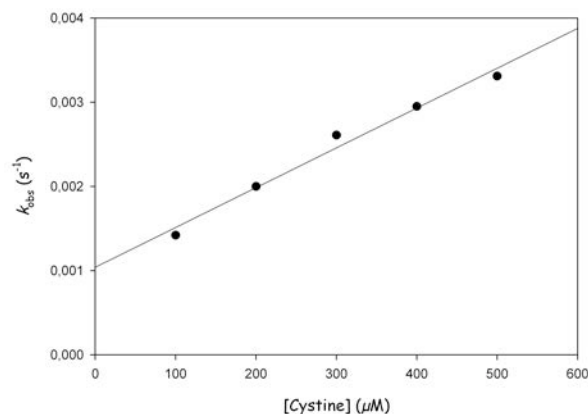


Figure 90 : Réduction de la cystine par la DsbE1.

Cette expérience a été réalisée à 25 °C dans du tampon TE pH 8,0. La concentration en DsbE1 est de 10 μM et la concentration en cystine varie de 100 à 500 μM . Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite. La constante de deuxième-ordre k_2 est de $4,7 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($k_0 = (1,0 \pm 0,1).10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Les points et la ligne continue représentent respectivement les valeurs expérimentales et l'ajustement.

1.2. Réduction de peptides mimant un apocytochrome *c*

1.2.1. Rôle du résidu histidine invariant du motif des cytochromes *c*

Le Dr A. Gand avait montré que le peptide oxydé mimant l'apocytochrome *c'* (ASCKSCHDS) était réduit par la DsbE1 (k_2 de $130 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). De plus, des études ont montré que la présence du résidu histidine du motif conservé CXXCH des cytochromes de type *c* est essentielle pour leur maturation *in vivo* (Allen *et al.*, 2005). Nous avons donc utilisé un peptide où le résidu histidine du motif CXXCH a été remplacé par une alanine afin d'étudier le rôle éventuel de cette histidine dans la réduction de l'apocytochrome par la DsbE1.

La technique utilisée pour suivre la réduction du peptide oxydé sous forme pont disulfure par la DsbE1 est toujours basée sur la différence d'émission de fluorescence de la DsbE1 lors de son passage de sa forme réduite à sa forme oxydée (voir paragraphe 1.3). Nous avons utilisé deux peptides commerciaux (Innovative Peptide Technologies, Berlin) : un dont la séquence correspond à celle du cytochrome *c'* (ASCKSCHDS), et le second dans lequel le résidu histidine du motif est remplacé par une alanine (ASCKSCADS). Pour chaque concentration en peptide, une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence qui correspond à l'oxydation de la DsbE1 a été observée (résultats non montrés). L'ajustement des courbes expérimentales à l'équation d'une monoexponentielle décroissante a permis de déterminer les valeurs des constantes de vitesse, k_{obs} (Figure 91).

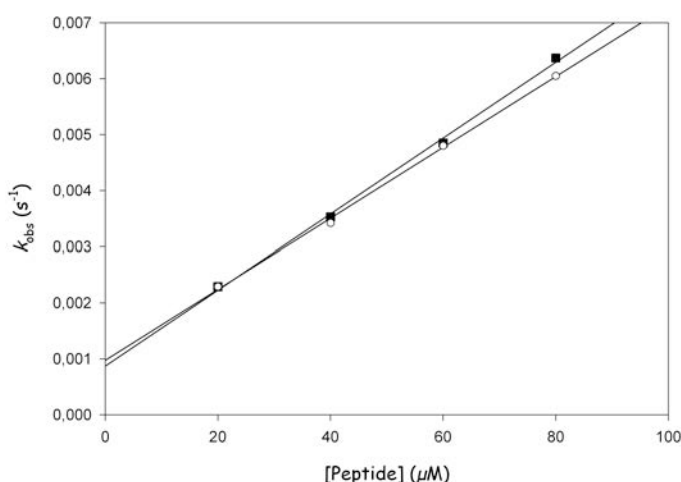


Figure 91 : Réduction des peptides ASCKSCHDS (carrés noirs) et ASCKSCADS (cercles) oxydés sous forme de ponts disulfures par la DsbE1.

Ces expériences ont été réalisées à 25 °C dans du tampon TE pH 8,0. La concentration en DsbE1 est de 10 μM et la concentration en peptide varie de 20 à 80 μM. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite. Les constantes de deuxième ordre k_2 sont de $67,8 \pm 2,3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour le peptide ASCKSCHDS et de $63,3 \pm 2,1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour le peptide ASCKSCADS.

La courbe représentant les k_{obs} en fonction de la concentration en peptide est une droite qui ne passe pas par l'origine (paragraphe 1.1.2). Ceci montre que l'affinité de la DsbE1 pour les peptides est faible, avec une constante apparente d'affinité supérieure à 100 μM.

L'ajustement des valeurs de k_{obs} obtenues en fonction des concentrations en peptide à l'équation d'une droite a permis de déterminer la valeur de la constante de deuxième ordre k_2 qui est de $67,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le peptide avec l'histidine et de $63,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le peptide sans l'histidine. Comme nous utilisons de faibles concentrations en peptide (20 à 80 μM), nous ne pouvons pas atteindre de saturation. De plus, comme précédemment, en absence de substrat, le suivi de la fluorescence de la DsbE1 seule se traduit par une diminution de l'intensité d'émission avec une constante de vitesse de l'ordre de 1.10^{-3} s^{-1} . Ceci explique que les droites ne passent pas par l'origine.

Les valeurs des constantes de deuxième ordre déterminées pour les deux peptides avec et sans l'histidine sont identiques. Ce résultat montre que le résidu histidine n'est pas important pour la réduction de l'apocytochrome *c'* par la DsbE1.

1.2.2. Etude de la vitesse de la réduction du peptide ASCKSCHDS par la DsbE1 en fonction du pH

Les valeurs des constantes de deuxième ordre de la réduction du peptide oxydé par la DsbE1 ont été déterminées à différents pH, en utilisant la même approche que celle décrite précédemment (paragraphe 1.2.1). A chaque pH, une constante de second ordre k_2 a été déterminée en utilisant des concentrations sous saturantes en peptide de 20 à 80 μM . La variation des valeurs de k_2 en fonction du pH a été ajustée à l'équation d'une monosigmoïde croissante, ce qui a conduit à un pK_{app} de 9,1 et une constante de deuxième ordre maximale (k') de $760 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 92).

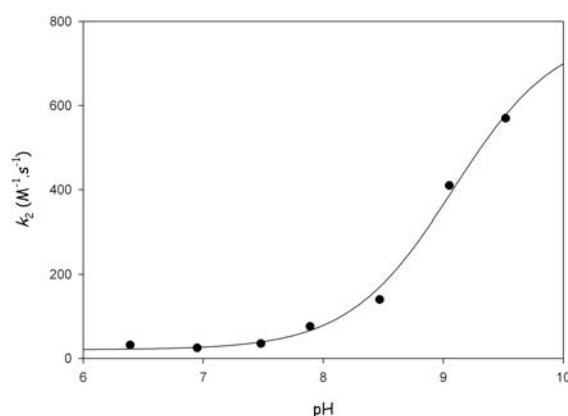


Figure 92 : Variation en fonction du pH de la constante de vitesse de la réduction du peptide ASCKSCHDS oxydé sous forme pont disulfure par la DsbE1.

Cette expérience a été réalisée à 25 °C dans un polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, Acide acétique 30 mM de pH 6,5 à 9,5. Pour chaque pH, la concentration en DsbE1 est de 10 μM et la concentration en peptide varie de 20 à 80 μM . Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite et la constante de deuxième ordre k_2 a été déterminée pour chaque pH. La représentation des valeurs de k_2 en fonction du pH a été ajustée à l'équation d'une monosigmoïde croissante ($f = y + (k' / (1 + 10^{(pK_{app} - pH)}))$) avec une valeur de pK_{app} de $9,1 \pm 0,1$ et une valeur de k' de $760 \pm 60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Le profil des constantes k_2 en fonction du pH présente une allure sigmoïdale croissante gouvernée par la déprotonation d'une fonction de pKa apparent de 9,1 impliquée dans la catalyse ou la reconnaissance du substrat peptidique. Cette ionisation apparente d'un résidu de pKapp 9,1 gouvernant la constante k_2 et dont la forme déprotonée est catalytiquement active peut être assignée à la fonction thiol de la Cys67 dans le complexe DsbE1 / peptide, dont la déprotonation permet l'attaque nucléophile sur le pont disulfure du peptide. D'autre part, ces résultats suggèrent, si la valeur du pK_{app} correspond bien à celui de la Cys de la DsbE1, que celle-ci n'est pas activée dans le complexe binaire DsbE1 / peptide, puisque son pKapp dans l'enzyme libre est supérieur à 9,0 (Thèse Dr A. Gand).

2. Phénotype d'une souche $\Delta dsbE1$ de *N. meningitidis*

Au cours de sa thèse, le Dr A. Gand avait montré que la DsbE1 était impliquée dans la maturation des cytochromes *c*, et ceci par complémentation fonctionnelle par le gène *dsbE1* d'une souche $\Delta dsbE$ de *B. pertussis*. Afin d'obtenir des informations sur l'implication de la DsbE1 chez *N. meningitidis* dans la maturation des cytochromes *c*, nous avons entrepris la délétion du gène *dsbE1* chez *N. meningitidis*. Cependant, *N. meningitidis* ne possédant qu'une seule cytochrome *c* oxydase, la délétion du gène *dsbE1* devrait être létale. C'est pourquoi nous avons entrepris d'obtenir un mutant conditionnel chez *N. meningitidis*. La stratégie adoptée est celle qui avait été utilisée par Voulhoux *et al.* pour obtenir un mutant inactif *omp85* de *N. meningitidis* (Voulhoux *et al.*, 2003). Celle-ci consiste à transformer une souche *siaD* de *N. meningitidis* par un plasmide répliquatif permettant la production de DsbE1 sous la dépendance d'un promoteur inductible à l'IPTG. La délétion du gène *dsbE1* est ensuite réalisée en présence d'IPTG sur la souche transformée, afin d'obtenir un mutant conditionnel. Le phénotype du mutant $\Delta dsbE1$ a ensuite été étudié en le cultivant en absence d'IPTG.

2.1. Délétion du gène *dsbE1* de *N. meningitidis*

2.1.1. Gène *dsbE1* sous le contrôle du promoteur LacIOP

Tout d'abord, l'ORF *dsbE1* a été placée sous le contrôle d'un promoteur Lac inductible à l'IPTG dans le plasmide pFP10 répliquatif chez *N. meningitidis* et portant le gène de résistance au chloramphénicol (construction pFP10-PLacIOP-*dsbE1*). Les détails des constructions génétiques utilisées sont expliqués dans la partie Matériels et Méthodes.

La construction pFP10-PLacIOP-*dsbE1* a ensuite été utilisée pour transformer la souche *siaD* de *N. meningitidis*. Les clones obtenus ont ensuite été cultivés en présence de

DsbE1 de *N. meningitidis*

chloramphénicol et de 0,1 mM d'IPTG, afin de permettre l'expression de la DsbE1 plasmidique.

2.1.2. Remplacement du gène *dsbE1* par recombinaison homologue

La délétion du gène *dsbE1* chromosomique a été réalisée à partir de la souche de *N. meningitidis* *siaD*, transformée par le plasmide pFP10-PLacIOP-*dsbE1*, cultivée sur milieu contenant de l'IPTG. Pour cela, le plasmide pDEL*dsbE1* a été utilisé (voir Matériels et Méthodes). Après transformation de la souche *siaD* « pFP10-PLacIOP-E1 » par le plasmide pDEL*dsbE1*, les clones résistants à la fois au chloramphénicol et à la kanamycine en présence d'IPTG ont été sélectionnés. Douze clones ont été obtenus. Le remplacement du gène *dsbE1* par le gène *Kan^R* a tout d'abord été vérifié par PCR sur colonie en utilisant un couple de désoxyribonucléotides spécifiques des régions bordantes du gène *dsbE1* (résultats non montrés). Sur ces douze clones, seuls quatre présentent un profil PCR correspondant à la présence du gène *Kan^R* au site du gène *dsbE1*. Ceci indique que dans les huit autres clones, le gène de résistance à la kanamycine s'est inséré à d'autres endroits dans le génome.

2.2. Caractérisation du mutant Δ *dsbE1* de *N. meningitidis*

Les quatre clones obtenus précédemment ont été repiqués sur milieu solide contenant ou non de l'IPTG. Tous les clones poussent en absence d'IPTG. Ce résultat montre que la délétion du gène *dsbE1* n'est pas létale pour *N. meningitidis*. Il était ensuite nécessaire de vérifier que la DsbE1 n'était plus exprimée dans ces quatre mutant et que les cytochromes *c* n'étaient plus maturés.

Dans un premier temps nous avons donc vérifié l'expression de la protéine DsbE1 dans la souche sauvage *siaD* et les quatre mutants de *N. meningitidis* en absence d'IPTG par des expériences d'immunodétection par Western-Blot en utilisant des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre la protéine DsbE1 de *N. meningitidis* (voir Matériels et méthodes). Les résultats montrent l'expression de la protéine DsbE1 uniquement dans la souche sauvage *siaD* de *N. meningitidis* (Figure 93, B). Ceci confirme l'absence de DsbE1 dans les quatre mutants.

Nous avons utilisé en témoin les anticorps anti-MsrB de PilB de *N. meningitidis* afin de vérifier que la quantité de protéines totales (200 µg de protéines) déposée est la même pour chaque dépôts (Figure 93, C). Nous pouvons constater la présence des deux formes protéiques issues du gène *pilB* : la protéine PilB périplasmique et la fusion MsrA-MsrB.

Ensuite, nous avons vérifié que l'absence d'expression de la DsbE1 conduit à un défaut de maturation des cytochromes *c*. Pour cela, nous avons mis en évidence la présence de

cytochromes *c* matures par détection de leur activité peroxydase avec un réactif chimioluminescent (Amersham, ECL). Nous constatons une maturation des cytochromes *c* exclusivement dans la souche *siaD* sauvage de *N. meningitidis* (Figure 93, A). Ceci montre que la DsbE1 de *N. meningitidis* est essentielle à la maturation des cytochromes *c*.

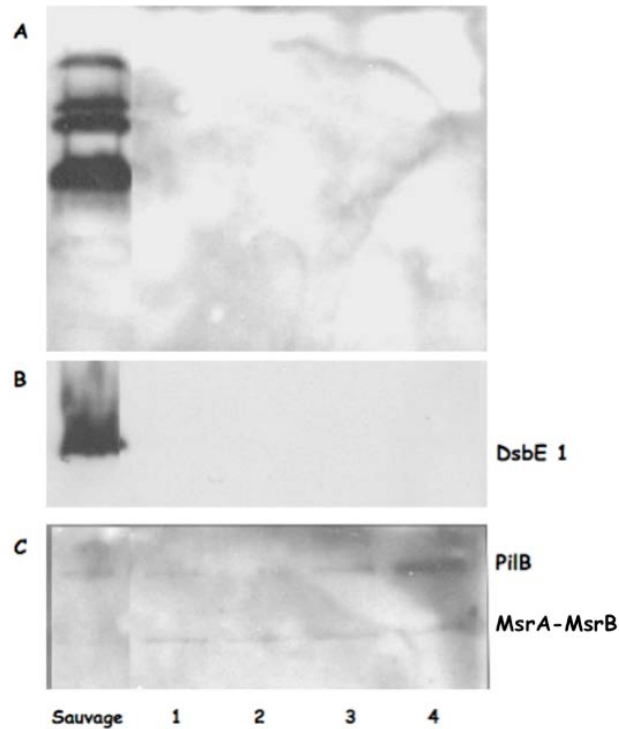


Figure 93 : Détection des cytochromes *c*, de la DsbE1 et de PilB dans la souche sauvage et les mutants $\Delta dsbE1$ de *N. meningitidis*.

A. Détection de l'activité peroxydase des cytochromes de type *c*. B. Western-blot avec des anticorps anti-DsbE1. C. Western-blot avec des anticorps anti-MsrB. Une quantité de 200 μ g de protéines totales a été déposée pour chaque extrait cellulaire issu de cultures liquides de la souche sauvage *siaD* et des quatre mutants de *N. meningitidis* en absence d'IPTG.

Discussion

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de : 1) montrer que l'activité MsrB est recyclée par le domaine Nter par un mécanisme de type intramoléculaire dans PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum*, 2) identifier et caractériser au niveau biochimique, enzymatique et structural la nDsbD de *N. meningitidis*, qui est le partenaire réducteur périplasmique du domaine Nter de PilB et de la DsbE1 ; et 3) poursuivre la caractérisation biochimique et enzymatique de la DsbE1 de *N. meningitidis*, qui est impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. De plus, les résultats obtenus *in vivo* sur des souches mutantes de *N. meningitidis*, ont montré que la délétion du gène *pilB* diminue le taux de survie de la bactérie, mais ce uniquement en présence de paraquat, et que la délétion du gène *dsbE1* entraîne une absence de maturation des cytochromes *c*.

Partie I. La protéine PilB

Les études menées précédemment au laboratoire sur les domaines isolés de PilB de *N. meningitidis* avaient montré que les domaines MsrA et MsrB réduisent la Met-O et que seul l'activité MsrB est recyclée efficacement par le domaine Nter. Mes travaux ont montré que dans la protéine PilB entière de *N. meningitidis*, les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines Msr sont du même ordre que ceux obtenus sur les domaines isolés, que seule l'activité MsrB est recyclée efficacement par le domaine Nter et ce par un mécanisme de type intramoléculaire, dans les conditions expérimentales utilisées. De plus, les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines Msr isolés de PilB de *F. nucleatum* sont comparables à celles des domaines isolés de PilB de *N. meningitidis*, avec une efficacité catalytique meilleure concernant le recyclage de l'activité MsrA par le domaine Nter, ce qui n'est pas retrouvé sur PilB entier de *F. nucleatum*.

Nous pouvons conclure de ces résultats que : 1) les paramètres cinétiques de l'étape réductase des domaines Msr ne sont pas modifiés par le contexte PilB, suggérant que ces domaines sont indépendants dans PilB, 2) la sélectivité du recyclage des activités Msr par les domaines Nter, observée sur les domaines isolés, n'est pas retrouvée dans les protéines PilB entières ; et 3) dans PilB, le domaine Nter peut réduire le pont disulfure du domaine MsrB selon un mécanisme de type intramoléculaire. Ceci montre que les réactions de recyclage des activités Msr par les domaines Nter, dans PilB et entre les domaines isolés, ne dépendent pas des mêmes facteurs. Ainsi, le recyclage des activités Msr entre les domaines isolés implique une première étape de reconnaissance entre les deux partenaires conduisant à la formation d'un complexe binaire Nter / Msr, alors que dans les protéines PilB entières, les deux domaines étant fusionnés, la réduction intramoléculaire doit nécessiter la présence de séquences « linkers » dans PilB, afin que les domaines Nter et MsrB puissent former un complexe

Discussion et Perspectives

intramoléculaire efficace. Quels sont les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la réaction de réduction des domaines Msr isolés et dans PilB par le domaine Nter ?

1. Reconnaissance entre le domaine Nter et les domaines Msr isolés

Les domaines Msr isolés des deux protéines PilB étant réduits efficacement par la Trx1 d'*E. coli* (Tableau 9 page 89), la différence de sélectivité observée (NmMsrB pour NmNter et FnMsrA pour FnNter) serait donc plutôt liée aux domaines Nter. Bien qu'aucune structure tridimensionnelle d'un complexe Nter / Msr ne soit connu, il est probable que l'interaction soit limitée à la zone du site actif comme cela a été décrit pour d'autres « Trx-like ». Or les séquences protéiques des deux domaines Nter sont peu différentes, notamment au niveau du site actif (Figure 46 page 68). Il doit donc exister des différences subtiles entre les deux domaines qui pourraient expliquer la sélectivité pour un domaine Msr particulier. Dans le processus de recyclage, l'étape cinétiquement limitante est probablement associée à un ajustement conformationnel des deux partenaires Nter / Msr. En effet, cette spécificité se traduit sur les domaines isolés dans les deux cas par une constante de vitesse observée (k_f) plus élevée, ainsi que par une meilleure affinité apparente (K_S plus faible). Comme indiqué dans la partie résultats, l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global des Msr de *F. nucleatum* est associée, en présence de Trx1, à l'étape de dissociation des partenaires Msr réduite / Trx1 oxydée, et le mécanisme de l'étape de recyclage est semblable à celui décrit précédemment pour les domaines Msr de *N. meningitidis*. Il est donc raisonnable de postuler que le recyclage des domaines Msr de *F. nucleatum* par le domaine Nter suit le même mécanisme. Dans ce contexte, le fait que la spécificité observée de chaque domaine Nter pour un seul domaine Msr soit la conséquence, dans les deux cas, d'une constante de vitesse observée élevée, pourrait indiquer que l'étape de dissociation des partenaires reste limitante, comme dans le cas de la Trx1. Par contre, dans tous les autres cas étudiés (k_2 de l'ordre de $10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, tableau 10 page 90), il est possible que ce soit l'étape d'association entre les deux partenaires qui soit peu efficace et devienne l'étape cinétiquement limitante, reflétant alors la nécessité d'un ajustement structural entre les partenaires domaine Msr oxydé et domaine Nter réduit (caractérisé par une diminution du k_f et une augmentation du K_S).

Dans ce contexte, il est à noter que la structure en solution d'un complexe covalent NmNter-SS-NmMsrB (pont disulfure entre la Cys67 du mutant NmNterC70S et la Cys117 du mutant NmMsrBC63S) a été obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour « small angles X ray scattering ») par le Dr. Arnaud Gruez à la résolution de 17 Å (Figure 94). Le calcul de cette structure a été entrepris de manière *ab initio* d'une part et d'autre part en utilisant les structures à haute résolution obtenues par cristallographie des rayons X des deux domaines. La structure fait apparaître une interface entre les partenaires relativement petite,

impliquant d'une part les deux boucles situées respectivement entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ et entre les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ et l'hélice 3_{10-3} du domaine NmMsrB, et d'autre part, l'hélice $\alpha 1$ et les résidus FLHE du domaine NmNter.

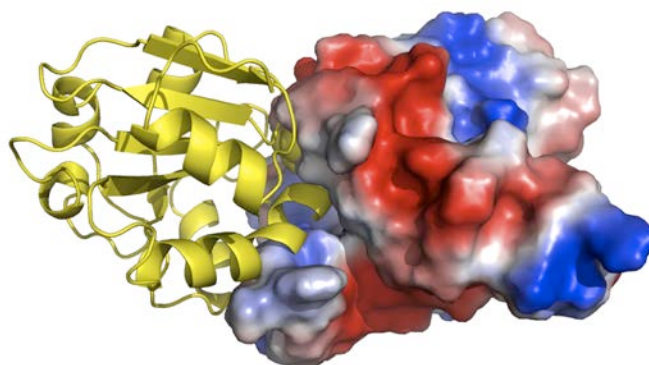


Figure 94 : Structure en solution du complexe covalent NmNter-SS-NmMsrB obtenu par SAXS à la résolution de 17 Å (Dr A. Gruez, résultats non publiés).

Les structures secondaires du domaine NmNter sont représentées en jaune et le domaine NmMsrB est représenté en surfaces colorées en fonction du potentiel électrostatique (régions acides en rouges et régions basiques en bleu).

Au niveau de l'interface entre les deux partenaires, trois interactions électrostatiques entre des acides aminés proches spatialement sont possibles (Figure 95). Deux de ces interactions sont situées au niveau du motif FLHE spécifique du domaine NmNter (Figure 44 page 64), et la troisième est située à proximité de ce motif. La comparaison des séquences entre les deux domaines Nter montre que deux de ces interactions sont absentes avec FnNter.

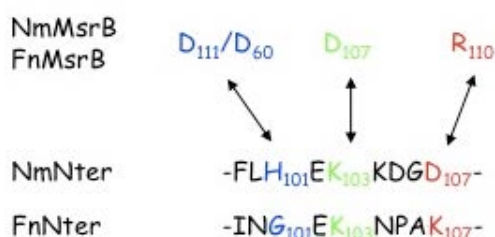


Figure 95 : Interactions électrostatiques potentielles entre les domaines NmNter et NmMsrB dans le complexe covalent NmNter-SS-NmMsrB.

Les interactions électrostatiques entre les chaînes latérales des résidus indiqués en couleur sont représentées par des flèches. L'interaction représentée en bleu impliquerait la fonction carboxylate des résidus Asp111 (D111) ou Asp60 (D60) de MsrB.

Les résidus FLHE sont inclus dans une boucle à proximité du site actif du Nter. Ces résidus ne sont pas présents dans les DsbE (voir introduction). Il avait été proposé que ces quatre résidus pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance du Nter vis-à-vis de ses cibles (domaines Msr), ou vis-à-vis de son partenaire réducteur (nDsbD) (Ranaivoson *et al.*, 2006 ; Quinternet *et al.*, 2008). Par ailleurs, aucun recyclage des activités Msr n'a été observé par la

Discussion et Perspectives

DsbE1 de *N. meningitidis*, ce qui suggère que ces résidus pourraient effectivement jouer un rôle dans la reconnaissance sélective des domaines Msr (résultats non montrés).

Afin de montrer l'implication éventuelle de ces interactions électrostatiques dans la reconnaissance spécifique entre les deux partenaires NmMsrB et NmNter, des mutants d'interconversion de signature du domaine NmNter et FnNter ont été produits et étudiés pour leur capacité de réduction du domaine NmMsrB (résultats non montrés), les résidus potentiellement impliqués du domaine NmMsrB étant conservés dans le domaine FnMsrB. Les résultats montrent que : 1) la délétion des résidus spécifiques FLHEKK de NmNter entraîne une diminution de la constante de deuxième ordre k_2 d'un facteur 10 environ et ce essentiellement lié à un effet K_s , 2) la double mutation G101H / K107D de FnNter qui permet d'obtenir un mutant FnNter pouvant établir les trois interactions électrostatiques potentielles avec le domaine NmMsrB n'augmente pas la valeur du k_2 mais diminue à la fois les valeurs K_s et k_f . Ceci montre que ces trois interactions électrostatiques potentielles sont bien impliquées dans la reconnaissance entre le domaine NmNter et le domaine NmMsrB, mais qu'elles ne suffisent pas à expliquer la sélectivité de réduction du domaine NmNter pour le domaine NmMsrB. D'autres facteurs moléculaires et / ou structuraux doivent donc être impliqués, au niveau du domaine Nter mais également au niveau du domaine MsrB.

L'ensemble de ces observations suggère donc une reconnaissance très fine et spécifique entre les deux partenaires Nter et Msr, comme c'est le cas entre les « Trx-like » et leurs différentes cibles.

2. Réduction des domaines Msr dans PilB

Nos résultats ont montré que, pour NmPilB, le domaine MsrA ne peut être réduit que par une réaction intermoléculaire très lente (k_{obs} de $6.10^{-4} s^{-1}$, résultat non montré) par rapport à la réduction du domaine MsrB (k_{obsmax} de $2,7 s^{-1}$). Par contre, pour FnPilB, les deux activités Msr sont recyclées avec la même vitesse par le domaine Nter avec des valeurs de k_{obs} de $0,1 s^{-1}$ pour MsrA et de $0,3 s^{-1}$ pour MsrB. Le fait que la réaction de réduction du domaine MsrA de FnPilB soit plus rapide que celle du domaine MsrA de NmPilB confirme les résultats obtenus sur les domaines isolés. Si on compare les constantes de vitesses observées pour les réactions intermoléculaires entre les domaines isolés (FnNter et FnMsrA) et celles observées pour les réactions intermoléculaires entre ces domaines dans PilB dans les mêmes conditions expérimentales (FnNterPilB et FnMsrAPilB), on constate que les valeurs des k_{obs} sont du même ordre de grandeur ($0,25 s^{-1}$ en intermoléculaire PilB et $0,09 s^{-1}$ avec les domaines isolés). La réduction du domaine MsrA dans FnPilB est donc probablement une réaction de type intermoléculaire (Figure 96). Reste posée la question de savoir si la réduction du domaine

MsrA par le domaine Nter est possible dans FnPilB selon un mécanisme intramoléculaire. Pour répondre à cette question, il faudrait pouvoir se mettre dans des conditions qui permettraient d'obtenir une constante de vitesse de la réaction intermoléculaire (deuxième ordre) largement inférieure à celle de la réaction intramoléculaire, si elle existe. Ceci nécessitera de développer une méthode d'analyse plus sensible permettant de travailler à des concentrations en PilB largement inférieures à 10 μ M, en utilisant par exemple une méthode de dérivation de la Met afin d'augmenter la sensibilité de détection par la technique de « quenched flow ».

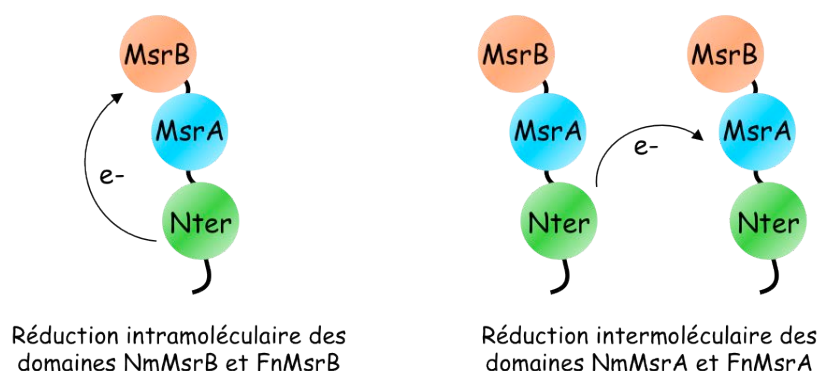


Figure 96 : Réduction des domaines Msr oxydés dans les protéines PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum*.

La réduction des domaines Msr par les domaines Nter est représentée par une flèche, et les régions « linkers » sont représentées par des traits noirs.

La réduction intramoléculaire (Figure 96) des domaines MsrB oxydés sous forme pont disulfure par les domaines Nter observée avec les deux PilB implique la formation transitoire d'un pont disulfure intramoléculaire entre les domaines Nter et MsrB, qui soit cinétiquement favorisée par rapport à la réaction intermoléculaire. La possibilité de former un pont disulfure intramoléculaire Nter-SS-MsrB en solution a été confirmée par des expériences préliminaires par spectrométrie de masse (résultats non montrés, collaboration LSMBO) avec un variant NmC67MsrBPilB (seule la cystéine catalytique du domaine Nter et les deux cystéines du domaine MsrB sont présentes). Ceci implique une proximité spatiale des domaines MsrB et Nter dans PilB via l'existence de régions « linkers » entre les domaines permettant une flexibilité suffisante de PilB, en vue de former ce pont disulfure transitoire. L'examen des séquences des protéines PilB de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum* montre effectivement l'existence de régions « linkers » entre les trois différents domaines fonctionnels. Ainsi, un « linker » de 20 acides aminés environ est retrouvé pour NmPilB entre les domaines Nter et MsrA (cette région ne fait que 7 acides aminés environ chez *F. nucleatum*), et de 13 et 25 acides aminés respectivement pour FnPilB et NmPilB entre les domaines MsrA et MsrB (Figure 46 page 68). L'existence de cette seconde région « linker » entre les deux domaines Msr a été clairement mise en évidence dans une structure tridimensionnelle de la fusion MsrA-

Discussion et Perspectives

MsrB de *S. pneumoniae* (Kim *et al.*, 2009). Ce « linker » de 13 résidus (de même longueur que celui de FnPilB, voir Figure 46 page 68) est structuré en une hélice 3_{10} , qui établit plusieurs liaisons hydrogènes avec les domaines MsrA et MsrB, et dont le rôle serait de « maintenir » la structure de la protéine. L'obtention d'une structure tridimensionnelle de PilB pourrait nous apporter des renseignements supplémentaires sur l'organisation spatiale du domaine Nter par rapport aux domaines Msr et sur la possibilité de ceux-ci à interagir entre eux. A ce jour, aucun cristal n'a pu être obtenu avec les protéines PilB sauvages de *N. meningitidis* et de *F. nucleatum*. Ceci pourrait être dû à la flexibilité des protéines au niveau des régions « linkers ». Il est à noter qu'une étude par SAXS de la protéine NmPilB réduite et oxydée a été réalisée (Collaboration UMR7036, Dr M. Ranaivoson, Figure 97). Les calculs de forme *ab initio* montrent que la protéine présente une conformation homogène en forme de « L », présentant une courbure au niveau du domaine NmMsrA. Les trois domaines ont été identifiés et sont clairement séparés, même si les deux domaines NmNter et NmMsrA sont relativement proches l'un de l'autre. Une telle forme de la protéine est compatible avec une action non contrainte des domaines Msr vis-à-vis des protéines substrats potentielles. Cependant, la forme observée de l'enveloppe montre clairement en solution l'absence de mouvements libres des domaines les uns par rapport aux autres, indiquant l'existence de contraintes (structurales ou liées aux conditions expérimentales), qui sont en contradiction apparente avec le mécanisme de recyclage intramoléculaire qui nécessiterait une flexibilité au niveau des « linkers ».

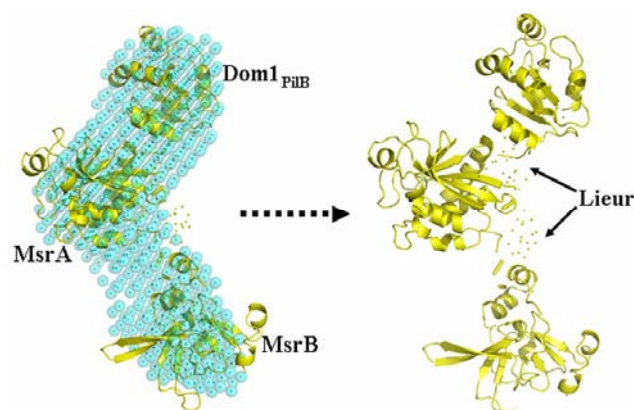


Figure 97 : Ajustement des structures cristallographiques des trois domaines isolés de NmPilB dans l'enveloppe obtenue par SAXS (Thèse M. Ranaivoson, résultats non publiés).

Dom1_{PilB} : domaine NmNter

3. Rôle de PilB *in vivo*

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montre que le mécanisme de recyclage est de type intramoléculaire pour MsrB dans les conditions expérimentales utilisées, alors qu'il serait de type intermoléculaire pour MsrA. Mais qu'en est-il *in vivo* ? PilB est une protéine périplasmique qui serait impliquée dans la résistance au stress oxydant (Skaar *et al.*, 2002). Une hypothèse raisonnable serait que ce rôle soit associé à ses activités Msr qui réduiraient des

cibles périplasmiques oxydées au niveau de leurs Met. *In vivo*, la réduction des deux domaines Msr doit donc être efficace pour permettre à la bactérie de faire face à un stress oxydant. Bien qu'aucune information concernant l'efficacité de recyclage des activités MsrA et MsrB de PilB *in vivo* ne soit disponible, le fait que PilB soit une protéine décrite comme étant ancrée à la membrane suggère fortement que la vitesse du recyclage intermoléculaire de l'activité MsrA doit être plus lente *in vivo* et beaucoup moins efficace que le recyclage intramoléculaire de MsrB. Le domaine MsrB étant spécifique de la réduction de l'isomère R des Met-O et l'oxydation des Met conduisant à un mélange équimolaire des isomères R et S, cela impliquerait que PilB ne permettrait la réduction que de la moitié des Met-O. Ainsi, soit la réduction de la moitié des Met-O est suffisante pour que la bactérie résiste transitoirement à un stress oxydant, soit la réduction de l'isomère S, bien que très lente, est suffisante pour restaurer la fonction des cibles oxydées, soit encore dans le contexte périplasmique, le domaine Nter de PilB recycle aussi efficacement les deux activités Msr. L'oxydation du domaine Nter implique qu'il soit lui-même réduit, d'où la question de la nature du partenaire réducteur de PilB. Nous avons montré que la nDsbD réduit efficacement le domaine Nter de PilB *in vitro*. La question qui se posait alors était de savoir ce qu'il en est *in vivo* au niveau du périplasme chez *N. meningitidis*. En effet, comme la protéine DsbD est une protéine transmembranaire à trois domaines de la membrane interne, la protéine PilB doit être localisée à proximité pour pouvoir interagir avec la nDsbD. Or, les études de Skaar en 2002 ont montré par une approche de fractionnement subcellulaire une localisation de PilB de *N. gonorrhoeae* au niveau de la membrane externe, incompatible avec l'utilisation de la DsbD comme partenaire réducteur (Skaar *et al.*, 2002). Les résultats que nous avons obtenus par différentes méthodes de fractionnement subcellulaire ont montré que PilB est présente aussi bien dans les fractions de membranes externes que dans celles de membranes internes. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'ancrage membranaire de PilB est probablement très « faible » et qu'il ne « résiste » pas aux techniques de fractionnement. En effet, l'ancrage membranaire de PilB pourrait se faire *via* une hélice amphipatique à son extrémité N-terminale (acides aminés 4 à 22), permettant un attachement par interactions hydrophobes à la surface de la membrane (Wu *et al.*, 2005). D'autre part, les résultats obtenus par MET montrent une localisation des grains d'or très majoritairement entre le peptidoglycane et la membrane interne, et à une distance comprise entre 1 et 35 nm de la membrane interne (Figure 75 page 107). Compte tenu de la taille estimée à partir des structures SAXS et cristallographiques par diffraction des rayons X des différents partenaires (longueur de PilB de 11 nm environ, diamètre des anticorps primaire et secondaire de 10 nm environ et du grain d'or de 10 nm), ces distances sont compatibles avec un accrochage de PilB à la membrane interne.

Discussion et Perspectives

Reste posée la question du rôle physiologique de PilB chez *N. meningitidis*. PilB joue-t-elle un rôle dans la résistance au stress oxydant, comme cela a été décrit chez *N. gonorrhoeae* (Skaar *et al.*, 2002) ? Une diminution significative du taux de survie a été observée entre la souche de *N. meningitidis* sauvage utilisée au laboratoire (mutant *siaD* non encapsulé et non pathogène) et cette même souche délétée du gène *pilB* ($\Delta pilB$) en présence de paraquat. Le paraquat générant des $O_2^{\cdot -}$ dans le cytoplasme et non dans le périplasme (Soler-Garcia et Jerse, 2004), la résistance à un stress $O_2^{\cdot -}$ n'est donc pas dû à PilB périplasmique mais à la forme tronquée MsrA-MsrB cytoplasmique. Par contre, en présence d' H_2O_2 , aucune différence significative de survie n'a été observée entre les deux souches de *N. meningitidis* (résultats non montrés), suggérant que PilB ne jouerait aucun rôle dans la résistance à un stress oxydant. On ne peut cependant pas exclure un biais lié à la souche utilisée. En effet, nous utilisons un mutant *siaD* non pathogène non encapsulé. L'absence de cette capsule pourrait entraîner une augmentation de la sensibilité de la souche vis-à-vis des différents oxydants utilisés, qui masquerait l'effet lié à l'absence de PilB. Cette hypothèse est en partie validée par le fait que les concentrations en oxydants que nous avons utilisées sont plus faibles que celles décrites dans la littérature. Par exemple, l'utilisation de 10 mM d' H_2O_2 comme il a été décrit par Moore et Sparling en 1996 n'entraîne aucune survie de la souche *siaD* (résultat non montré). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait refaire ces expériences avec une souche sauvage encapsulée dans un laboratoire habilité à manipuler des souches pathogènes de *N. meningitidis*. De plus, il serait intéressant de tester la survie d'une souche sauvage et d'une souche $\Delta pilB$ pathogène en présence de macrophages humains afin de voir si PilB joue un rôle dans la pathogénicité de la bactérie (Tavano *et al.*, 2009). Toutefois, on ne peut écarter l'hypothèse que la protéine PilB de *N. meningitidis* ne soit pas impliquée dans la résistance de la bactérie à un stress oxydant, contrairement à ce qui avait été montré chez *N. gonorrhoeae*, et ce d'autant plus que les modes d'infection et les systèmes anti-oxydants de ces deux bactéries pathogènes sont différents (voir Partie I Introduction).

Partie II. La nDsbD, partenaire réducteur de PilB

Les résultats obtenus au cours de mes travaux ont montré que la nDsbD de *N. meningitidis* est capable de réduire des « Trx-like » périplasmiques, telles que le domaine NmNter et la DsbE1 de *N. meningitidis*. L'étape de réduction est catalytiquement efficace avec des valeurs de k_2 comparables à celles décrites pour la réduction par la nDsbD d'*E. coli* de différentes « Trx-like » d'*E. coli*, telles que la CcmG et la DsbC (Stirnimann *et al.*, 2005 ; Rozhkova *et al.*, 2004). Ces résultats confortent l'idée que la nDsbD est bien le réducteur général des « Trx-like » périplasmiques, comme cela a été proposé au début de ma thèse

(Stirnemann *et al.*, 2006). De plus, vu la valeur du k_2 , ceci suggérerait une reconnaissance structurale entre la nDsbD et le domaine Nter, et posait en retour, dans ce contexte, la question du rôle de la boucle FLHE présente uniquement dans des domaines Nter de PilB.

Pour caractériser les éléments moléculaires et structuraux impliqués dans la reconnaissance entre les deux partenaires, nous avons entrepris en collaboration avec le groupe du Dr MT. Cung, spécialiste en RMN des protéines, l'étude structurale et dynamique par RMN en solution de la nDsbD de *N. meningitidis* libre et en complexe covalent avec NmNter sous forme pont disulfure. Les résultats montrent que la formation du complexe nDsbD-Nter nécessite l'ouverture de la région « cap-loop » qui vient se positionner au dessus de l'hélice $\alpha 1$ contenant les deux cystéines du site actif du domaine Nter (Figure 87 page 123). Ceci avait déjà été observé pour d'autres complexes nDsbD-cibles dont les structures avaient été résolues par diffraction des rayons X (Haebel *et al.*, 2002 ; Stirnemann *et al.*, 2005 et Rozhkova *et al.*, 2004). L'étude réalisée par l'équipe du Dr MT. Cung a de plus permis de montrer que cette région conservait des propriétés de flexibilité conformationnelle même à l'état complexé. Ceci pourrait expliquer que la nDsbD interagit avec de nombreuses cibles protéiques de type « Trx-like ». Pour ce faire, elle doit posséder une grande adaptabilité fonctionnelle. Par contre, aucun changement significatif de la conformation ou du positionnement de la boucle FLHE du Nter n'a été observé. Ceci montre que cette boucle n'intervient pas dans la stabilisation du complexe nDsbD-Nter. Ceci est d'ailleurs conforté par le fait qu'un mutant de Nter ne possédant plus cette boucle FLHE est réduit aussi efficacement par la nDsbD que le Nter sauvage (k_2 respectivement de $6,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $6,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, résultats non montrés). Le rôle de la boucle FLHE spécifique des domaines Nter de PilB reste donc posé. Le fait qu'un mutant du Nter (absence des résidus FLHEKK) présente une efficacité catalytique de réduction du domaine MsrB de PilB 10 fois plus faible, lié à un effet K_s (résultats non montrés), suggérerait que la boucle FLHE spécifique du Nter jouerait plutôt un rôle discriminant vis-à-vis du partenaire MsrB (voir partie I de la discussion).

Partant des données structurales et dynamiques du mutant C103S de la nDsbD libre et en complexe avec le domaine Nter, ainsi que des données structurales disponibles sur d'autres complexes impliquant une nDsbD, un scénario général pour la réduction des différentes « Trx-like » par la nDsbD a ainsi été proposé. Ce scénario implique l'ouverture de la région « cap-loop » de la nDsbD afin de permettre l'interaction avec un motif structural particulier $\alpha 4$ - $\beta 4$ / $\beta 5$ - $\alpha 5$ / hélice $\alpha 1$ du partenaire « Trx-like ». Cette reconnaissance spécifique serait facilitée par les propriétés dynamiques de la région « cap-loop » et du brin $\beta 11$ de la nDsbD qui permettraient une adaptation conformationnelle de la nDsbD nécessaire à son interaction avec le motif structural $\alpha 4$ - $\beta 4$ / $\beta 5$ - $\alpha 5$ / hélice $\alpha 1$ du partenaire « Trx-like ». Cette adaptation

Discussion et Perspectives

conformationnelle serait un pré-requis pour la formation d'un complexe catalytiquement compétent conduisant à la formation du pont disulfure intermoléculaire entre la Cys109 de la nDsbD et la cystéine catalytique du partenaire « Trx-like ». Plusieurs interactions stabilisatrices spécifiques favoriseraient la formation de ce pont disulfure dans les différents complexes transitoires, dont une liaison hydrogène conservée dans tous les complexes, entre le groupement amide de la Cys109 de la nDsbD et le groupement carbonyle du résidu du partenaire « Trx-like » qui précède le résidu *cis*-Pro conservé du site actif. Enfin, le transfert de flexibilité de la nDsbD vers le partenaire « Trx-like », et en particulier de son hélice $\alpha 1$, pourrait être un élément moteur dans l'étape conduisant à la dissociation du complexe.

Le fait que la protéine PilB soit spécifique des bactéries pathogènes du genre *Neisseria* en faisait potentiellement une bonne cible thérapeutique, et ce, sachant qu'il n'existe aucun vaccin disponible pour le sérotype B de *N. meningitidis*. Or, l'étude enzymatique et structurale des trois domaines de PilB ne montre pas de particularités, en particulier au niveau du site actif, par rapport à celui des Msr et des Trx de l'hôte. Ceci semble donc exclure PilB en tant que cible thérapeutique. Par contre, *N. meningitidis* utilise un système II de maturation des cytochromes *c* qui n'existe pas chez l'hôte et qui pourrait être essentiel à la survie de la bactérie. En effet, chez *N. meningitidis*, il n'existe qu'une seule cytochrome *c* oxydase. Un défaut dans la maturation des cytochromes de type *c* serait donc létal pour la bactérie, d'où l'intérêt que nous y avons porté en étudiant ce système.

Partie III. La DsbE1 de *N. meningitidis*

Les études menées précédemment au laboratoire par le Dr A. Gand avaient permis d'identifier la DsbE1 comme étant la disulfure oxydoréductase impliquée dans le système de maturation des cytochromes *c* de *N. meningitidis*. Cependant, ces études n'avaient pas montré *in vitro* d'activité réductase de la DsbE1 vis-à-vis de l'apocytochrome *c'* de *N. meningitidis*. Une hypothèse était que l'apocytochrome *c'* étudié était en partie structuré à l'inverse des autres apocytochromes *c* précédemment décrits, empêchant ainsi l'accessibilité du pont disulfure à la DsbE1. Nous avons donc étudié d'une part la capacité de la DsbE1 à réduire un autre apocytochrome *c* oxydé (l'apocytochrome c_x de *N. meningitidis*), et d'autre part un peptide mimant l'apocytochrome *c'* oxydé. Les résultats obtenus ont montré que : 1) la DsbE1 est capable de réduire des peptides mimant l'apocytochrome *c'* oxydé (valeurs de k_2 faibles), mais elle ne réduit pas l'apocytochrome c_x oxydé de *N. meningitidis*, 2) le résidu histidine du motif CXXCH caractéristique des apocytochromes *c* ne joue aucun rôle dans l'efficacité de réduction par la DsbE1 *in vitro* ; et 3) la cystéine catalytique de la DsbE1 n'est pas activée dans le complexe binaire DsbE1 / peptide.

Ces résultats posaient la question de l'efficacité de réduction des apocytochromes *c* par la DsbE1 dans un complexe binaire apocytochrome / DsbE1. En effet, bien que les peptides mimant l'apocytochrome *c* soient réduits plus efficacement que la cystine (facteur 10 sur le k_2), l'efficacité catalytique est faible avec une constante de deuxième ordre k_2 de $68 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Ceci peut correspondre à un effet k_{obs} et / ou K_S . Si on considère un mécanisme minimum à trois étapes : 1) association des deux partenaires, 2) échange du pont disulfure ; et 3) dissociation des deux partenaires, alors la constante d'affinité apparente K_S reflèterait l'association entre les deux partenaires et le k_{obs} la vitesse d'échange de pont disulfure. Le peptide n'étant qu'un mime du substrat de la DsbE1, il pourrait exister des éléments de reconnaissance supplémentaires dans les apocytochromes *c*. L'examen des séquences de cytochromes *c* montre l'absence de séquence conservée mis à part le motif CXXCH d'attachement de l'hème. Cependant le fait qu'un peptide sans l'histidine du motif soit réduit aussi efficacement que le peptide avec l'histidine montre que le résidu histidine du motif CXXCH n'est pas important pour la réduction par la DsbE1. Il a été montré que l'histidine du motif CXXCH est important pour la maturation des cytochromes *c in vivo*, des cytochromes ne possédant plus l'histidine du motif n'étant pas maturés (Allen *et al.*, 2005). L'histidine, qui sert de ligand axial au Fe^{2+} de l'hème, pourrait permettre de positionner correctement l'hème mais il n'est pas un élément de reconnaissance pour la DsbE1 au niveau du complexe binaire peptide / DsbE1.

D'autre part, le fait que la Cys catalytique de la DsbE1 ne soit pas activée dans le complexe binaire DsbE1 / peptide montre que ce complexe n'est pas catalytiquement compétent. Ainsi, la faible efficacité catalytique observée pour la réduction des peptides pourrait être la conséquence d'un positionnement non optimal du pont disulfure par rapport à la cystéine catalytique de la DsbE1. De plus, l'absence de réduction *in vitro* de l'apocytochrome c_x de *N. meningitidis* par la DsbE1, alors que les peptides sont réduits, montre que le pont disulfure dans l'apocytochrome c_x n'est pas accessible pour la DsbE1. L'ensemble de ces résultats suggère que les apocytochromes *c* doivent être pris en charge *in vivo* afin de permettre leur réduction par la DsbE1. La question qui se pose alors concerne l'identité de la(les) protéine(s) partenaire(s) impliquées dans la réduction. Une hypothèse est que la présence des protéines transmembranaires d'export de l'hème serait nécessaire.

En effet, comme il a été décrit dans l'Introduction, dans le système II de maturation des cytochromes *c*, les protéines transmembranaires CcsA et CcsB sont impliquées dans l'export de l'hème du cytoplasme au périplasma. Il a été suggéré que la liaison de l'hème sur l'apocytochrome *c* réduit, chez *Helicobacter hepaticus*, pourrait avoir lieu au sein d'un complexe CcsA / CcsB / hème-CcsX / apocytochrome *c* (Frawley et Kranz, 2009) (pour rappel,

Discussion et Perspectives

la protéine CcsX correspond à la DsbE). CcsA et CcsB sont des protéines transmembranaires et la protéine CcsB possède entre autre une large boucle périplasmique qui pourrait jouer un rôle dans la prise en charge de l'apocytochrome *c* pour sa réduction par la CcsX et pour l'accrochage de l'hème. Chez *N. meningitidis*, les gènes putatifs des protéines d'export de l'hème nommées ResB et ResC (par homologie au système décrit chez *B. pertussis* : ResA (DsbE), ResB (CcsB) et ResC (CcsA)) sont annotés. Il est raisonnable de penser qu'un tel complexe pourrait donc également se former chez *N. meningitidis*, à savoir entre ResC / ResB / hème-DsbE1 / apocytochrome *c* (Figure 98). Nous avons donc commencé l'expression chez *E. coli* et la purification de ces protéines d'export de l'hème : ResB et ResC ; le but étant de tester la réduction de l'apocytochrome *c* par la DsbE1 *in vitro* en présence de ces protéines.

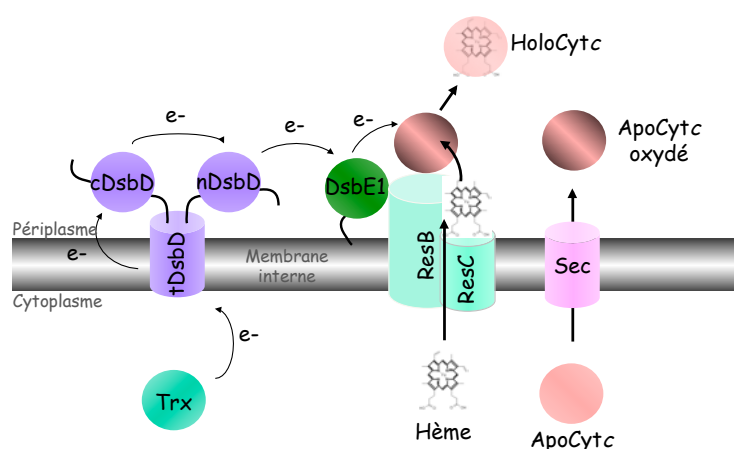


Figure 98 : Système de maturation des cytochromes *c* proposé dans le périplasma de *N. meningitidis*.

Le transfert d'électrons est représenté par des flèches fines.

Enfin, lors de sa thèse, le Dr A. Gand avait identifié la DsbE1 comme étant la disulfure oxydoréductase impliquée dans la maturation des cytochromes *c* chez *N. meningitidis* par des expériences de complémentation fonctionnelle chez *B. pertussis*. Nous avons montré que la délétion du gène *dsbE1* chez *N. meningitidis* avait pour conséquence une absence de maturation des cytochromes de type *c*, mais contrairement à ce qui était attendu cette délétion n'est pas létale pour la bactérie. Or, chez *N. meningitidis*, il existe trois accepteurs finaux d'électrons : la cytochrome *c* oxydase (O_2), AniA (NO_2^-) et NorB (NO). Les deux premiers utilisent comme donneur d'électrons des cytochromes *c*, alors que pour le dernier, les électrons viendraient directement de l'UQ (Figure 40 page 62) (Deeudom *et al.*, 2006 et 2008). La croissance des mutants de *N. meningitidis*, qui ne possèdent plus de cytochromes *c*, pourrait donc s'expliquer par l'utilisation de NO en tant qu'accepteur final d'électrons. Il conviendra donc de tester cette hypothèse en suivant par exemple la consommation de NO , ou en délétant le gène *norB* du mutant conditionnel.

Annexes

ARTICLE

^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*

Marc Quinternet ■ Laure Selme ■ Chrystel Beauflis ■ Pascale Tsan ■
Christophe Jacob ■ Sandrine Boschi-Muller ■ Marie-Christine Averlant-Petit ■
Guy Branlant ■ Manh-Thong Cung

Received: 20 February 2008 / Accepted: 31 March 2008
• Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract We report the nearly complete ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. Secondary structure determination using CSI method leads to the prediction of nine β -sheet parts.

Keywords N-terminal domain of DsbD • *Neisseria meningitidis* • Mutant

Biological context

The *Escherichia coli* DsbD is a transmembrane protein enabling an electron transfer from the cytoplasmic thioredoxin to periplasmic proteins, such as DsbC, DsbG, and CcmG involved in disulfide bond isomerization of periplasmic proteins (Nakamoto and Bardwell 2004) and in cytochrome *c* maturation pathway (Reid et al. 2001). The *E. coli* DsbD is composed of three domains: a transmembrane domain (TMD), a periplasmic Trx-like C-terminal domain (cDsbD), and a periplasmic Immunoglobulin-like N-terminal domain (nDsbD). It has been suggested that electrons could be initially transferred from TMD to cDsbD, then from cDsbD to nDsbD. These three domains

contain two cysteines needed for electron transport (Rozhkova et al. 2004). The nDsbD domain is in charge to reduce its periplasmic partners, all of them belonging to the Trx-like superfamily.

Recently, it has been suggested that *E. coli* nDsbD could interact with the Trx-like N-terminal domain of PilB from *Neisseria gonorrhoeae* to reduce downstream methionine sulfoxide reductase domains of PilB (Brot et al. 2006). The crystal structures from *E. coli* nDsbD (Goulding et al. 2002) and cDsbD (Stirnemann et al. 2006) have been reported. Moreover, NMR studies on the C-terminal domain of the DsbD protein have been performed in order to characterize its active-site properties (Mavridou et al. 2007). We now report the nearly complete ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignment of the C103S mutant of nDsbD from *Neisseria meningitidis* (nDsbD_{C103S}, 128 residues). This work aims at providing NMR investigations on the N-terminal domain of the DsbD protein and at enlarging to *Neisseria* genus the range of structural studies on DsbD, so far limited to *E. coli*. Assignment is a prerequisite to obtain the solution structure and to access protein dynamics. Then, the knowledge of all these parameters should permit to identify the structural and dynamic factors involved in the recognition between nDsbD and its various Trx-like partners in *Neisseria* genus.

M. Quinternet • C. Beauflis • P. Tsan • M.-C. Averlant-Petit •
M.-T. Cung (✉)
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire,
UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy-Université, 1 rue Grandville,
B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France
e-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

L. Selme • C. Jacob • S. Boschi-Muller • G. Branlant
Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567
CNRS-UHP, Nancy-Université, Bld des Aiguillettes, B.P. 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for nDsbD_{C103S} (D₁₉₋₁₄₆) production was C41-DE3 transformed with pETnDsbD_{C103S} plasmid, obtained by cloning the corresponding fragment of the nDsbD open reading frame synthesized by PCR (sequences of oligonucleotides not shown) using *N. meningitidis* 8013 genomic DNA, kindly provided by

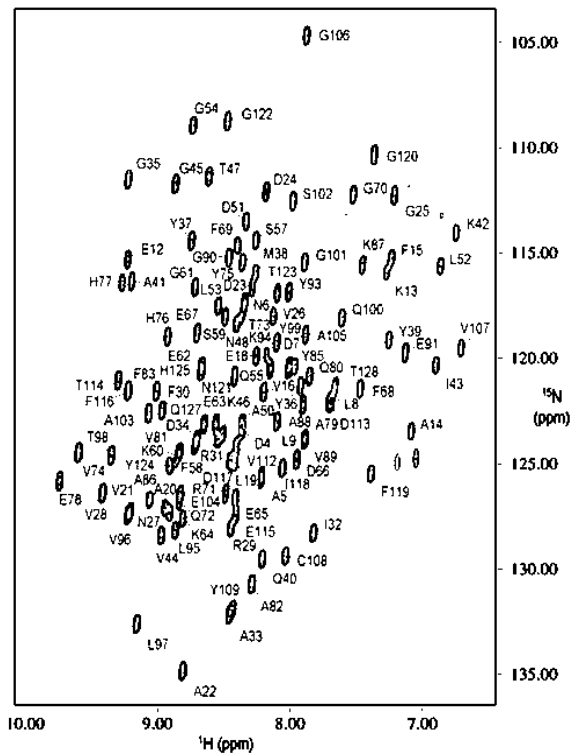


Fig. 1 2D ^1H - ^{15}N TROSY spectrum of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *N. meningitidis* recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0

Dr X. Nassif (INSERM U570, Paris) between the NdeI and the SacI sites of the pET20b plasmid. $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled sample was prepared by growing cells in a minimal media with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the sole nitrogen source and with ^{13}C -labeled glucose as the only carbon source. The nDsbD_{C103S} production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 16 h for the $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein by centrifugation, resuspended in minimal volume of buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) with 20 mM DTT, and sonicated. After fractionated precipitation at 40% and 70% ammonium sulfate saturation, the contaminated proteins were removed by exclusion size chromatography on ACA54 gel (IBF) in buffer A. Purified fractions were then pooled and successively applied to a Q-Sepharose column and a Phenyl-Sepharose column connected to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences). The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The protein was isolated by gel filtration on Econo-Pac 10 DG Column (Bio-Rad laboratory) equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0.

The NMR sample contained 0.5 mM $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein concentration (90% H₂O, 10% D₂O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the programs

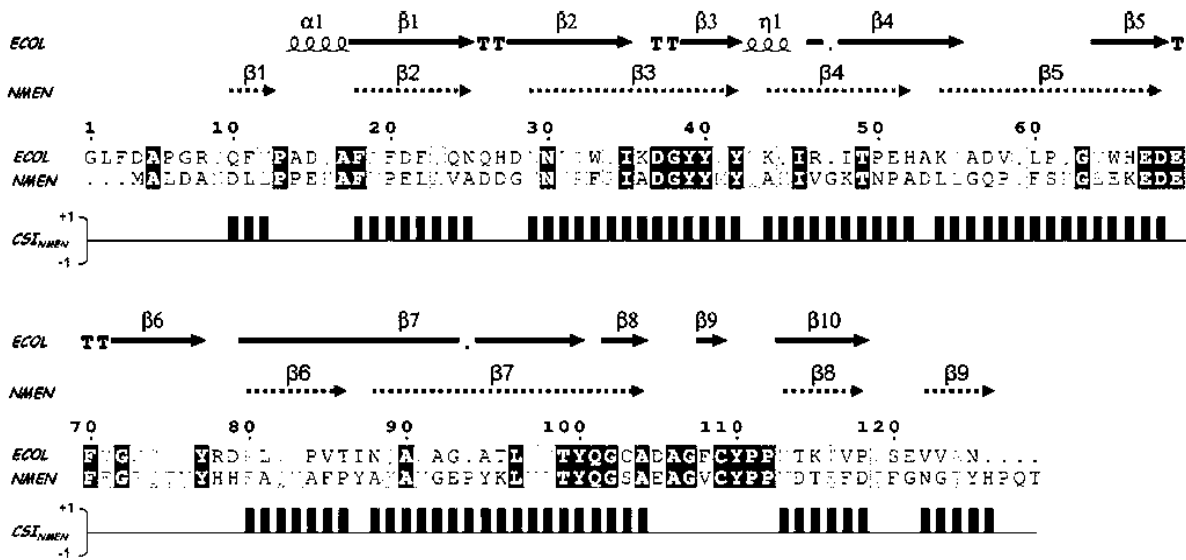


Fig. 2 Sequence alignment between *E. coli* nDsbD and *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} using Clustal W program (Thompson et al. 1994). Perfect amino acid matching is figured in dark boxes. b-strands for *E. coli* nDsbD and predicted b-strands for *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} are

represented using filled and dashed arrows respectively. Bar graphs of the consensus CSI for nDsbD_{C103S} are represented below the amino acid sequence and were calculated using the CSI program version 2.0. Figure was prepared with help of ESPrnt (Gouet et al. 1999)

^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of C103S mutant of N-terminal domain of DsbD

CARA (Keller 2004). Backbone amide $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\text{a}}$, $^1\text{H}^{\text{a}}$, $^{13}\text{C}^{\text{*}}$, and side chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, and ^1H - ^{15}N - and ^1H - ^{13}C -3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side chain assignments.

Torsion angles (ϕ, ψ) and secondary structure prediction are based on H^{N} , H^{a} , N , C^{a} , C^{b} , and $\text{C}^{\text{*}}$ chemical shifts using the TALOS and the CSI programs (Cornilescu et al. 1999; Wishart and Sykes 1994).

Extent of assignments and data deposition

The ^1H - ^{15}N TROSY spectrum for the nDsbD_{C103S} is shown in Fig. 1. More than 96% of backbone H^{N} , N , C^{a} , H^{a} , and $\text{C}^{\text{*}}$ nuclei have been assigned (i.e., 115/118 ^{15}N - H^{N} sites, 124/128 C^{a} , 134/139 H^{a} , 122/128 $\text{C}^{\text{*}}$). Proton and carbon chemical shift data for the side chain groups were determined using a combination of 3D spectra. Considering the overall side-chains carbon atoms of nDsbD_{C103S} but excluding carboxyl and guanidinium groups, * 79% of the carbon atoms were assigned (i.e., 113/117 C^{b} , 72/100 C^{c} , 64/76 C^{d} , 30/46 C^{e} , 4/17 C^{f}). Considering the overall side-chains proton atoms but excluding amino, alcohol, and guanidinium groups, * 88% of the proton atoms were assigned (i.e., 217/228 H^{b} , 168/184 H^{c} , 113/134 H^{d} , 36/55 H^{e} , and 4/8 H^{f}). The chemical shifts of nDsbD_{C103S} were deposited in the BioMagResBank under the accession number 15627 (<http://www.bmrb.wisc.edu>).

Alignment between *E. coli* and *N. meningitidis* nDsbDs amino acids sequences shows that many residues around the active cysteines are conserved (Fig. 2). The evaluation of the obtained H^{a} , $\text{C}^{\text{*}}$, C^{a} , and C^{b} chemical shifts by the CSI program leads to the prediction of nine β -sheet segments [b1 (D8-L10), b2 (F16-A23), b3 (V27-Y40), b4 (A42-A51), b5 (L53-D67), b6 (E79-P85), b7 (A87-A104), b8 (V113-D118), and b9 (N122-H126)] suggesting however, that structural differences exist between the *E. coli* nDsbD and the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S}. The numbering of amino acid residues is based on the numbering of *E. coli* nDsbD.

Acknowledgments This research was supported by the CNRS, the Ministère Délégué à la Recherche (ACI BCMS047), Nancy-Université with Université Henri Poincaré University and INPL, the Conseil Régional de la Lorraine, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires, Nancy I was deeply appreciated.

References

- Brot N, Collet JF, Johnson LC, Jönsson TJ, Weissbach H, Lowther WT (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 281:32668–32675
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13:289–302
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F (1999) ESPript: multiple sequence alignments in Postscript. *Bioinformatics* 15:305–308
- Goulding CW, Sawaya MR, Parseghian A, Lim V, Eisenberg D, Missiakas D (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41:6920–6927
- Keller R (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment, Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland
- Mavridou DA, Stevens JM, Ferguson SJ, Redfield C (2007) Active-site properties of the oxidized and reduced C-terminal domain of DsbD obtained by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 370:643–658
- Nakamoto H, Bardwell JC (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694:111–119
- Reid E, Cole J, Eaves DJ (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J* 355:51–58
- Rozhkova A, Stirnimann CU, Frei P, Grauschopf U, Brunisholz R, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J* 23:1709–1719
- Stirnimann CU, Rozhkova A, Grauschopf U, Boeckmann RA, Glockshuber R, Capitani G, Gruetter MG (2006) High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J Mol Biol* 358:829–845
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171–180

Solution Structure and Backbone Dynamics of the Cysteine 103 to Serine Mutant of the N-Terminal Domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*^{†,‡}

Marc Quinernet,[§] Pascale Tsan,[§] Laure Selme,^{||} Chrystel Beauflis,[§] Christophe Jacob,^{||} Sandrine Boschi-Muller,^{||} Marie-Christine Averlant-Petit,[§] Guy Branlant,^{*,||} and Manh-Thong Cung^{*,§}

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy cedex, France, and Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received July 17, 2008; Revised Manuscript Received September 22, 2008

ABSTRACT: The DsbD protein is essential for electron transfer from the cytoplasm to the periplasm of Gram-negative bacteria. Its N-terminal domain dispatches electrons coming from cytoplasmic thioredoxin (Trx), *via* its central transmembrane and C-terminal domains, to its periplasmic partners: DsbC, DsbE/CcmG, and DsbG. Previous structural studies described the latter proteins as Trx-like folds possessing a characteristic C-X-X-C motif able to generate a disulfide bond upon oxidation. The *Escherichia coli* nDsbD displays an immunoglobulin-like fold in which two cysteine residues (Cys103 and Cys109) allow a disulfide bond exchange with its biological partners. We have determined the structure in solution and the backbone dynamics of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. Our results highlight significant structural changes concerning the β -sheets and the local topology of the active site compared with the oxidized form of the *E. coli* nDsbD. The structure reveals a “cap loop” covering the active site, similar to the oxidized *E. coli* nDsbD X-ray structure. However, regions featuring enhanced mobility were observed both near to and distant from the active site, revealing a capacity of structural adjustments in the active site and in putative interaction areas with nDsbD biological partners. Results are discussed in terms of functional consequences.

The DsbD¹ protein is a transmembrane transporter of two electrons from the cytoplasm to the periplasm of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. DsbD is composed of three domains, all possessing two essential cysteine residues: the C- and the N-terminal domains (cDsbD and nDsbD) lie in the periplasm, whereas the third central transmembrane domain (tDsbD) is embedded in the inner membrane (1–6). The mechanism by which the electrons

are transferred is composed of three steps involving each of the three domains: electrons are first transferred (i) from the cytoplasmic thioredoxin (Trx) to tDsbD, (ii) then from tDsbD to cDsbD, and (iii) finally from cDsbD to nDsbD (7–11). The nDsbD directs the electron flow either toward the cytochrome *c* biogenesis pathway, *via* the protein DsbE/CcmG, or toward the protein DsbC involved in the disulfide isomerization and in the chaperoning system (12–14). Moreover, it has been shown that *E. coli* nDsbD could also interact with the protein DsbG the function of which is unknown so far (15). All the electron transfers are mediated through disulfide bond protein exchanges between reduced and oxidized forms.

A few years ago, the structure of the oxidized form of the *E. coli* nDsbD was determined by X-ray crystallography (4). It displays a particular hydrophobic active site in which active cysteines (Cys103 and Cys109) are covered by a “cap loop” region (residues Asp68–Gly72) that protects them from the environment and blocks the active site from accessibility. Therefore, a structural displacement of the cap from the active site has to occur prior to reduction of the disulfide of nDsbD by cDsbD (16). An X-ray structural study of the mixed disulfide complex between these two partners has permitted insight to the opening of the cap concomitant to a significant repositioning of Phe70. Further, the inspection of X-ray structures of other mixed disulfide complexes involving, on one hand, *E. coli* nDsbD and, on the other hand, downstream partners DsbE/CcmG or DsbC has also shown the opening of the cap and the changeover of Phe70

[†] This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, and the IFR 111 Bioingénierie. M.Q. and L.S. gratefully thank the French Ministry of Research, the CNRS, and the Région Lorraine for financial support.

[‡] The ¹H, ¹³C, and ¹⁵N chemical shifts for nDsbD_{C103S} have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under BMRB accession number 15627 and the ensemble of 20 NMR representative structures of nDsbD_{C103S} has been deposited in the RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) under access code 2k0r.

* To whom correspondence should be addressed, M.-T.C.: phone, (33) 3 83 17 51 07; fax, (33) 3 83 37 99 77; e-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr. G.B.: phone: (33) 3 83 68 43 04; fax, (33) 3 83 68 43 07; e-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

[§] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire.

^{||} Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire.

¹ Abbreviations: CcmG, Cytochrome *c* maturation protein from *E. coli*; Dsb, disulfide-bond formation (DsbA, DsbC, DsbD, DsbE, DsbG); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PilB, type IV pilus assembly protein from *Neisseria meningitidis*; rms, root-mean-square; rmsd, rms deviation; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Trx, thioredoxin; TSP-d₄, (trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt.

(17). No 3D structure of the reduced form of the nDsbD has been described so far. Moreover, all of the structures of *E. coli* nDsbD (i.e., the oxidized form and the structures in covalent complexes with its biological partners) were determined by X-ray technique, which does not allow characterization of internal motions of a protein.

Recently, it has been shown that *E. coli* nDsbD is able to reduce *in vitro* the oxidized form of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria gonorrhoeae*, which belongs to the DsbE structural family (18). Furthermore, in addition to these qualitative data, nDsbD from *Neisseria meningitidis* was recently isolated by our group and was shown to efficiently reduce the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* (k_2 value of $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, unpublished results).

In the present work, we have resolved the 3D structure in solution and backbone dynamics of the reduced form of nDsbD from *Neisseria meningitidis* using NMR spectroscopy. In fact, it is the C103S nDsbD (nDsbD_{C103S}), which has been studied with the subsequent objective to characterize the dynamic and structural factors involved in molecular recognition with biological partners. The structural and dynamic properties of nDsbD_{C103S} are discussed, especially for the active site and regions putatively involved in interaction, in terms of functional consequences.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. The *E. coli* strain used for nDsbD_{C103S} (Δ19–146) production was C41(DE3) transformed with pETnDsbDC103S plasmid. The corresponding nDsbD fragment was obtained by PCR from *dsbD* ORF (sequences of oligonucleotides not shown), using *N. meningitidis* 8013 genomic DNA, kindly provided by Pr. Nassif (INSERM U570, Paris) between the *Nde*I and the *Sac*I sites of the pET20b plasmid. ¹⁵N/¹³C-labeled sample was prepared by growing cells in a minimal media with ¹⁵NH₄Cl as the sole nitrogen source and with ¹³C-labeled glucose as the only carbon source. The nDsbD_{C103S} production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 16 h for the ¹⁵N/¹³C protein by centrifugation, resuspended in minimal volume of buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) with 20 mM DTT, and sonicated. After fractionated precipitation at 40% and 70% ammonium sulfate saturation in buffer A, the contaminating proteins were removed by exclusion size chromatography on ACA54 gel (IBF) equilibrated with buffer A. Purified fractions were then pooled and successively applied to a Q-Sepharose column equilibrated with buffer A, followed by a linear gradient from 0 to 0.4 M KCl (nDsbD_{C103S} was eluted at 100 mM KCl) and a Phenyl-Sepharose column equilibrated with buffer A containing 1 M (NH₄)₂SO₄, followed by a linear gradient from 1 to 0 M (NH₄)₂SO₄ in buffer A (nDsbD_{C103S} was eluted at 700 mM (NH₄)₂SO₄) connected to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences). The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The protein was isolated by gel filtration on Econo-Pac 10 DG Column (Bio-Rad laboratory) equilibrated with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0. The NMR sample contained 0.5 mM ¹⁵N/¹³C protein concentration (90% H₂O, 10% D₂O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0.

NMR Spectroscopy. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARRA (19). TSP-*d*₄ (Euriso-top) was used as an internal reference for ¹H chemical shift, whereas indirect referencing was used for ¹³C and ¹⁵N chemical shifts (20). Backbone amide ¹HN, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹H^α, and ¹³C' and side-chain ¹H and ¹³C resonances were assigned using ¹H–¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, CC(CO)NH, and ¹H–¹⁵N, ¹H–¹³C HSQC–NOESY spectra at two different mixing times (70 and 100 ms) were also performed for side-chain assignments. The slow amide proton exchange in D₂O solution (21) and temperature-dependence at five different temperatures (287, 291, 296, 298 and 305 K) (22) and the long-range HNCO experiment were used to determine the hydrogen-bond pattern of the protein (23).

Structure Calculations. Interproton distance restraints were derived from two-dimensional ¹H/¹⁵N NOESY experiment and three-dimensional ¹H–¹³C/¹⁵N HSQC–NOESY experiments. First, ATNOS/CANDID program was used to obtain, after seven cycles, an initial set of restraints (24, 25). Second, the NOE cross-peak assignments and intensities were checked visually, and the restraint set was refined. Restraints for the pseudoatoms were systematically overestimated. The occurrence of a hydrogen bond was defined as a couple of distance restraints with an upper limit of 2.0 Å (up to 2.4 Å in few cases) between the acceptor heavy atom and the hydrogen atom and an upper limit of 3.0 Å (up to 3.3 Å in a few cases) between the acceptor and donor heavy atoms. Torsion restraints for the Φ and Ψ angles were derived from the program TALOS (26), and all the peptide bonds were kept planar and *trans*.

A total of 1500 randomized structures were calculated, and a simulated annealing process was performed using the program CYANA (27). The 20 structures with the lowest target function were selected and refined using DISCOVER (Accelrys Inc., San Diego, CA). Figures were drawn with the program MOLMOL (28).

¹⁵N Relaxation Experiments. The ¹⁵N longitudinal relaxation rate (*R*₁), ¹⁵N transverse relaxation rate (*R*₂), and steady-state {¹H}–¹⁵N heteronuclear NOE experiments were recorded at 298 K on a Bruker 600 MHz spectrometer, using the usual pulse sequences (29). A total of 256 (¹⁵N) and 2048 (¹H) complex points were collected for the *R*₁ and *R*₂ experiments, with eight transients per increment and a recycle delay of 5 s. Ten inversion recovery delays of 2, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, and 1200 ms were used for *R*₁ measurement, whereas eight delays of 8, 16, 32, 48, 64, 80, 112, and 144 ms were used during the CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) period of the *R*₂ experiments. {¹H}–¹⁵N NOE spectra were recorded in an interleaved way with and without proton saturation during relaxation delay, using 256 × 2 (¹⁵N) and 2048 (¹H) complex points and 56 transients per increment typically. The ¹H saturation was achieved by the application of 120° ¹H pulses separated by 5 ms for a period of 4 s. Spectral widths for all heteronuclear experiments were 2433 Hz (¹⁵N) and 8389 Hz (¹H) with carrier frequencies at 117.6 and 4.70 ppm, respectively. Data were processed using XWINNMR (Bruker).

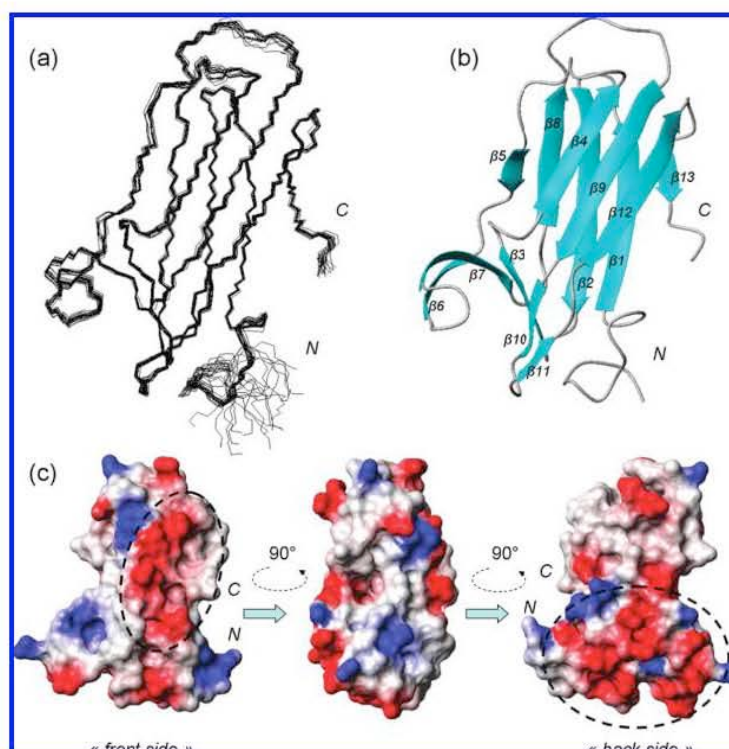


FIGURE 1: Solution structure of nDsbD_{C103S}: (a) backbone superimpositions from Asn9 to Tyr125 are shown for the 20 representative structures; (b) the different secondary structure elements are figured on the mean structure; (c) the electrostatic potential is represented on three different spatial orientations of nDsbD_{C103S} NMR mean structure using blue (for positive potential), red (for negative potential), and white (for neutral potential) color graduations.

er). They were zero-filled in the ^{15}N dimension and apodized with a shifted square sine-bell window in both dimensions.

Backbone Dynamics Analysis. NMRVIEW software (30), version 6.6.2, was used to measure the peak heights of the ^{15}N – ^1H cross-peaks and to determine the R_1 and R_2 values from a fit to a single-exponential decay function and also the $\{^1\text{H}\}$ – ^{15}N heteronuclear NOE from the ratio between the intensities of a peak in the spectra collected with and without proton saturation. All experiments were performed twice to provide an estimation of the uncertainty on R_1 , R_2 , and NOE values.

R_1 , R_2 , and NOE relaxation parameters were analyzed by means of reduced spectral density mapping at $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_{\text{N}})$, and $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ values (31–34) using a chemical shift anisotropy of -160 ppm for the backbone amide group (35) and a NH bond length of 1.02 Å. $J_{\text{eff}}(0)$ denotes that the exchange contribution to R_2 is not explicitly considered (36). $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ is the average of $J(\omega_{\text{H}})$, $J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})$, and $J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}})$, which can be approximated by $J(0.87\omega_{\text{H}})$ (31). Tensor2 (37) was used for the Lipari–Szabo analysis (38, 39) of the backbone ^{15}N relaxation parameters. Only residues in secondary structure elements were used for determination of the overall tumbling.

RESULTS

Structure Calculations of nDsbD_{C103S}. nDsbD_{C103S} has been studied in a soluble state ranging from Met4 to Thr129, the numbering following that of the N-terminal domain of DsbD from *E. coli*. The chemical shift assignments have been previously reported (40). A nearly complete assignment of

the backbone and of the side chains has been realized except for Ala5, Leu6, Pro13, and Pro111. Superimposition of ^1H – ^{15}N HSQC spectra of the C103S mutant with the wild-type *N. meningitidis* nDsbD does not display major chemical shift variations of backbone amide groups, except for some residues in the vicinity of S103; this observation suggests that the mutant and wild-type proteins exhibit the same structural features (see Supporting Information, Figure S1). Moreover, no significant chemical shift perturbation is observed for C^α and C^β atoms of all the residues, except of course, for the residue 103 (data not shown).

The NMR solution structure of nDsbD_{C103S} was calculated using NOE-derived restraints, backbone dihedral angle restraints derived from TALOS prediction (26), and hydrogen bond restraints obtained from the long-range HNCOC experiment (23). The superimposition of the 20 representative structures for nDsbD_{C103S} is shown in Figure 1a, and the structural statistics are summarized in Table 1. Only two restraint violations greater than 0.3 Å have been observed. According to PROCHECK-NMR analysis (41), 79.0% of the nonglycine and the nonproline residues remain in the most favored regions of the Ramachandran plot, whereas 15.2% and 4.8% of the whole residues are, respectively, in the additionally allowed and generously allowed regions. Only 1% of the residues (Lys62) is located in disallowed regions. Moreover, the fine packing quality control analysis, performed with WHAT IF (42) using the most representative structure of nDsbD_{C103S}, identifies this structure as a good one (WHAT IF Z-score for all contacts of -1.34). Considering the sequence from Asn9 up to Tyr125, the final 20

Table 1: NMR-Derived Geometrical Restraints and Structural Statistics of the Entire Conformational Set of nDsbD_{C103S}

restraint	number
upper interproton	
total of distance restraints	2059
intra	350
short	641
medium	227
long distance	751
H-bonds ^a	90
dihedral angle	154
ϕ	66
ψ	69
violation	occurrence
distance violation >0.3 Å	2
dihedral violation >5°	0
Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR)	
residues in the most favorable region (%)	79.0
residues in additionally allowed regions (%)	15.2
residues in generously allowed regions (%)	4.8
residues in disallowed regions (%)	1.0
Fine packing quality control (WHAT IF) ^b	
Z-score for all contacts	-1.34
atoms (residues 9–125)	rmsd (Å)
backbone	0.43 ± 0.09
heavy	1.10 ± 0.12

^a Each hydrogen bond is treated as two distance restraints so that 45 hydrogen bonds lead to 90 distance restraints. ^b The analysis has been performed using the most representative structure of nDsbD_{C103S}

calculated structures exhibit an atomic rmsd from the mean structure of 0.43 ± 0.09 Å for the backbone atoms and 1.10 ± 0.12 Å for all heavy atoms. In parallel to atomic rmsd, all Φ and Ψ dihedral angles are well-defined with low standard deviations except the Met4–Leu11, Ala52–Asp53, Ser61–Glu64, and Ala88–Glu93 sequences for which significant standard deviation values are observed and are indicative of less-defined structural parts.

Structure Analysis of nDsbD_{C103S}. The core of the protein exhibits mainly three β -sheets, all composed of antiparallel individual strands (Figure 1b). The first β -sheet comprises five strands from Phe18 to Val24 for β 1, Gly28 to Ile35 for β 2, Ser59 to Phe60 for β 5, Glu80 to Pro86 for β 8, and Thr124 to Tyr125 for β 13. The second β -sheet comprises five strands from Tyr39 to Tyr42 for β 3, Glu64 to Glu67 for β 6, Arg73 to Tyr77 for β 7, Gly102 to Ala104 for β 10 and Val108 to Cys109 for β 11. The third β -sheet comprises three strands from Val47 to Asn50 for β 4, Tyr94 to Tyr100 for β 9, and Val113 to Ile119 for β 12. All these β -strands are clearly well-defined as proven by a weak backbone rmsd value of 0.27 ± 0.07 Å on β -stranded secondary structures. According to NOE restraint data, one α -helix turn seems possible from Pro14 to Ala17. Globally, only the N-terminal region, from Met4 to Ala8, is largely disordered in all 20 NMR structures due to the partial chemical shift assignment and the lack of NOE restraints.

As investigated on DALI (43) and VAST (44) servers, the fold adopted by nDsbD_{C103S} is part of the immunoglobulin superfamily. Two main features characterize the structure adopted by this protein in solution: the first and the third β -sheets are arranged in a β -sandwich, while the second

β -sheet forms a partial β -barrel. More precisely, the β -sandwich is mainly formed by strands β 1, β 2, and β 8 on one hand and strands β 4, β 9, and β 12 on the other hand. It is flanked by strands β 5 and β 13, which are, respectively, hydrogen bonded to strands β 8 and β 1 (Figure 1b). These hydrogen bonds were highlighted by the NMR HNCO long-range experiment. The partial β -barrel contains the active site (Figure 2a). Indeed, Ser103 (equivalent to *E. coli* Cys103) and Cys109 are, respectively, located on strands β 10 and β 11, and both side chains point toward the inner cavity of the partial β -barrel. More precisely, side chains of Tyr40, Tyr42, and Phe70 point toward Ser103 and Cys109, the conformation of aromatic rings being well-defined in all 20 NMR structures. Besides, the cavity of the partial β -barrel contains four aromatic side chains, thus endowing the active site with a particularly hydrophobic environment, enhanced by the side chain of Val76. Moreover, the aromatic rings of Tyr39 and Tyr110 lie on the external face of the partial β -barrel and cover the backbone atoms of Ser103 and Cys109, the residues Ala104, Ala106, and Val108 enhancing the hydrophobicity of this external face. All of these features give the inner active site a particular hydrophobic character.

The electrostatic potential of nDsbD_{C103S} surface has been calculated and figured using MOLMOL (28). As far as the “back side” of nDsbD_{C103S} (see Figure 1c for spatial orientation) is considered, it points out that potential charges are spread over the surface of strand β 6 and surrounding residues. Indeed, the potential charges of Asp37 and Glu105 permit definition of a remarkable negatively charged side of the nDsbD_{C103S} active site. The same phenomenon is observed on the “front side” along strand β 12. In contrast, the surface of the region opposite to the active site is globally less charged.

Reduced Spectral Density Mapping and Model-Free Analysis. The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2), and steady-state $\{^1\text{H}\}$ – ^{15}N heteronuclear NOE values of nDsbD_{C103S} were measured for 107 backbone NH groups out of the 118 nonproline residues, (Figure 3a–c). The unanalyzed residues either were unassigned or overlapped. The average values for the backbone ^{15}N -nuclei are: $\langle R_1 \rangle = 1.51 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$; $\langle R_2 \rangle = 9.41 \pm 0.31 \text{ s}^{-1}$; $\langle \text{NOE} \rangle = 0.74 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$. The relaxation parameters plotted versus the protein sequence globally display a nonlinear profile. For instance, a sharp drop of all three parameters is found within the N- and C-termini, around Val91, and here and there along the sequence.

Reduced spectral density mapping, which does not require any model, was used first to analyze the relaxation data. The $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$, and $\langle J(\omega_H) \rangle$ obtained values are represented in Figure 3d–f. A sharp decrease of $J_{\text{eff}}(0)$ compensated for a large increase of $\langle J(\omega_H) \rangle$ observed within the N-terminus, the C-terminus, and the segment Lys89–Glu93 and for residue Gly121. This indicates the flexibility at both extremities of the protein, as well as in the β 8– β 9 loop and for Gly121. Residues Glu15, Gln43, Ala44, Gly63, and Val108 exhibit relatively high $J_{\text{eff}}(0)$ values, while their $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ values are not lower than the average, which suggests the contribution of microsecond–millisecond time scale chemical exchange. $J(\omega_N)$ values do not vary much along the sequence, indicating proximity to the isobestic frequency, where the contribution of $J(\omega)$ is independent of the internal mobility (46).

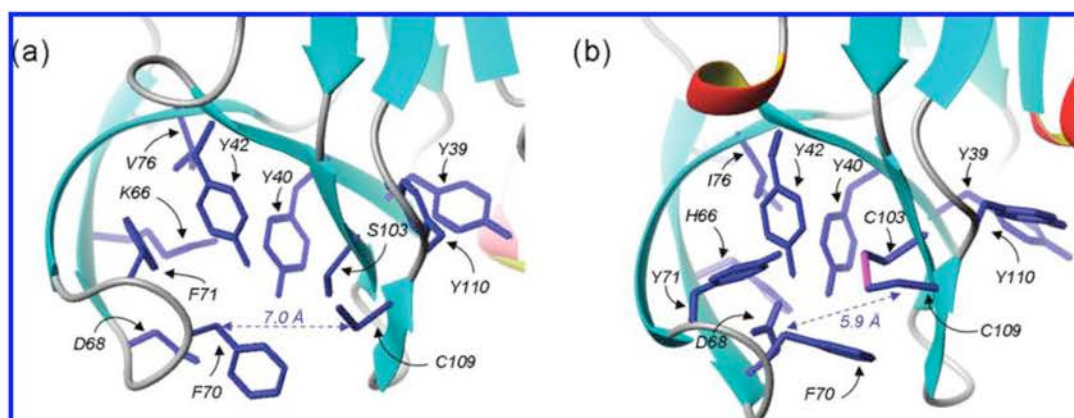


FIGURE 2: Active site of the most representative NMR solution structure of *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (a) and X-ray oxidized structure of *E. coli* nDsbD (b). Only heavy atoms are represented for the side chains. The disulfide bond in *E. coli* nDsbD X-ray structure is figured in purple. The distance between C β atoms of residues Phe70 and Cys109 is indicated with dashed arrows.

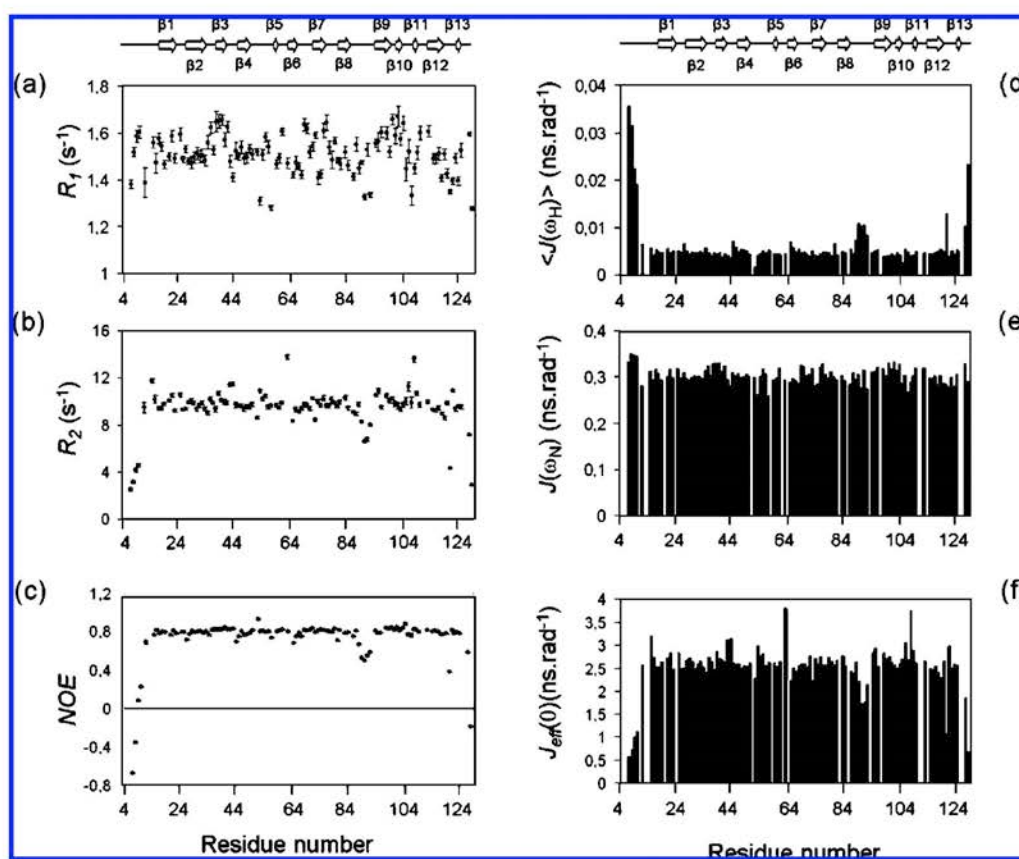


FIGURE 3: ^{15}N longitudinal relaxation rates, R_1 (a), ^{15}N transverse relaxation rates, R_2 (b), and steady-state $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE values (c) of nDsbD_{C103S} are plotted versus the amino acid sequence. Reduced spectral density functions of nDsbD_{C103S}, $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ (d), $J(\omega_{\text{N}})$ (e), and $J_{\text{eff}}(0)$ (f), are also shown. Experiments were recorded on a Bruker DRX 600 MHz at pH 7.00, 25 °C. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

To get a detailed picture of the global and internal dynamics of nDsbD_{C103S}, the relaxation parameters were analyzed with a Lipari–Szabo approach (38, 39) by means of the Tensor2 software (37) and using the mean NMR structure. The R_2/R_1 ratios of the residues involved in secondary structures were used to determine the rotational diffusion tensor describing the overall tumbling of the protein. The principal components obtained are $D_x = 1.95 \times 10^7$, $D_y = 2.14 \times 10^7$, and $D_z = 2.57 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, which

gives a global correlation time of 7.38 ns, in agreement with a monomeric state. Besides, the direction of the principal axes, as well as the axial anisotropy ($2D_z/(D_x + D_y) = 1.26$) and the rhombicity ($D_x/D_y = 0.91$), are in agreement with the inertia tensor of the nDsbD_{C103S} structure (see Figure 4).

The results for the internal mobility are represented in Figure 5. The mean and median order parameters S^2 are respectively 0.81 and 0.86. As generally observed in proteins, the N- and C-terminal extremities of nDsbD_{C103S} show fast

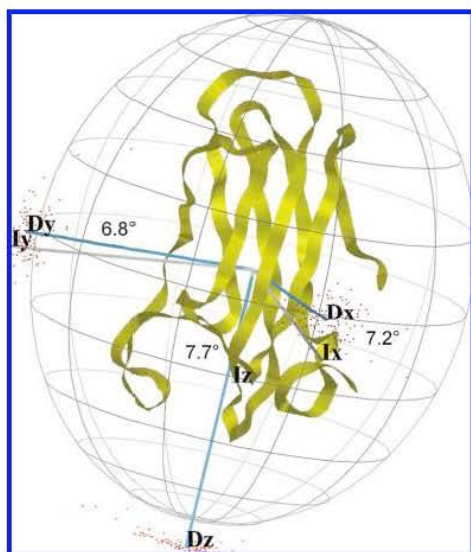


FIGURE 4: Representation of the principal axes D_x , D_y , and D_z of the diffusion tensor (blue) and of the principal axes I_x , I_y , and I_z of the inertia tensor (gray) on the nDsbD_{C103S} mean structure. The dispersion of the diffusion tensor axes, as determined by 100 Monte Carlo simulations, are reported using a scatter plot. The angle values between the respective axes of the diffusion tensor and of the inertia tensor are reported, and the N- and C-terminal regions are indicated. The figure has been generated by Tensor2 (37).

motions of large amplitude, as depicted by weak S^2 , associated here to internal correlation times $\tau_i < 0.1$ ns or $\tau_i > 0.1$ ns, and by high $\langle J(\omega_H) \rangle$ values. This can be related to the high backbone rmsd values observed in these segments (Figure 5a). Likewise, the region Ala90–Glu93, which lies at the opposite side of the active site and which is also less-defined in the NMR structure, displays similar striking dynamic features. Mobility is observed in the surrounding loops Ala25–Asp27 and Phe120–Gly123 too, as reflected by a weak S^2 , the presence of τ_i or that of chemical exchange. Chemical exchange is indeed highlighted by high R_{ex} term and $J_{eff}(0)$ values for residues Phe120 and Asn122, as well as for Glu15, Gln43, Ala44, Asp53, Gln57, Gly63, Tyr94, and Val108. It can be noticed that some particular residues, located in secondary structures, display interesting dynamics parameters notably in the region of strands β_6 and β_7 , even if their backbone rmsd is low. More precisely, Gly63, Glu65, Lys66, Glu67, Asp68, and Arg73, as well as the bend Gln43–Ile46, show particular profiles of reduced spectral density mapping and possess particular S^2 , τ_i , or R_{ex} terms (deviating at least from one standard deviation around the median value calculated on residues belonging to the core of the protein).

DISCUSSION

nDsbD_{C103S} Global Topology. *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} displays an immunoglobulin-like fold comprising first a β -sandwich and second an active site shaped as a partial β -barrel. DALI and VAST investigations list *E. coli* nDsbD as the best structural homologue to nDsbD_{C103S}. The amino acid sequence alignment shows that they share 26% sequence identity and that several residues surrounding the active site are conserved (Figure 6a). As expected, strong structural similarity is then observed with the oxidized *E. coli* nDsbD

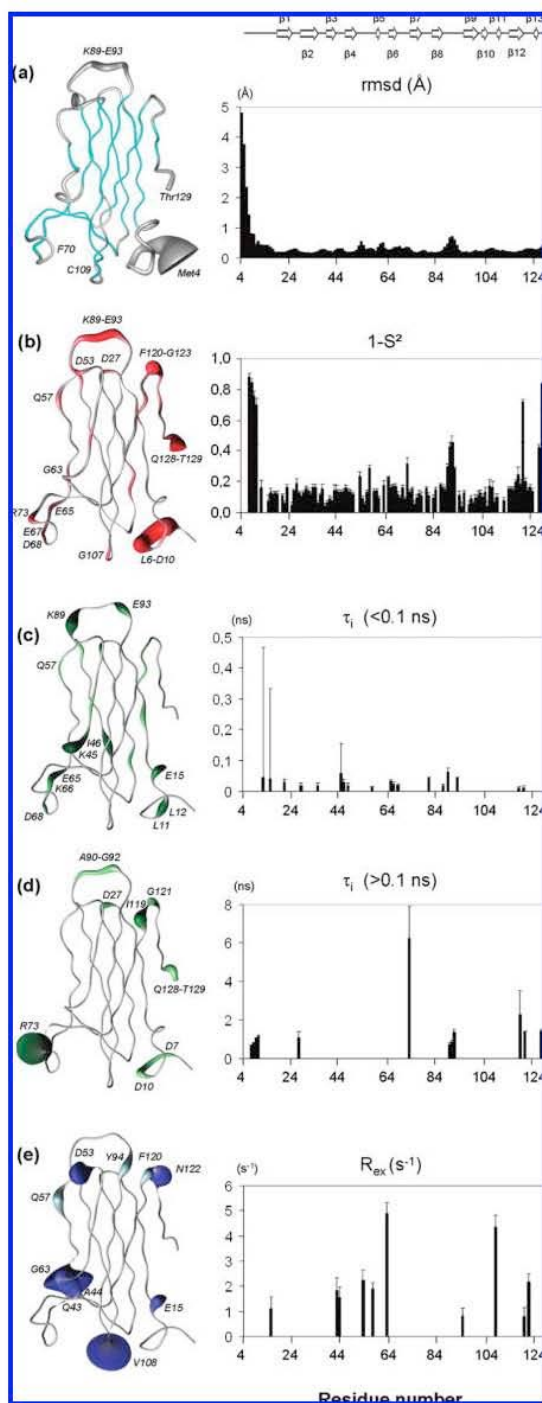


FIGURE 5: Backbone rmsd and model-free internal mobility parameters of nDsbD_{C103S}: (a) backbone rmsd; (b) order parameter S^2 ; (c) slow (>0.1 ns) and (d) fast (<0.1 ns) internal correlation time τ_i ; (e) exchange term R_{ex} versus the amino acid sequence. All these parameters are plotted versus the amino-acid sequence and are also shown on the mean structure with the following rules: for panel a, the width of the spline is proportional to rmsd value and blue color is used to indicate secondary structure elements; for panels b–e, the width of the spline and the color intensity are proportional to the values on the graphical representation; for high values, the proportionality factor with the width of the spline has been decreased to avoid plot overloading. Some particular residues have been reported on the structure to facilitate the reading of the schemes. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

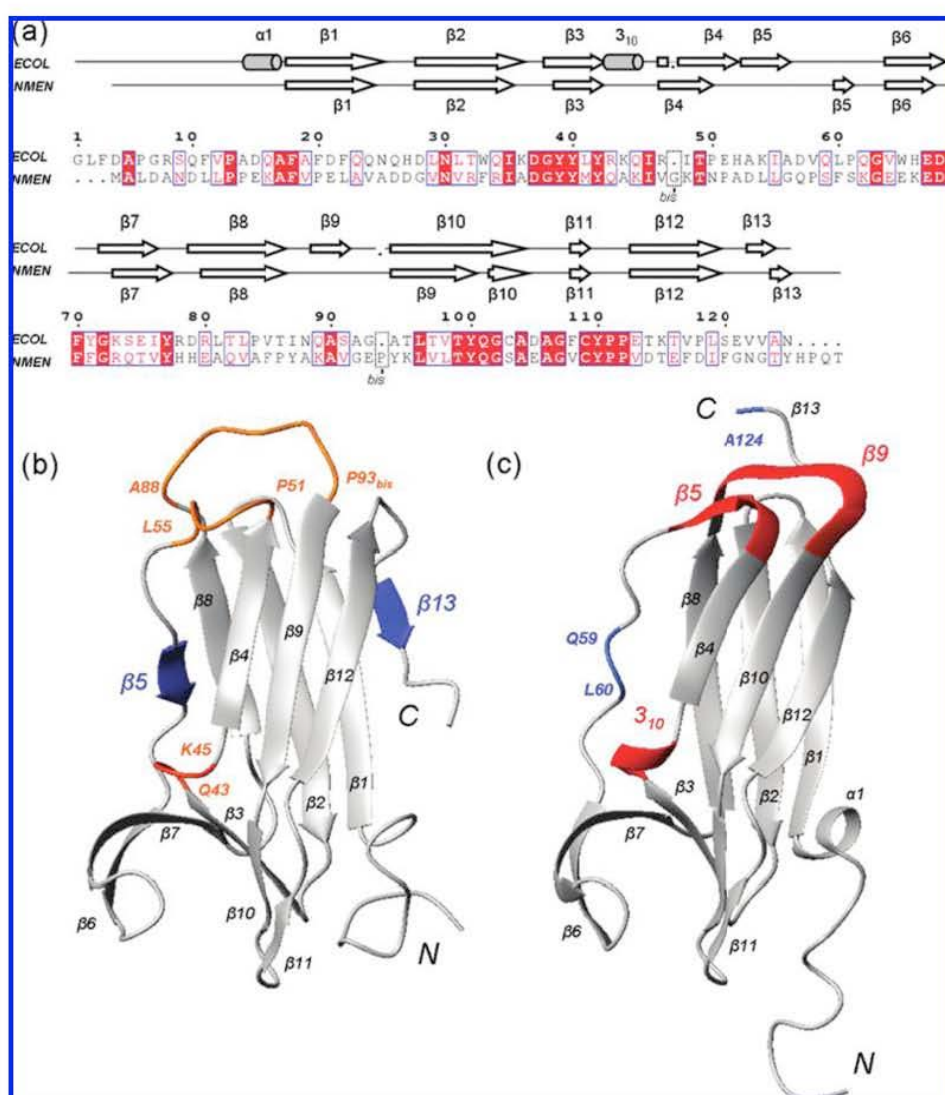


FIGURE 6: Alignment of amino acid sequence and secondary structures between *E. coli* nDsbD and *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (a). The numbering follows that of *E. coli* nDsbD, and the two insertions have been reported as residues Gly47_{bis} and Pro93_{bis}. The figure was prepared with help of *ESPrpt* (48). Secondary structure numbering of *E. coli* nDsbD was reported according to Goulding et al. (4). Comparison between nDsbD_{C103S} NMR solution structure (b) and *E. coli* nDsbD X-ray structure (c). The PDB access number 1L6P was used for *E. coli* nDsbD structure. Divergent secondary structure elements are, respectively, colored in blue and red on nDsbD_{C103S} and *E. coli* nDsbD structures. Absence of clear secondary structures on one or the other, structure is highlighted with clearer colors. The figures were prepared with MOLMOL using default setting for secondary structures display (28).

X-ray structure (PDB access code 1l6p and 1lpe) (4), the unique structure available for an unliganded state of this N-terminal domain. However, several differences, notably in the secondary structures, can be highlighted. First of all, obvious indications of conformational changes are highlighted by the high difference of the Φ and Ψ dihedral angle values comparing the well-defined parts of the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} NMR structure with those of the *E. coli* nDsbD X-ray structure (Figure 7). Significant changes are observed essentially for the segments between the different strands and, also to a lesser degree, for some residues inside the β 1, β 8, β 9, and β 10 strands in nDsbD_{C103S}. This leads to slight untwisting of the β -sandwich in nDsbD_{C103S}. A few minor differences can be underlined such as the length of the strands β 1, β 6, and β 7, one residue shorter than their equivalents in *E. coli* nDsbD. Besides, the segment Gln43–Ile46 does not form a 3₁₀-helix but only a bend,

which is consistent with the presence of exchange terms R_{ex} and fast τ_1 in this segment, since no secondary structure is observed. More importantly, several striking changes appear clearly in the composition of the β -sheets (Figure 6b,c). First, the first β -sheet of nDsbD is made up of three β -strands (β 1, β 2, and β 8) in *E. coli*, whereas it contains two short additional strands (β 5 and β 13) highlighted by long-range HNCO and 3D NOESY-HSQC experiments in *N. meningitidis*. The presence of these two strands is supported by the observation of high order parameters, similar to those found in the other rigid β -sandwich secondary structures of nDsbD_{C103S}. This major difference with *E. coli* nDsbD is due to the presence of hydrogen bonds in nDsbD_{C103S} between Ser59-NH and Ala84-CO and Ser61-NH and Gln82-CO creating strand β 5 and hydrogen bonds between Val24-NH and Gly123-CO and Leu22-NH and Tyr125-CO creating strand β 13. Second, despite compatible backbone torsion

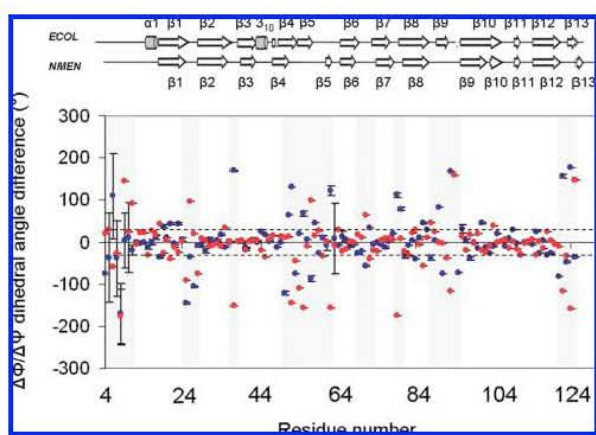


FIGURE 7: Graphical representation of the difference of Φ and Ψ dihedral angle values between the *E. coli* nDsbD X-ray structure and the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} NMR structure along the amino-acid sequence. The blue and the red circles represent the variation of $\Delta\Phi$ and $\Delta\Psi$, respectively. The horizontal lines at 30° and -30° delimit the regions that undergo significant Φ and Ψ dihedral angle changes. Secondary structures of the *E. coli* and *N. meningitidis* nDsbD structures are shown at the top.

angles, the segment Asp57–Gly63 in *E. coli* nDsbD X-ray structure does not display hydrogen bonds permitting the formation of a β -strand. In nDsbD_{C103S}, a β strand is found in this region. Third, as described by the authors, the C-terminal end of *E. coli* nDsbD is able to adopt, in the X-ray structure, a β -sheet conformation involving the *E. coli* β 5, β 9, and β 13 strands, which places this C-terminal segment on the opposite side of the N-terminus. Here, the four-residue longer C-terminal tail of nDsbD_{C103S} is completely reoriented compared with that of *E. coli* nDsbD: it forms a strand β 13 antiparallel to strand β 1 and thus comes closer to the N-terminal extremity. The mobility found in the preceding loop Phe120–Gly123 may permit this strand β 13 to move along strand β 1 and to participate to the β -sheet. These observations, done between nDsbD_{C103S} and *E. coli* nDsbD, highlight the powerful role of NMR in revealing clear structural differences across bacterial species or oxidation states.

The Active Site: A Hydrophobic Cavity Covered by a Cap Loop. As it has been observed for the oxidized *E. coli* nDsbD structure, the nDsbD_{C103S} active site contains a highly hydrophobic cavity with several aromatic residues. Likewise, the two strands β 6 and β 7 cover Ser103 and Cys109. The cleft of the partial β -barrel is thus cluttered with long side chains and access for substrates to active residues is consequently restricted. Interestingly, the so-called “cap loop” situated between strands β 6 and β 7 and more particularly the Phe70 side chain close the entrance to this cavity, like in the oxidized *E. coli* nDsbD. Therefore, the cap loop adopts a “closed position” and should possess a protective role in the reduced state too. Nevertheless, even if most of the residues forming the structure of the partial β -barrel in *E. coli* nDsbD are conserved in nDsbD_{C103S}, notably those whose side chains point toward the internal cavity, significant changes occur because of a single amino acid substitution at position 71 in the active site. Indeed, the aromatic ring of Phe71 from nDsbD_{C103S} is largely reoriented compared with its equivalent Tyr71 in *E. coli* nDsbD, which is less hydrophobic and points toward the solvent (Figure 2a,b). The

major consequence is to enlarge the internal diameter of the cavity. In nDsbD_{C103S}, the aromatic ring of Phe71 interacts in a parallel manner with that of Tyr42, interacting itself with Tyr40 and Ser103. To avoid steric congestions, this network of interactions forces the cleft of the partial β -barrel to be larger. In *E. coli* nDsbD, the aromatic ring of Tyr42 interacts with Tyr40 and Cys103 but orthogonally to that of Tyr71. The steric constraints are consequently weaker inside the cavity. That is the reason that the aromatic ring of Phe70 can move closer to Cys109, thus involving a tightening of the partial β -barrel, as depicted by the decrease of distance from 7.0 to 5.9 Å between the C β atoms of Phe70 and Cys109 compared with their equivalent residues in nDsbD_{C103S} (see Figure 2).

Role of Asp68. It had been proposed that the Tyr42 residue from *E. coli* nDsbD could mediate, instead of a water molecule, the proton transfer between Asp68 and Cys103 residues, thanks to close distances between the hydroxyl, carboxyl, and thiol groups of the latter residues (4). In the bunch of nDsbD_{C103S} NMR structures, the mean distance between the O γ from Tyr42 residue and the O γ from Ser103 residue is equal to 4.16 ± 0.21 Å. This is comparable to the distance of 3.51 Å found for the equivalent residues in *E. coli* oxidized nDsbD and compatible with the hypothesis raised by Goulding et al. (4). However a mean distance of 6.48 ± 0.66 Å is observed between the O γ from Tyr42 residue and the carboxyl group of Asp68 residue in nDsbD_{C103S}, whereas the corresponding atoms in *E. coli* nDsbD are separated by only 2.69 Å. Moreover it seems that these two residues do not display the sufficient dynamic properties to come closer. In regards to all these structural features, it is likely that the proton transfer between Asp68 and Cys103 residues in the native nDsbD from *Neisseria* genus may be orchestrated by an additional element, even if the Tyr42 residue is involved.

Dynamics in the Active Site. Dynamic properties of the active site have been analyzed more particularly in order to get insight into the enzymatic mechanism. Flexibility of the partial β -barrel should be considered as a prerequisite in the enzymatic scheme so as to cross the barrier of steric congestions inside the cavity. It has been suggested that the better reactivity of Cys109 compared with Cys103 in *E. coli* nDsbD was due to steric congestion around Cys103 (4). About this hypothesis, a large but isolated exchange term, R_{ex} , has been found for the Val108 residue neighboring Cys109 in nDsbD_{C103S}. However, its particular dynamic features could denote that this term may mainly reflect motions of aromatic side chains in the neighborhood of the Val108 NH group (45), rather than backbone conformational changes that could facilitate access to solvent. Indeed, as other residues exhibiting a significant R_{ex} term, the HN group of Val108 is close to aromatic rings, notably to that of Phe70 (and may therefore be sensitive to the variations of the ring-current effects induced by their motions). Nonetheless, it is reasonable to assume that conformational exchange can have a contribution, even minor, to all these exchange terms thus conferring some mobility to the backbone of nDsbD_{C103S}, as depicted for example by the slight decrease of S^2 term for Val108.

Since structural changes have to make the catalytic cysteine accessible to substrate and since most of the residues surrounding sequentially Cys109 do not display sufficient

mobility to expose it, it is likely that the cap loop region of nDsbD_{C103S} displays a particular dynamics profile. Actually, our dynamics study highlights significant motions, notably for Gly63, Glu65, Lys66, Glu67, Asp68, and Arg73, indicating the ability for the backbone to be flexible in the segment around Phe70 residue of nDsbD_{C103S} and therefore to adapt its conformation to the disulfide oxido-reduction partner. Consistently, the absence of motions for Phe70 in *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} is in agreement with its protection role against nonspecific interactions with cysteine residues. The motions observed at the beginning of strand β 6 suggest that the Gly63–Glu65 segment could act as a hinge permitting the opening of the partial β -barrel and recognition of the substrates. Likewise, mobility of the Gln43–Ile46 bend could reinforce this idea by introducing potential backbone adaptability near strands β 6 and β 7. This could explain the rearrangement observed upon complex formation in the *E. coli* nDsbD equivalent His66–Ser74 segment including Phe70 (47). Indeed, (while the position of the segment including Cys109 is hardly altered) the Asp68–Gly72 “cap loop” region acting as a closed gate is opened up as shown in the X-ray structure of the complexes with the upstream cDsbD (16) or the downstream DsbC (5) and CcmG (17).

Finally, we have shown that the cap loop adopts a “closed gate position” in the structure of nDsbD_{C103S} presenting a reduced form similar to that in the oxidized *E. coli* nDsbD. This involves that the recognition of the nDsbD reduced or oxidized forms by its partners would not rely on the cap loop conformation itself but rather on specific dynamic properties or on other structural elements. Moreover, it shows that the active cysteines are covered by this loop in both redox states, which confers to this loop a protective role, a requirement to avoid the nDsbD interacting nonspecifically. This implies that an opening of the cap must occur upon formation of a complex between nDsbD and its protein partner, in which the catalytic cysteine and the recycling one would become accessible to a reagent. The “opening of the gate” necessitates a conformational change, which could be allowed thanks to the significant motions identified in the Gly63–Arg73 segment and for the Gln43–Ile46 bend, which should consequently be observed in the oxidized form too.

Indeed, in *E. coli* oxidized nDsbD, the S– π interaction between S γ atom of Cys109 and the aromatic ring of Phe70 is described as stabilizing the disulfide bond (4). This observation suggests that this interaction indirectly maintains the closed position of the cap loop. Considering the bunch of the 20 reduced nDsbD_{C103S} structures, such S– π interaction does not exist because of an incompatible angle between the aromatic ring of Phe70 and Cys109. Yet, the cap loop is maintained closed. Therefore, the opening of the cap loop during the formation of complexes involving the reduced form of nDsbD and downstream oxidized partners CcmG (17) and DsbC (5) could not be driven by the rupture of this particular interaction but by the dynamics of the β 6– β 7 region. We can thus assume that the opening of the cap occurring with the formation of the complex between the oxidized form of nDsbD and the upstream reduced partner cDsbD (16) is also driven by dynamic properties. Even if the rupture of the S– π interaction is required, we can legitimately think that, in the absence of relaxation data

concerning the oxidized form, the active site of the oxidized nDsbD should display similar dynamics features.

The cap displacement would necessarily be triggered by the interaction with a specific biological partner. The induced conformational change would be such that the pK_a of Cys109, which is above 8.5 in the unbound state (unpublished results), is lowered. This would consequently allow a nucleophilic attack. It is therefore important to identify the recognition elements involved in nDsbD interactions to elucidate its mechanism. Other putative interaction regions in nDsbD_{C103S} are then discussed hereafter.

Other Putative Interaction Sites with Biological Partners.

An interesting region around strand β 12 displays a large negatively charged surface, as highlighted by the electrostatic potential analysis of nDsbD_{C103S} (Figure 1c). This side of the protein corresponds to the interaction area of *E. coli* nDsbD with the subunit of the dimeric DsbC that is not reduced by nDsbD, as revealed by the X-ray structure of the complex (5). The potential charge repartition along the structure is quite similar between *E. coli* nDsbD and nDsbD_{C103S} (see Supporting Information, Figure S2), but these negatively charged patches in nDsbD_{C103S} could enable many more electrostatic interactions and thus should be also involved in the recognition with DsbC (or an equivalent in the *Neisseria* genus) or other protein partners. The slight decrease of the S² term observed along the β 12 strand could strengthen the assumption that this region may need to drive such interactions.

Another remarkable part of nDsbD_{C103S} lies at the opposite side of the active site. It is assumed in *E. coli* nDsbD to be interacting with the transmembrane domain tDsbD. It is to be noticed that this local region is not as well-defined as the rest of the protein and does not show β -strands equivalent to *E. coli* β 5 and β 9 strands. Despite characteristic H $^{\alpha}$ /H $^{N+1}$ NOE correlations, no hydrogen bonds and no long-distance H N /H N or H $^{\alpha}$ /H $^{\alpha}$ NOE correlations have been detected between the segments Pro51–Leu55 and Ala88–Pro93_{ts} for nDsbD_{C103S}. In addition, outstandingly low S² values associated to τ_1 or R_{ex} terms are observed for Asp53 and especially for the Ala90–Glu93 segment. This clearly proves that the high rmsd observed in these regions (see Figure 5a) are due to an actual flexibility and not to a lack of NMR restraints. It also confirms that these two segments do not display a β -strand organization in the nDsbD_{C103S} structure. This could be explained by the higher global hydrophobicity of these two segments compared with their equivalents in *E. coli* nDsbD (Glu51–Ile55 and Asn88–Gly93 segments) as suggested by the electrostatic potential of both proteins (see Supporting Information, Figure S2). Indeed, in nDsbD_{C103S}, they contain seven nonglycine hydrophobic residues compared with four residues in *E. coli* nDsbD. Moreover, there is no such strict alternation of hydrophobic and nonhydrophobic residues in the nDsbD_{C103} segments ₅₂ADLL₅₅ and ₈₉KAVG₉₂ as in their equivalent segments ₅₂HAKI₅₅ and ₈₉QASA₉₂ in *E. coli* nDsbD. Because hydrophobic residues tend to be buried in the structure, the alternation found in *E. coli* is indeed more favorable in stabilizing a β -sheet structure, with Ala53, Ile55, and Ala92 side chains on one hand and His52, Lys54, Gln89, and Ser91 side chains on the other hand pointing, respectively, inside the β -sandwich and toward the solvent. This allows, in *E. coli* nDsbD, side-chain interactions as seen between Lys54 and Gln89 or Ala53

and Ala90 and permits backbone interactions between Glu51–Ile55 and Asn88–Gly93 segments. In the case of nDsbD_{C103S}, Leu54 and Val91, respectively, equivalent to Lys54 and Ser91 in *E. coli* nDsbD, tend to bury their bulky side chains into the structure, to promote hydrophobic interactions, and to increase the distance between the backbone chains of the two considered segments, disabling specific β -sheet backbone interactions. Loops Ala25–Asp27, Ala88–Pro93_{bis}, and Phe120–Gly123 display remarkable motions at various time scales (see Figure 6). No published NMR and X-ray structures of a complex between nDsbD and tDsbD are available so far. We propose that the motions observed in this area, especially the striking flexibility of the segment Ala88–Pro93_{bis}, could provide adaptability to the peptidic chain to interact with tDsbD. These dynamic features may be crucial to ensure a proper contact area between the nDsbD and tDsbD domains in *Neisseria*. This hypothesis is reinforced by the noteworthy hydrophobicity and the weak electrostatic potential (see Figure 1c) of this region, which could facilitate interaction with the transmembrane domain.

To conclude, we have elucidated a solution structure of nDsbD in a reduced form and characterized its dynamics, which provides new important biological insights for the putative mechanism, so far based on crystallographic data gathered from the oxidized form or complexes. We have shown that the active site is protected by the “cap loop” between strands β 6 and β 7 both in the reduced and oxidized states. Therefore, the recognition of the two redox forms of nDsbD is not due to a conformational change of this cap loop. Moreover, a cap displacement must be triggered by the interaction with its specific partners, which can be permitted by the mobility highlighted in the Gly63–Arg73 segment and for the Gln43–Ile46 bend, forming a hinge. The results suggest a pronounced capacity of structural adjustments of the partial β -barrel upon interaction with a biological partner, whatever the reduced or oxidized forms. This could explain why nDsbD can recognize several different disulfide oxidoreductase partners. Moreover, putative recognition structural or dynamics elements in nDsbD have been proposed, not only around the active site but also in more distant regions assumed to be involved in its interaction with DsbC and tDsbD.

ACKNOWLEDGMENT

Access to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) was deeply appreciated. We thank Dr. G. Boussard for critical review of the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

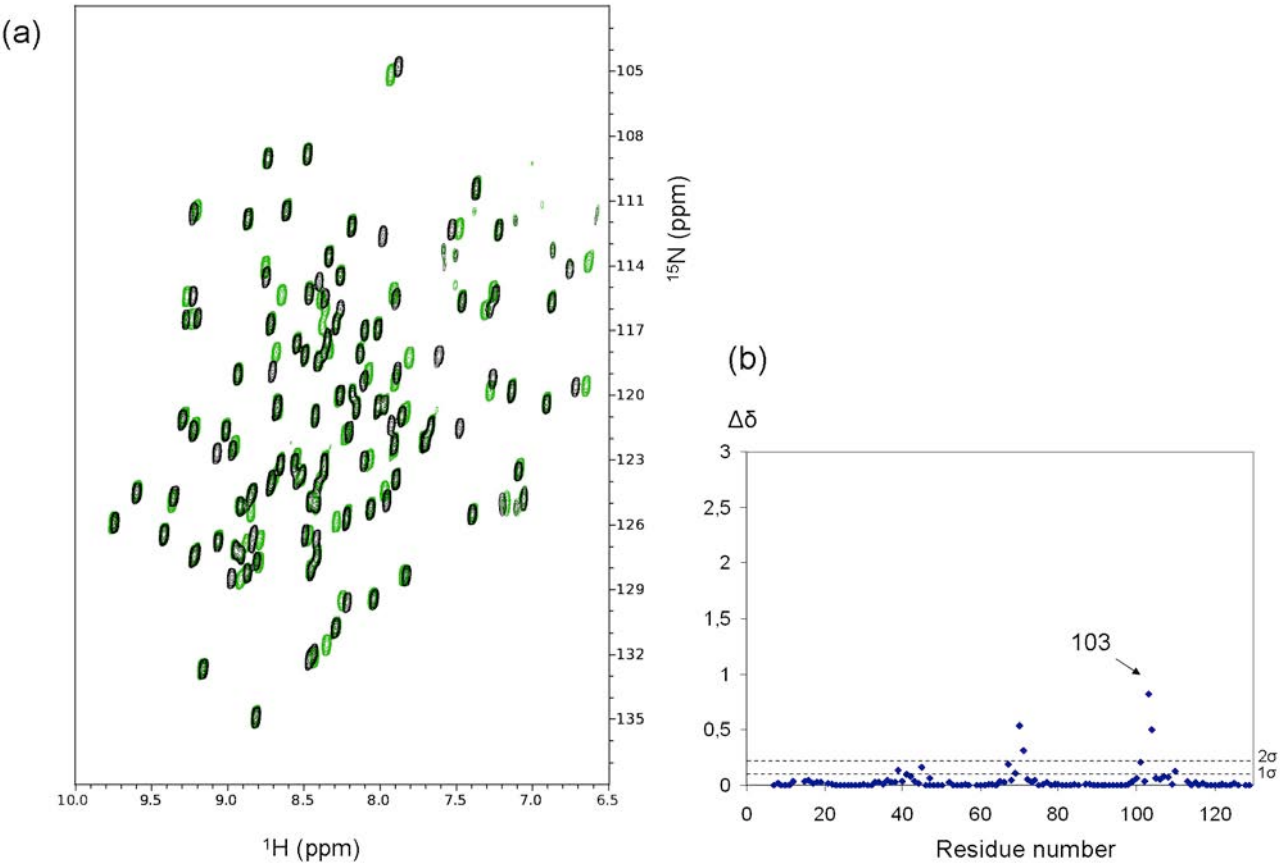
Figure S1 showing the superimposition of the ¹H–¹⁵N HSQC spectra of the C103S mutant (black) with the reduced form of the wild-type (green) nDsbD from *N. meningitidis*, both recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0 (a), as well as the backbone amide chemical shift perturbations calculated using the consensual value $\Delta\delta$ (b), and Figure S2 corresponding to the electrostatic potential representation of *E. coli* oxidized nDsbD (a) and that of *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (b) using two spatial orientations. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

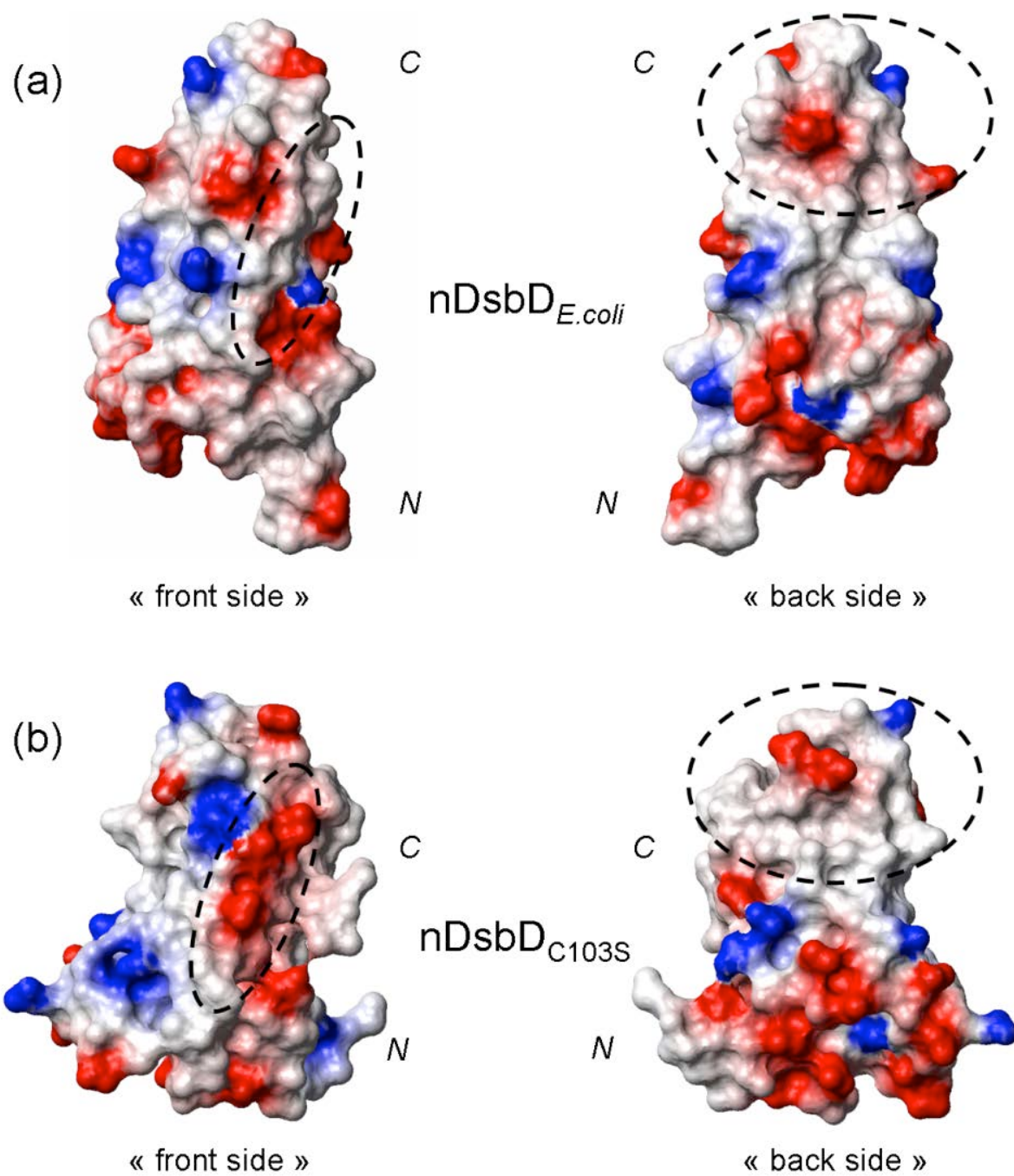
REFERENCES

1. Stewart, E. J., Katzen, F., and Beckwith, J. (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18, 5963–5971.
2. Chung, J., Chen, T., and Missiakas, D. (2000) Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol. Microbiol.* 35, 1099–1109.
3. Gordon, E. H., Page, M. D., Willis, A. C., and Ferguson, S. J. (2000) *Escherichia coli* DipZ: Anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Mol. Microbiol.* 35, 1360–1374.
4. Goulding, C. W., Sawaya, M. R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D., and Missiakas, D. (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41, 6920–6927.
5. Haebel, P. W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J., and Metcalf, P. (2002) The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: Crystal structure of the DsbC–DsbD α complex. *EMBO J.* 21, 4774–4784.
6. Kim, J. H., Kim, S. J., Jeong, D. G., Son, J. H., and Ryu, S. E. (2003) Crystal structure of DsbD γ reveals the mechanism of redox potential shift and substrate specificity. *FEBS Lett.* 543, 164–169.
7. Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., and Beckwith, J. (1996) An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13048–13053.
8. 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.
9. Katzen, F., and Beckwith, J. (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103, 769–779.
10. Krupp, R., Chan, C., and Missiakas, D. (2001) DsbD-catalyzed transport of electrons across the membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 3696–3701.
11. Collet, J. F., Riemer, J., Bader, M. W., and Bardwell, J. C. (2002) Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* 277, 26886–26892.
12. Fabianek, R. A., Henneke, H., Thony-Meyer, L. (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome c maturation in vivo. *J. Bacteriol.* 180, 1947–1950.
13. Fabianek, R. A., Hofer, T., and Thony-Meyer, L. (1999) Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome c maturation. *Arch. Microbiol.* 171, 92–100.
14. Reid, E., Cole, J., and Eaves, D. J. (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem. J.* 355, 51–58.
15. 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.
16. Rozhkova, A., Stimimann, C. U., Frei, P., Grauschopf, U., Brunisholz, R., Gruetter, M. G., Capitani, G., and Glockshuber, R. (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* 23, 1709–1719.
17. Stimimann, C. U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Gruetter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2005) Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. *Structure* 13, 985–993.
18. Brot, N., Collet, J. F., Johnson, L. C., Jonsson, T. J., Weissbach, H., and Lowther, W. T. (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 281, 32668–32675.
19. Keller, R. (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment, Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
20. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., and Oldfield, E. (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* 6, 135–140.

21. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **17**, 75–86.
22. Cordier, F., and Grzesiek, S. (2002) Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution NMR. *J. Mol. Biol.* **317**, 39–52.
23. Cordier, F., Barfield, M., and Grzesiek, S. (2003) Direct observation of $C^{\alpha}-H^{\alpha}\cdots O=C$ hydrogen bonds in proteins by interresidue $^hJ_{C^{\alpha}C}$ scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 15750–15751.
24. Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* **24**, 171–189.
25. Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* **319**, 209–227.
26. Comilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13**, 289–302.
27. Güntert, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* **278**, 353–378.
28. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51–55.
29. Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* **33**, 5984–6003.
30. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **4**, 603–614.
31. Farrow, N. A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D. A., and Kay, L. E. (1995) Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively. *J. Biomol. NMR* **6**, 153–162.
32. Ishima, R., Yamasaki, K., Saito, M., and Nagayama, K. (1995) Spectral densities of nitrogen nuclei in *Escherichia coli* ribonuclease HI obtained by ^{15}N NMR relaxation and molecular dynamics. *J. Biomol. NMR* **2**, 217–220.
33. Ishima, R., and Nagayama, K. (1995) Protein backbone dynamics revealed by quasi spectral density function analysis of amide N-15 nuclei. *Biochemistry* **34**, 3162–3171.
34. Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W., and Wagner, G. (1996) Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* **35**, 2674–2686.
35. Hiyama, Y., Niu, C., Silverton, J. V., Bavoso, A., and Torchia, D. A. (1988) Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - 2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2378–2383.
36. Peng, J. W., and Wagner, G. (1995) Frequency spectrum of NH bond in eglin c from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* **34**, 16733–16752.
37. Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* **16**, 23–28.
38. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546–4559.
39. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4560–4570.
40. Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beauvais, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.-C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008) 1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* **2**, 85–87.
41. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486.
42. Vriend, G., and Sander, C. (1993) Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 47–60.
43. Holm, L., and Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123–138.
44. Gibrat, J. F., Madej, T., and Bryant, S. H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 377–385.
45. Guignard, L., Padilla, A., Mispelter, J., Yang, Y. S., Stern, M. H., Lhoste, J. M., and Roumestand, C. (2000) Backbone dynamics and solution structure refinement of the ^{15}N -labeled human oncogenic protein p13^{MTCP1}: comparison with X-ray data. *J. Biomol. NMR* **17**, 215–230.
46. Constantine, K. L., Friedrichs, M. S., Goldfarb, V., Jeffrey, P. D., Sheriff, S., and Mueller, L. (1993) Characterization of the backbone dynamics of an anti-digoxin antibody VL domain by inverse detected 1H - ^{15}N NMR: comparisons with X-ray data for the Fab. *Proteins* **15**, 290–311.
47. Stürmann, C. U., Grütter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2006) nDsbD: A redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1642–1648.
48. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F. (1999) ESPript: Multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308.

BI801343C





Formation of the Complex between DsbD and PilB N-Terminal Domains from *Neisseria meningitidis* Necessitates an Adaptability of nDsbD

Marc Quinternet,^{1,3} Pascale Tsan,^{1,3} Laure Selme-Roussel,^{2,3} Christophe Jacob,² Sandrine Boschi-Muller,² Guy Branlant,^{2,*} and Manh-Thong Cung^{1,*}

¹Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France

²Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³These three authors contributed equally to this work

*Correspondence: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr (G.B.), Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr (M.-T.C.)

DOI 10.1016/j.str.2009.05.011

SUMMARY

DsbD transmembrane protein dispatches electrons to periplasmic Trx/DsbE-like partners via specific interactions with its N-terminal domain, nDsbD. In the present study, PilB N-terminal domain (NterPilB) is shown to efficiently accept electrons coming from nDsbD from *Neisseria meningitidis*. Using an NMR-driven docking approach, we have modeled the structure of a mixed disulfide complex between Nter-PilB and nDsbD. We show the needed opening of nDsbD cap-loop whereas NterPilB FLHE loop does not seem essential in the formation and stabilization of the complex. Relaxation analysis performed on backbone amide groups highlights a kind of dynamics transfer from nDsbD cap-loop on NterPilB α 1 helix, suggesting that a mobility contribution is required not only for the formation of the mixed disulfide complex, but also for its disruption. Taking into account previous X-ray data on covalent complexes involving nDsbD, a cartoon of interactions between Trx-like partners and nDsbD is proposed that illustrates the adaptability of nDsbD.

INTRODUCTION

DsbD transmembrane protein catalyzes the transport of two electrons from the cytoplasmic thioredoxin (Trx) through disulfide bond protein exchanges and toward various periplasmic targets, all of them belonging to the structural Trx family (Stewart et al., 1999). DsbD is an inner membrane protein composed of three domains: an N-terminal periplasmic domain (nDsbD), a central transmembrane domain (tDsbD), and a C-terminal periplasmic domain (cDsbD) (Chung et al., 2000). Electrons from Trx successively pass through tDsbD, cDsbD, and nDsbD before being dispatched to DsbD periplasmic partners (Katzen and Beckwith, 2000). Acting like a “redox hub,” nDsbD is therefore the DsbD domain responsible for the electron distribution toward its protein targets with which it should interact specifically

(Stirnemann et al., 2006). Indeed, it distributes electrons: (i) to DsbC, which is involved in the disulfide isomerization and in the chaperoning system, (ii) to DsbG, a putative DsbC paralogue of unknown function (Porat et al., 2004), (iii) to DsbE/CcmG, belonging to the cytochrome *c* biogenesis pathway. Recently, the nDsbD domain of the *Escherichia coli* DsbD was shown to be capable of reducing the N-terminal domain of the PilB protein (NterPilB) from *Neisseria gonorrhoeae* (Brot et al., 2006).

The secreted form of PilB protein is involved in survival to agents that can generate reactive oxygen species (Skaar et al., 2002). It is composed of three domains. The middle and the C-terminal domains display methionine sulfoxide reductase activities (Oly et al., 2002), whereas the NterPilB domain is a Trx-like protein exhibiting disulfide oxidoreductase activity toward the PilB methionine sulfoxide reductase (Msr) domains (Wu et al., 2005) and belongs to the DsbE structural family (Ranaivoson et al., 2006). The X-ray diffraction and nuclear magnetic resonance (NMR) (Quinternet et al., 2008a) studies of NterPilB highlighted the presence of a rigid, specific $_{99}$ FLHE $_{102}$ loop covering one edge of the active site in its oxidized and reduced states. Two roles of the additional loop, which is found neither in Trxs nor in DsbEs and other cytochrome maturation proteins (CMPs) as well, can be postulated. The loop can have a structural discriminating recognition role relative to PilB Msrs as recently proposed by Ranaivoson et al., or a role in facilitating the recognition of nDsbD.

The structures of the oxidized form of *Escherichia coli* nDsbD (Goulding et al., 2002) and of its mixed disulfide complexes with either cDsbD (Rozhkova et al., 2004) or the downstream in vivo partners DsbC (Haebel et al., 2002) and CcmG (Stirnemann et al., 2005) were determined recently by X-ray crystallography. *E. coli* nDsbD displays an immunoglobulin fold, and although around 90% of the nDsbD interface is conserved in the three complexes, significant differences in the mode of interaction are observed (Stirnemann et al., 2006). For instance, the Trx-like fold of DsbC adopts in its complex with nDsbD an orientation differing by around 20° from that encountered in the case of the complexes with cDsbD and CcmG. Besides, the nDsbD-SS-DsbC complex exhibits an additional binding interface and therefore a much larger overall binding area than in the nDsbD-SS-cDsbD complex. Moreover, the recognition of CcmG

Structure

NMR Structure and Dynamics of nDsbD-SS-NterPilB

involves the N-terminal segment of nDsbD that establishes an intermolecular hydrogen-bond with a specific tyrosine, at position 141, in CcmG. Finally, a cap-loop region (residues D68–G72) appears to cover the two active cysteines (C103 and C109) in the oxidized form of nDsbD while it undergoes a complete opening upon formation of a covalent complex between nDsbD and CcmG/DsbE and adopts an intermediate conformation in the complex with DsbC. The recent characterization, by our group, of the structure of the C103S nDsbD from *Neisseria meningitidis* in solution by NMR showed that the cap-loop keeps a closed conformation in the reduced state (Quintern et al., 2008b). Therefore, the opening of the cap-loop should take place upon formation of the complex with its Trx-like partner. This raises the question of the factors that favor the opening of the cap-loop.

In that context, we have characterized by NMR the mode of interaction between *N. meningitidis* nDsbD and NterPilB in order to gain insight, not only into the structural elements involved in the recognition between both partners, but also into the dynamics factors, which can not be easily extracted from X-ray diffraction studies. Prior to these studies, we have shown that (i) the oxidized form of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (NterPilB) is efficiently reduced by the *N. meningitidis* nDsbD domain, and (ii) C109 of the nDsbD is probably the cysteine involved in the formation of the interdisulfide transient intermediate with NterPilB. We have consequently formed the mixed disulfide complex between the C103S nDsbD and the C70S NterPilB (nDsbD-SS-NterPilB) and, using NMR, modeled its structure by docking and characterized its dynamics. The dynamic results have been obtained for each of the two partners within the covalent complex, nDsbD_{cx} and NterPilB_{cx}. They are compared with those previously reported by us for both free proteins, nDsbD_{free} (Quintern et al., 2008b) and NterPilB_{free} (Quintern et al., 2008a), having in mind to focus on the perturbations caused by the complex formation.

In this study, taking into account all of the structural and dynamics data both on free and complex states of each partner of nDsbD-SS-NterPilB, we propose a route leading to formation of the transient covalent complexes between nDsbD and its different Trx-like partners. Considering the nDsbD-SS-NterPilB complex, the opening of nDsbD cap-loop is required whereas the NterPilB FLHE loop does not seem essential in the formation and stabilization of the complex. The formation of the mixed disulfide complex and its disruption required a mobility contribution provided by a dynamics transfer from the nDsbD cap-loop onto the NterPilB α 1 helix.

RESULTS

NterPilB Is Efficiently Reduced by nDsbD

The rate of reduction of oxidized NterPilB by nDsbD was determined by following selectively the enhancement of the fluorescence emission of the Trp residues of the NterPilB, associated with the reduction of its C67/C70 disulfide bond (Wu et al., 2005). Indeed, whereas the NterPilB contains five tryptophanes, in particular W66 located before the CXXC motif, the nDsbD has no Trp residue, which explains why it displays no variation in its fluorescence message whatever its state (i.e., reduced or oxidized form, spectra not shown). For each concentration of

nDsbD, the curves fitted to a monoexponential equation and a k_{obs} value was determined. No kinetic saturation effect was observed up to 500 μM nDsbD. The slope of the curve, k_{obs} versus nDsbD concentration, provided the second-order kinetic k_2 value that represents the catalytic efficiency value, k_{cat}/K_M . The k_2 value is high i.e., $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 1A) and is in the range of those determined for nDsbD with its known periplasmic protein targets (Rozhkova et al., 2004; Stimimann et al., 2005). Therefore, nDsbD is the physiological reductant of the NterPilB domain.

Moreover, the fact that no kinetic saturation was observed up to 500 μM nDsbD shows that the apparent affinity constant K_M for nDsbD is high, at least 500 μM , and argues for a low affinity between the two partners. Thus, the only way to obtain a stable complex between nDsbD and NterPilB was to form a covalent complex representative of the transient interdisulfide complex that occurs upon the NterPilB-recycling process.

Characterization of the Cysteine Residue of nDsbD that Forms a Transient Disulfide Intermediate with NterPilB

In contrast to that was shown for *E. coli* nDsbD (Rozhkova et al., 2004), C103 and C109 in wild-type, C109 in C103S nDsbD, and C103 in C109S nDsbD from *N. meningitidis* are reactive toward the Ellman's reagent (data not shown). Therefore, to characterize the cysteine residue of nDsbD that selectively forms a transient mixed disulfide with NterPilB, the catalytic efficiency (k_2 value) of the two single-cysteine variants, C103S and C109S nDsbDs, toward NterPilB was determined using the same approach as for the nDsbD wild-type. As shown in Figure 1B, formation of the interdisulfide bond with NterPilB is 10-fold more efficient with C103S nDsbD compared with C109S nDsbD. This is a strong argument in favor of the implication of C109 in the formation of the transient disulfide intermediate between nDsbD and NterPilB. Moreover, the fact that: (i) the NterPilB belongs to the DsbE family and has a Trx-like fold and, (ii) the catalytic cysteine of DsbEs and Trxs was shown to be the cysteine involved in the formation of transient disulfide bond with its protein targets, supports a similar role for the catalytic C67 of the NterPilB with its protein partners such as nDsbD. Therefore, the reduction of the oxidized form of the NterPilB by nDsbD probably passes through formation of a transient disulfide intermediate via C67 and C109 of NterPilB and nDsbD, respectively. Consequently, the covalent disulfide complex between C103S nDsbD and C70S NterPilB was prepared and used to characterize the interactions between NterPilB and nDsbD (Figure 1C).

Assignment of the nDsbD-SS-NterPilB Complex and Chemical Shift Mapping

Assignment was obtained for all of the backbone amide nuclei, except for the N-terminal residues M4, A5, and L6 in nDsbD_{cx} and for residues V33, H35, L69, C70, L71 and Y139 in the NterPilB_{cx}. Assignment of most side-chain protons has been obtained with a similar proportion to the assignments reported previously for each partner, except for the side chains of the complex residues that the NH group assignment is missing.

Compared with the free form assignment of both partners (Beaufils et al., 2006; Quintern et al., 2007, 2008c), significant amide chemical shift changes upon complex formation (i.e., changes exhibiting more than one standard deviation of the $\Delta\delta$

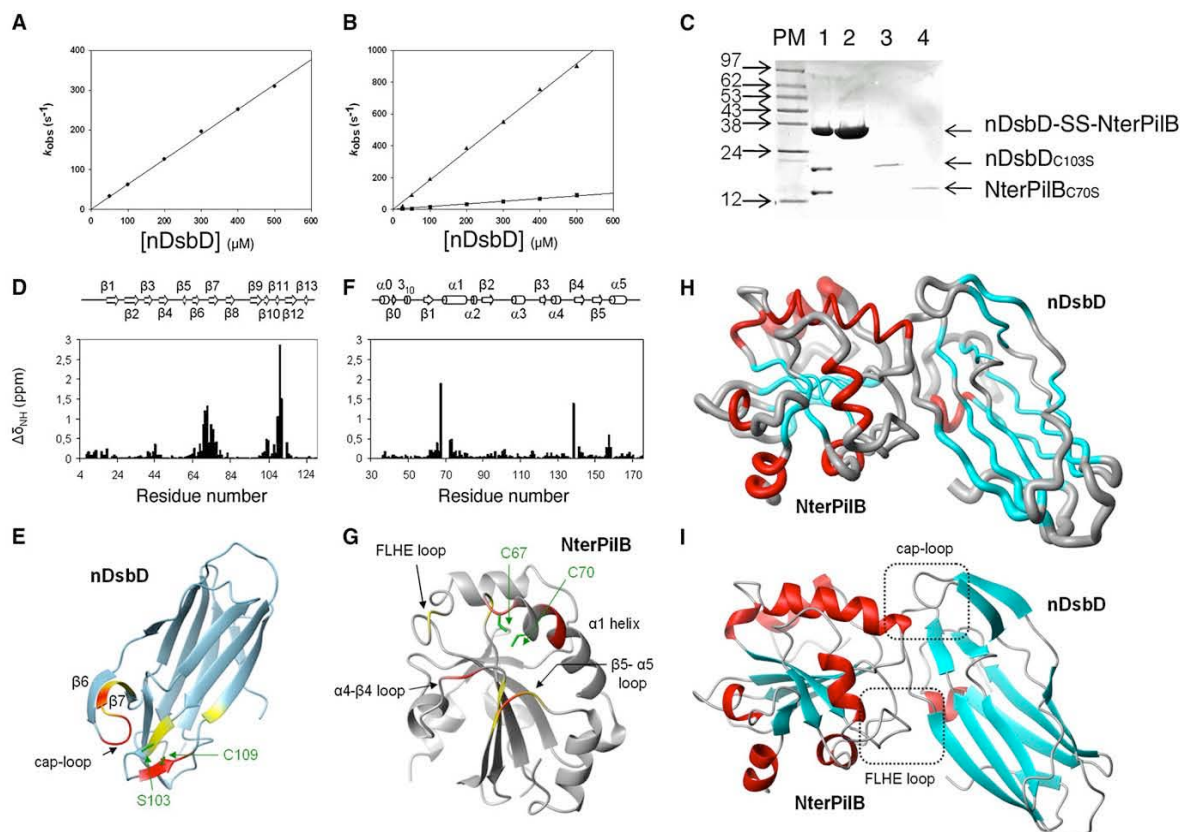


Figure 1. Efficient Reduction of NterPilB by nDsbD, Chemical Shift Perturbations upon Complexation, and Structures of the Mixed Disulfide Complex nDsbD-SS-NterPilB Generated by HADDOCK2.0

Kinetics of the reduction of the NterPilB by the wild-type (A), C103S and C109S (B) nDsbDs and analysis of the nDsbD-SS-NterPilB complex purification on 12.5% SDS-PAGE (C).

(A and B) The increase of the NterPilB fluorescence intensity associated with its disulfide bond reduction was recorded on a stopped-flow apparatus at 25°C in TE buffer (pH 8). NterPilB final concentration was 10 μM. Excitation wavelength was set at 293 nm and emitted light was collected above 320 nm using a cutoff filter. Data were fit to linear regression equation, which gave k_{red} values of $(6.3 \pm 0.1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with wild-type nDsbD (●), $(1.85 \pm 0.04) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with C103S nDsbD (▲), and $(1.78 \pm 0.05) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with C109S nDsbD (■).

(C) Activated NterPilB_{C70S}-TNB was incubated with equimolar concentration of C103S nDsbD in TE buffer (pH 8). Purification of the reaction products (lane 1) was achieved by gel filtration, which allows the isolation of the nDsbD-SS-NterPilB complex (lane 2) from the nDsbD_{C103S} (lane 3) and NterPilB_{C70S} (lane 4) species. Arrows on the right indicate the positions at which the nDsbD-SS-NterPilB complex, nDsbD_{C103S}, and NterPilB_{C70S} migrate. The positions of the marker proteins (lane PM) are indicated on the left (in kilodaltons).

(D and E) Plot of the amide chemical shift change $\Delta\delta_{\text{NH}}$ between nDsbD_{free} and nDsbD_{cx} versus the residue number and its representation on the NMR structure (PDB code 2k0r).

(F and G) Plot of the amide chemical shift change $\Delta\delta_{\text{NH}}$ between NterPilB_{C70S} and NterPilB_{cx} and its representation on the NMR structure of the reduced form (PDB code 2jzs). For (D) and (F), $\Delta\delta_{\text{NH}}$ is defined as follow $\Delta\delta_{\text{NH}} = \Delta\delta(^1\text{H}) + \Delta\delta(^{15}\text{N})/f$ where f is the correction factor calculated from the ratio of the dispersion of the backbone ^{15}N resonances and that of the ^1H signals (Williamson et al., 1997). The correction factor f was calculated separately for glycine residues and for all other residues. For (E) and (G), the residues exhibiting variations $\sigma < \Delta\delta_{\text{NH}} < 2\sigma$ and $\Delta\delta_{\text{NH}} > 2\sigma$ are respectively colored in yellow and red. The side chains of nDsbD S103 and C109 and of NterPilB C67 and C70 are displayed in green.

(H) The ensemble of the ten best structures of nDsbD-SS-NterPilB is shown using a spline representation. The radius of the tube is proportional to the backbone rmsd of each residue.

(I) The FLHE loop of NterPilB and the “cap-loop” of nDsbD are indicated on the mean structure. For both drawings, the secondary structures are indicated in red for helices and in blue for β strands. The structure representations were generated with MOLMOL.

value) are observed in the E69-V76, G102-S103, and V108-V113 segments of nDsbD_{cx} and for the S65, C67, S72, E73, H101, V138, S141 residues and the K156-S158 segment of NterPilB_{cx}, as displayed in Figures 1D and 1F. Figures 1E and 1G show that these residues are located near the active sites. In DsbD_{cx}, they

concern not only the segments around the C109 active cysteine and the recycling cysteine mutated into serine at position 103, but also the cap-loop comprised between strand $\beta 6$ and $\beta 7$ and part of strand $\beta 7$. In NterPilB_{cx}, the largest variations are found in the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop and the $\alpha 1$ helix bearing the active site,

Structure

NMR Structure and Dynamics of nDsbD-SS-NterPilB

**Table 1. List of Interacting Residues and Structural Analysis for the Ten Best Structures of the HADDOCK2.0 Results**

	NterPilB	nDsbD
Chemical shift perturbation		
Occurrence	9	14
Residue sequence number	65, 67, 72, 73, 101, 138, 141, 156 to 158	69 to 76, 102, 103, 108 to 110, 113
Docking		
Active residues (occurrence)	9	8
Residue sequence number	67 to 72, 138, 139, 157	69 to 72, 108, 109, 110, 113
Passive residues (occurrence)	9	10
Residue sequence number	66, 73, 74, 100, 101, 137, 140, 156, 158	43 to 45, 73, 74, 106, 107, 111, 112, 114
Flexible segments	65 to 74, 99 to 102, 137 to 141, 156 to 159	43 to 45, 68 to 74, 106 to 114
nDsbD-SS-NterPilB		
Ambiguous restraints (occurrence)		
Coming from NterPilB	9	
Coming from nDsbD	8	
Unambiguous restraints (occurrence)		
	6	
RMSD from the mean structure (Å)		
All backbone atoms	1.01	
All heavy atoms	1.19	
Flexible interface backbone atoms	0.65	
Flexible interface heavy atoms	1.04	
Energies (kcal·mol ⁻¹) ^a		
E _{inter}	-111 ± 32	
E _{vdw}	-51 ± 3	
E _{elec}	-134 ± 30	
E _{AIR}	72 ± 7	
Number of AIR violation (>0.3 Å)	2.9 ± 0.3	
Buried surface area (Å ²) ^b	1475 ± 80	
Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR)		
Residues in the most favorable region (%)	82.1	
Residues in additionally allowed regions (%)	16.6	
Residues in generously allowed regions (%)	0.9	
Residues in disallowed regions (%)	0.4	

^aThe nonbonded energies were calculated with the optimized potentials for liquid simulations parameters using a 8.5 Å cut-off.

^bThe buried surface area was calculated with CNS using a 1.4 Å radius water probe and an accuracy of 0.075 Å.

whereas smaller changes are observed in the α4-β4 and β5-α5 proximal loops.

Interestingly, L69, C70, L71, and Y139, located in the α1 helix and in the α4-β4 loop of NterPilB_{cx}, could not be assigned in the complex, whereas their assignment in the free protein was straightforward. This probably indicates that these residues are at the interface with nDsbD_{cx}, because the signals of residues participating to an interaction are often broadened and might even disappear (because of an exchange contribution to the transverse relaxation).

Considering side-chain protons of NterPilB_{cx} and nDsbD_{cx}, significant chemical shift changes are observed too, in a similar way to those observed for their corresponding backbone amide groups.

Modeling of the Complex by Docking

Chemical shift mapping combined with filtered nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) data identified 6

unambiguous and 17 ambiguous restraints that have been used to drive the docking protocol performed by HADDOCK2.0. The segments S65-E73, F99-E102, S137-S141, and K156-I159 of NterPilB_{cx} and the segments Q43-K45, D68-G72, and A106-D114 of nDsbD_{cx} are flexible in regard to the chemical shift perturbation and solvent accessibility data. The cut-off value of 1.2 Å for clustering of solutions defines 2 clusters of structures whose size was superior to 20 structures (see Table S1 available online). The cluster with the lowest HADDOCK score was chosen as the best representative cluster (Figures 1H and 1I), the HADDOCK score combining all of the energy terms calculated by HADDOCK2.0 to the buried surface area value. Table 1 summarizes the docking input parameters and the statistical analysis done for the ensemble of the ten best structures of nDsbD-SS-NterPilB, which have been deposited in the RCSB Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org/pdb) under access code 2k9f. Restraints used for the modeling are freely available on the PDB website.

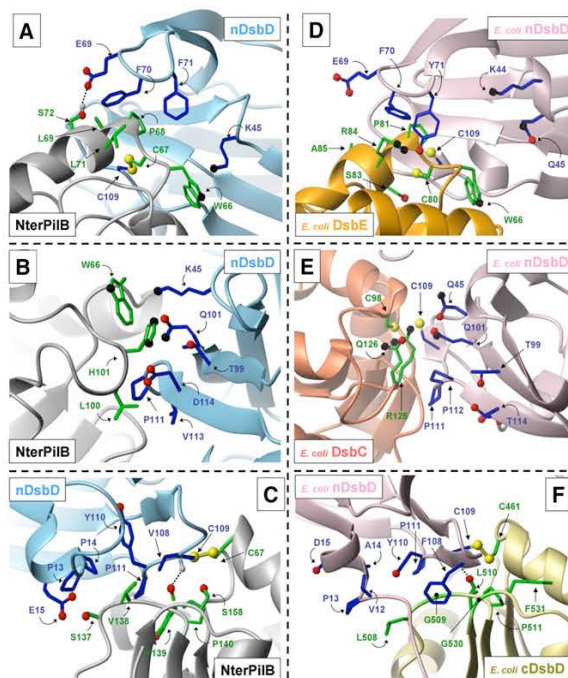


Figure 2. Interaction Areas between nDsbD and its Trx-like Partners

Close-up of the cap-loop region of nDsbD (A), the FLHE loop region of NterPilB (B), and the SS bond region (C) figured on the ribbon representation of nDsbD-SS-NterPilB best structure. Close-up of the cap-loop region of nDsbD-SS-DsbE (D), the β 9- β 12 side of nDsbD-SS-DsbC (E), and the SS bond region of nDsbD-SS-cDsbD (F). The side chains of the residues are drawn as blue (nDsbD) and green (Trx-like) sticks. Nitrogen, oxygen, hydrogen, and sulfur atoms are respectively represented with black, red, gray, and yellow balls. Hydrogen bonds are indicated with a dotted line.

One can immediately notice that the overall Trx and immunoglobulin folds of NterPilB_{cx} and nDsbD_{cx}, respectively, are conserved in the ensemble of structures obtained after the docking procedure (Figure S1A). Indeed, compared with the starting structures of the free forms, the backbone root-mean-square deviations (rmsds) measured on the mean structures of each component of the nDsbD-SS-NterPilB complex are 0.89 Å and 0.85 Å, respectively, for the nDsbD component and the NterPilB component. The modeling of this covalent complex, linked by an intermolecular disulfide bond between the NterPilB_{cx} C67 and nDsbD_{cx} C109, shows a well-defined orientation of the two components, where the α 1 helix of NterPilB_{cx} lodges between the β 6- β 7 loop and the β 10- β 11 sheet of nDsbD_{cx} (Figure 2A). Besides, the FLHE-specific loop of NterPilB_{cx} makes contacts with the side of nDsbD_{cx} that comprises the strands β 9 and β 12 (Figure 2B). Finally, a third interface area in the SS-bond region is defined by, on one hand, the α 4- β 4 and β 5- α 5 loops of NterPilB_{cx} and, on the other hand, the segments P13-E15 and G107-P112 of nDsbD_{cx} (Figure 2C).

Such a conformation of the mixed-disulfide complex implies an open form of the cap-loop region of nDsbD_{cx} in which the F70 aromatic ring moves away from the cavity entrance of nDsbD_{cx}. Indeed, the mean distance between C β atoms of F70

and C109 increases from 7.0 Å in nDsbD_{free} to 11.3 Å in nDsbD_{cx}. This aromatic ring remains at the surface of NterPilB_{cx}, thus permitting interaction between nDsbD_{cx} E69 and NterPilB_{cx} S72. Moreover, the aromatic ring of nDsbD_{cx} F71 rocks around the C β -C δ bond to come closer to the aliphatic side chains of NterPilB_{cx} L71 and P68. In the FLHE loop region, the conformation of the complex is stabilized by close interactions between the imidazole ring of NterPilB_{cx} H101 and the side chains of nDsbD_{cx} T99 and D114, and by hydrophobic contacts between nDsbD_{cx} P111 and V113 and NterPilB_{cx} L100. In the SS-bond region, hydrophobic interactions take place between P13, P14, V108, and P111 of nDsbD_{cx} and V138 of NterPilB_{cx}. Close contacts are notably observed between nDsbD_{cx} K45 and Q101 and NterPilB_{cx} W66.

Relaxation Parameters Analysis

The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2), and the steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values were measured for 93 and 109 backbone NH groups, respectively in the nDsbD_{cx} and the NterPilB_{cx} (see Figures 3A and 3B). The unanalyzed residues were either unassigned or overlapped. The average values for the backbone ^{15}N -nuclei of nDsbD_{cx} are: $\langle R_1 \rangle = 0.79 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 19.7 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.71 \pm 0.04$. Those of the backbone ^{15}N -nuclei of NterPilB_{cx} are: $\langle R_1 \rangle = 0.76 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 22.2 \pm 2.3 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.80 \pm 0.07$. Thus, R_1 and R_2 significantly decrease and increase, respectively, due to the slower overall tumbling rate (larger size) of the complex compared with the free constitutive proteins (see Figures 3A and 3B). The mean NOE values of both components are unchanged, indicating that they remain well-structured globally in the complex.

The relaxation parameters plotted versus the protein sequence globally display similar profiles to those observed in the free proteins. Interestingly, a few differences can be underlined such as the clear drop of the NOE values of residues K66 up to G72, whereas they were barely below the average value in nDsbD_{free}. This suggests an increase of the fast motions in the subnanosecond timescale in the complex for this segment comprising the cap-loop. Likewise, the Lys89-Glu93 segment, which already displayed relatively weak NOE values in nDsbD_{free}, exhibits even lower values in the complex. Relatively large R_2 values, without a concomitant decrease of the NOE values, are found in the G107-C109 segment too. They should indicate the presence of adiabatic contributions to relaxation, usually related to conformational exchange in the microsecond to millisecond timescale. Concerning NterPilB_{cx}, the only remarkable changes observed in the bound state are the relatively high R_2 values in the L74-A81 segment, suggesting the presence of slow conformational exchange. No striking difference is noticed in the FLHE loop.

DISCUSSION

To date, three structures of complexes involving the N-terminal domain of DsbD from *E. coli* (*E. coli* nDsbD_{cx}) with cDsbD, DsbC, or Ccmg/DsbE are available (PDB access numbers 1vrs, 1zjd, and 1z5y). All these structures have been determined using X-ray diffraction radiocrystallography and their resolution factors lie between 1.94 and 2.85 Å. In the present study, we

Structure

NMR Structure and Dynamics of nDsbD-SS-NterPilB

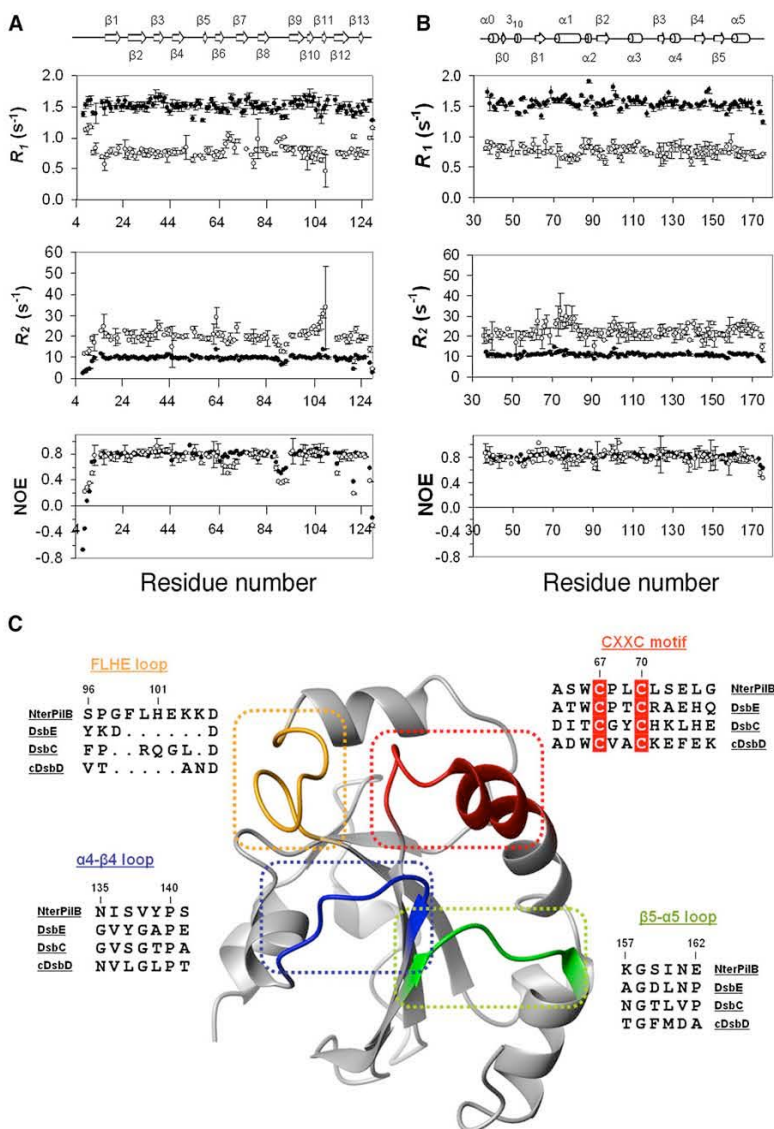


Figure 3. ¹⁵N Relaxation Parameters of the Mixed Disulfide Complex nDsbD-SS-NterPilB and Interaction Areas on the Trx-like Partner of nDsbD

(A and B) ¹⁵N longitudinal relaxation rates R_1 , ¹⁵N transverse relaxation rates R_2 , and steady-state {¹H}-¹⁵N heteronuclear NOE values of (A) nDsbD_{cx} (○) compared with those of nDsbD_{free} (●), and (B) NterPilB_{cx} (○) compared with those of NterPilB_{free} in its oxidized form (●) are plotted versus the amino acid sequence. Experiments were recorded on a Bruker DRX 600 MHz at pH 7.00, 25°C. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

(C) The segments of the structurally characterized Trx-like partners participating in the interaction with nDsbD on the NterPilB structure are highlighted in red for CXXC region, green for the $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop region, blue for the $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop region, and orange for the FLHE loop region. The corresponding amino acid sequence of each Trx-like partner of nDsbD has been reported. The sequence numbering and the segment denomination are the ones of NterPilB.

NterPilB_{cx} forms a secondary interface, increasing the main buried surface area mean value observed in X-ray structures from 1350 Å² to 1475 Å².

The FLHE Loop of NterPilB from *N. meningitidis*

Characterization of the interactions within the nDsbD-SS-NterPilB complex in the present study shows that the NterPilB_{cx} L100, and H101 side chains come close to the $\beta 9$ - $\beta 12$ side of nDsbD_{cx}. NterPilB_{cx} L100 is located in a rather hydrophobic environment (presence of nDsbD_{cx} P111, and V113 and NterPilB_{cx} F99), whereas the imidazole ring of NterPilB_{cx} H101 interacts with the nDsbD_{cx} D114 carboxyl group and comes close to nDsbD_{cx} T99. A structural alignment between NterPilB, DsbC, cDsbD, and

have obtained a robust model using an NMR-driven docking approach for the structure of the mixed disulfide complex between the NterPilB and nDsbD from *N. meningitidis*. This latter complex shares structural homologies with the former three X-ray complexes but possesses its own specificities.

Amino acid sequences and three-dimensional structures for the Trx-like partner have been analyzed carefully in order to reveal the determining structural factors responsible for the complex formation with nDsbD. When excluding the interactions from the second Trx-like subunit of DsbC in the nDsbD-SS-DsbC complex, the same segments of the Trx-like partner have been identified as being involved in the interaction in all complexes, namely the segments corresponding to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops and to the $\alpha 1$ helix of NterPilB_{cx} containing the CXXC motif (Figure 3C). In nDsbD-SS-NterPilB, the additional FLHE loop of

DsbE reveals that only DsbC possesses a little segment ₁₂₅RQG₁₂₇, which could possibly be considered as equivalent to the FLHE loop of NterPilB (Figure 3C). However, the side chains of this segment do not interact at all with *E. coli* nDsbD T99 and T114 but with *E. coli* nDsbD K45 and Q101 in the nDsbD-SS-DsbC complex (Figures 2B and 2E). Therefore, taking into account this information and the fact that FLHE loop forms a secondary interface, it is difficult to conclude whether the FLHE loop of NterPilB is essential or only participates in the recognition of the nDsbD.

Recently, we purified and characterized the structural homolog *N. meningitidis* DsbE (32% of identity and no FLHE loop). Its oxidized form is efficiently reduced by the nDsbD domain with a k_2 value in the range of that determined for the NterPilB domain (Gand et al., personal communication).

Moreover, the superimposition of the structures of nDsbD-SS-DsbE and nDsbD-SS-NterPilB reveals that the orientation of the Trx partner in both complexes does not differ (Figure S2). Finally, this loop is characterized by the absence of large chemical shift variations, or conformational or dynamic changes compared with the free protein. Therefore, it seems probable that the NterPilB FLHE loop does not really act as a determining structural recognition element in the complex formation and consequently cannot be considered as a driving force element for the complex formation.

The fact that (i) the *N. meningitidis* DsbE is not capable of reducing the Msr domains of PilB (Gand et al., personal communication) whereas NterPilB efficiently does, and (ii) the catalytic efficiency (k_2 values) of the reduction of the PilB Msr domains by a truncated form of NterPilB, in which the 6 residues FLHEKK have been deleted by protein engineering approach, is 10-fold less efficient (L.S.-R. et al., unpublished data), strongly support a discriminating structural role of the FLHE loop in the recognition of PilB Msrs but not a key structural role in the formation of the nDsbD-SS-NterPilB complex.

The Cap-Loop of nDsbD from *N. meningitidis*

Compared with the three previously resolved complexes, structural homologies appear in this new nDsbD-SS-NterPilB complex structure. As also seen for the three other X-ray-resolved complexes, the cap-loop of nDsbD_{cx} is opened to permit specific interactions with its Trx-like partner, here NterPilB (Figures 2A and 2D). This opening involves large conformational changes of nDsbD_{cx} residues E69, F70, and F71. We have previously shown that the backbone dynamics features of nDsbD_{free} cap-loop region should allow some structural adjustment. This inner flexibility is here translated with the opening of the cap-loop in nDsbD_{cx}. The dynamics measurements of the nDsbD-SS-NterPilB complex show that the motions in the fast timescale are significantly increased and moreover concern a wider segment. These dynamic changes are probably required to allow the cap-loop to open sufficiently in order to permit formation of an efficient catalytic nDsbD-SS-NterPilB complex. The position of the cap-loop residues is quite similar to what is observed in other complexes, and is stabilized by means of a hydrogen bond between the nDsbD_{cx} E69 carboxylate and the NterPilB_{cx} S72 hydroxyl (Figure 2D). As observed for the nDsbD-SS-DsbE and nDsbD-SS-cDsbD complexes, the aromatic ring of nDsbD_{cx} F70 is parallel to the axis of the $\alpha 1$ helix of the Trx-like partner, in nDsbD-SS-NterPilB. In nDsbD-SS-DsbC complex, this ring is rather perpendicular to the axis of this conserved $\alpha 1$ helix. Interestingly, the aromatic of nDsbD_{cx} F71 points toward the backbone of NterPilB_{cx} and not toward the cavity of the partial β -barrel as observed in nDsbD_{free} (Figure S1B). This swing of F71 seems necessary for the formation of this complex, whereas such conformational change is not observed for the equivalent aromatic ring of Y71 in *E. coli* nDsbD. The latter is indeed already quite solvent exposed in the free state and consequently close to the backbone of its Trx-like partner in the *E. coli* nDsbD_{cx}.

To avoid steric occlusions upon complex formation, the cap should open before disulfide bond formation. In all complexed structures, the cap-loop of nDsbD_{cx} covers the α helix including the CXXC motif of the Trx-like partner (Figures 2A and 2D). Anal-

ysis of the amino-acid sequences of the α helix reveals no consensus sequence (Figure 3C). Moreover, the Trx-like partners do not share any common electrostatic potential features in this region. This suggests that the first step of recognition does not involve the cap-loop. Thus, the cap-loop would not have a discriminating role in the interaction with the Trx-like, but essentially a protecting role in the free form of nDsbD. In that context, the driving force that leads to the opening of the cap-loop remains to be identified.

The SS Bond Region

The third interaction area is located near the SS bond and comprises, on one hand, the CXXC motif, the N135-S141 ($\alpha 4$ - $\beta 4$), and K157-E162 ($\beta 5$ - $\alpha 5$) loops of NterPilB_{cx} and, on the other hand, the segments P13-E15 and G107-P111 of nDsbD_{cx} (Figures 2C and 2F).

The segments around the active site exhibit the largest chemical shift and dynamic variations upon binding. A slow conformational exchange appears there, and is even propagated up to the $\alpha 1$ helix, in NterPilB. The $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops retain some flexibility as in NterPilB_{free}, because their NOE values remain slightly lower than average.

As far as the structural features are concerned, the SS-bond region is stabilized by at least one intermolecular hydrogen bond between the nDsbD_{cx} C109 H^N atom and the backbone carbonyl group of NterPilB_{cx} Y139. This hydrogen bond is systematically found in the other X-ray complexes. Moreover, in nDsbD-SS-DsbE complex, Y141, a conserved residue in DsbEs, was described as interacting with the S9 and F11 residues of the *E. coli* nDsbD_{cx} N-terminal tail, and thus stabilizes this region. In nDsbD-SS-NterPilB, this Y141 residue is replaced by S137 close to nDsbD_{cx} E15, which provides a favorable electrostatic environment. Furthermore, the presence in NterPilB of V108, instead of a glycine in DsbE, DsbC, and cDsbD, should provide more specific and favorable interactions in a hydrophobic pocket formed by nDsbD_{cx} P14, V108, and P111. Considering all the ten structures of nDsbD-SS-NterPilB, this hydrophobic pocket seems more important for the stabilization of the SS-bond region in nDsbD-SS-NterPilB than the interaction between NterPilB_{cx} S137 and nDsbD_{cx} E15.

It is also interesting to note that mobility is induced around the active site of nDsbD upon complex formation. That means that structural adjustment seems to be possible in this region, which is found opposite to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops of NterPilB_{cx}. An illustration of this adaptability is found in nDsbD-SS-NterPilB. Whereas NterPilB V138 is replaced by Gly in all other Trx-like partners of *E. coli* nDsbD_{cx} (Figure 3C), in *N. meningitidis* nDsbD_{cx} V108 is found opposite to the NterPilB_{cx} V138 (Figures 2C and 2F). *N. meningitidis* nDsbD_{cx} forms a hydrophobic pocket that can shelter NterPilB_{cx} V138 (Figure 2C), and we propose that the dynamics of nDsbD_{cx} help to adapt this pocket.

The Recognition Factors of the Trx-like Partners of nDsbD

In contrast to the $\alpha 1$ helix, the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops of NterPilB display more identities in their sequence with the other Trx-like partners. The residue P140 is conserved in all Trx-like partners as well as G158, and they could act as recognition signals. Indeed, the *cis* amide form of P140 assumes a favorable

Structure

NMR Structure and Dynamics of nDsbD-SS-NterPilB

orientation of the carbonyl group of the previous residue 139 in order to form a conserved hydrogen bond with the backbone H^N proton of nDsbD_{C109}. The Trx-like partner G158 increases the flexibility of the peptidic chain in the $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop and makes possible an opposite orientation of this loop with regard to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop. We propose that these two loops, together with the N-terminal part of the $\alpha 1$ helix including the CXXC motif, constitute a particular structural motif insuring the first interaction areas in the approach of the nDsbD partner. Regardless of the sequence, this is the shared structural layout of these three segments that could induce the mutual recognition. Based on the structure of all the complexes involving nDsbD, it prompts us to propose such a conserved Trx-like motif as an initial guiding element in the recognition of both partners.

Studies of protein-ligand interaction often show that the recognition sites become more rigid on binding (see Boehr et al., 2006 for a review). However, similar flexibility and a few cases of increased flexibility are also reported, associated or not with microsecond to millisecond timescale R_{ex} variations. Very few dynamics data are available for protein-protein interactions (see references in Bouguet-Bonnet and Buck, 2008), and none for disulfide bond exchange protein-protein systems, to our knowledge. Our study of a mixed-disulfide covalent complex provides a new dynamics insight into an intermediate state occurring during the disulfide bond exchange mechanism. We have found in the nDsbD-SS-NterPilB complex that increased mobility is observed in the main regions involved in interaction. More precisely, fast timescale motions are increased around the active sites and in nDsbD_{Cx} cap-loop, whereas slow timescale motions appear in NterPilB_{Cx} $\alpha 1$ helix. This probably confers possibilities of structural adjustment in all the nDsbD_{Cx} segments neighboring the intermolecular disulfide bond. A transfer of mobility might be induced from the cap-loop of nDsbD_{Cx} to NterPilB $\alpha 1$ helix, quite similarly to what observed from the transcriptional activator factor NF κ B to some ankyrin repeat domains (Sue et al., 2008). However, in our system, this transfer involving motions at different timescale would be more complex than the transfer of flexibility (i.e., fast timescale motions) reported for the latter. Besides, the complex formation gives rise to increased flexibility in distant regions from the interface, such as in the Lys89-Glu93 segment that is putatively involved in interaction with the DsbD transmembrane domain (Quinternet et al., 2008b). This would suggest long-range dynamic changes similar to those reported in the complex between Rac1 and a domain of plexin-B1 (Bouguet-Bonnet and Buck, 2008). Finally, the mobility in the complex and, notably, the one appearing on NterPilB_{Cx} compared with its globally rigid free forms (i.e., the reduced and oxidized states), might contribute to favor the dissociation of the NterPilB_{red} from its complex with nDsbD. Indeed, some regions of the NterPilB_{red}, in particular the $\alpha 1$ helix, has to retrieve its rigid properties and thus could be a driving force for the complex dissociation. Whether this can be extended to the three other identified Trx-like partners of nDsbD remains to be determined.

Conclusion

Taking into account all of the structural data, both on free and complex states, and the dynamics data from the present study, a route leading to the formation of the transient covalent

complexes between nDsbD and its different Trx-like partners is proposed. The opening of the cap-loop of nDsbD is a prerequisite for the formation of a competent complex between nDsbD and its partners. This is facilitated by the dynamics in the $\beta 6$ - $\beta 7$ region of nDsbD. A specific recognition should occur with the $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 5$ - $\beta 5$ / $\alpha 1$ helix structural motif of the Trx-like partner that is probably favored by the dynamics of the cap-loop and of the $\beta 11$ region of nDsbD. This likely leads to a conformational adaptation of nDsbD that should be a prerequisite for an efficient formation of an interdisulfide bond between C109 of nDsbD and the catalytic Cys of the Trx-like partner. Several specific stabilizing interactions are involved, including the invariant intermolecular hydrogen bond between nDsbD_{Cx} C109 H^N atom and the carbonyl group of the residue 139 of the Trx-like partner.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sample Preparation of the Free Proteins

For the sake of clarity and with respect to the recent literature, amino acids of the *N. meningitidis* nDsbD sequence discussed in this article have been numbered according to its alignment against the *E. coli* nDsbD (sequence identity of 26%), as previously proposed by Quinternet et al. (2008b, 2008c).

Plasmids

Plasmid pETnDsbD_{C103S} encodes the variant C103S of the *N. meningitidis* nDsbD (nDsbD_{C103S}) (Quinternet et al., 2008b, 2008c). The C70S variant of the N-terminal domain of the PilB protein was constructed from the pETNter-PilB plasmid (Wu et al., 2005) using a site-directed mutagenesis approach to substitute the C70 by a Ser (NterPilB_{C70S}).

Production and Purification

^{15}N and $^{15}N/^{13}C$ nDsbD_{C103S} and NterPilB_{C70S} proteins were produced and purified as described previously (Quinternet et al., 2008a, 2008b). For the production of the $^2H/^{13}C/^{15}N$ nDsbD_{C103S} and NterPilB_{C70S} proteins, *E. coli* transformed cells were cultivated in a minimal medium containing deuterium oxide (99.85% D; Euriso-top®) at 37°C for 36 hr after IPTG induction at OD₆₀₀ ~0.6.

Kinetics of NterPilB Reduction by nDsbD and of Interdisulfide Formation between Oxidized NterPilB and C103S or C109S nDsbD

Kinetic measurements were determined on a stopped-flow apparatus by following selectively the enhancement of the fluorescence emission intensity of the Trp residues of NterPilB, associated with reduction of its C67/C70 disulfide bond or formation of an interdisulfide bond, as previously described (Wu et al., 2005). Briefly, the excitation wavelength was set at 293 nm, and the emitted light was collected above 320 nm, using a cut-off filter. One syringe contained the oxidized NterPilB in TE buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, 10 μ M final concentration after mixing), and the other one contained reduced wild-type, C103S or C109S nDsbD at various concentrations in TE buffer (i.e., up to 500 μ M final concentration after mixing). An average of six runs was recorded for each concentration of nDsbD. Rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential equation $y = a e^{-k_{obs}t} + c$, in which c represents the endpoint, a the amplitude of the fluorescence increase (<0), and k_{obs} the rate constant. The slope (k_c) of the rate constant (k_{obs}) plotted against the nDsbD concentration was obtained by linear fitting.

Isolation of nDsbD-SS-NterPilB Complex

NterPilB_{C70S} was activated under its TNB disulfide form, referred to as Nter-PilB_{C70S}-TNB. Activation was carried out by mixing 100 μ M mutated NterPilB with 500 μ M DTNB in TE buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM [pH 8.0]). After 30 min of incubation at room temperature, activated NterPilB_{C70S}-TNB was passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with TE buffer, in order to remove TNB and excess DTNB. The nDsbD-SS-NterPilB complex formed via the DTNB activation process was obtained by mixing NterPilB_{C70S}-TNB with nDsbD_{C103S} in equimolar quantities in TE buffer, and was applied to a gel filtration column Superdex 75 26/60, equilibrated with TE (pH 8.0). Fractions containing pure nDsbD-SS-NterPilB complex were

dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). The final concentration of each NMR sample was about 0.5–1 mM (90% H₂O, 10% D₂O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0. The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

Four samples were prepared as described above. [²H/¹³C/¹⁵N]-nDsbD-SS-NterPilB-[no-labeled] and [no-labeled]-nDsbD-SS-NterPilB-[²H/¹³C/¹⁵N] were used for backbone resonance assignments. [¹³C/¹⁵N]-nDsbD-SS-NterPilB-[no-labeled] and [no-labeled]-nDsbD-SS-NterPilB-[¹³C/¹⁵N] were used for relaxation studies as well as backbone and side-chain resonance assignments.

NMR Spectroscopy

For nondeuterated and deuterated mixed-disulfide complex samples, classical three-dimensional heteronuclear NMR experiments were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz and Avance 800 MHz spectrometers equipped with a TCI cryoprobe. The NMR experiments, as well as the processing and analysis steps permitting access to backbone and side-chain resonance frequencies of each partner of the nDsbD-SS-NterPilB complex, are described in Supplemental Experimental Procedures. To visualize intermolecular NOEs, F_1 -[¹⁵N,¹³C]-filtered NOESY experiments were run on both complexes samples using the standard Bruker pulse sequences with a mixing time of 120 ms (Zwahlen et al., 1997). These experiments permit to differentiate correlations between ¹²C and ¹⁴N bonded protons and ¹³C or ¹⁵N bonded protons.

As described in Supplemental Experimental Procedures, ¹⁵N relaxation experiments and analysis were performed in a manner similar to the free proteins studies (Quinternet et al., 2008a and 2008b), except that shorter T_2 delay values and more transients/increments were used in the relaxation experiments.

Docking Using HADDOCK2.0

Docking of the nDsbD-SS-NterPilB mixed-disulfide complex was performed using HADDOCK2.0 (Dominguez et al., 2003; De Vries et al., 2007) coupled to CNS1.2 (Brunger, 2007). The starting structures were the best ones extracted from the ensembles of NMR solution structures obtained previously (i) for the reduced form of NterPilB_{free} (PDB access number 2jzs) and (ii) for nDsbD_{free} (PDB access number 2k0r). The most representative NMR structure of NterPilB_{free} in its reduced form could be used as a representative form of the C70S NterPilB because no dramatic amide chemical shift perturbation appears with the mutation on the backbone amide groups (Figure S3). In order to give more liberty to the cap-loop of nDsbD_{free}, a first HADDOCK run, defining this loop as a flexible segment, was performed only on the best NMR structure of nDsbD_{free} to collect a water-refine ensemble of four structures. This ensemble was then used as input structures for the docking.

Accessibility to the solvent, checked with NACCESS (Hubbard et al., 1997) and MOLMOL (Koradi et al., 1996), and chemical shift perturbation data were used to obtain a set of ambiguous restraints (AIR) in regard to the recommendations notified in the HADDOCK2.0 manual. The upper limit for AIR has been fixed up to 2.0 Å. Moreover, this enabled us to define a list of active and passive residues and the length of flexible segments. Solvent-accessible residues exhibiting a chemical shift perturbation larger than two standard deviations (σ) or embedded in highly perturbed segments were considered as active. Residues highly accessible to solvent and exhibiting a chemical shift perturbation between 1 and 2 σ and/or that are surface neighbors of the active residues were considered passive. The interface amino acids, which constitute the flexible segments, are defined by the active and passive amino acids used in the AIRs, but possibly extend to one sequential amino acid. Ambiguous and unambiguous restraints, the latter being derived from filtered NOESY experiments, were taken into account from the first rigid-body step until the water-refine step, corresponding to the end of the docking process. The overall docking process consisted of a first step of randomization and rigid-body energy minimization, followed by semiflexible simulated annealing (SA), which is divided into four stages in torsion angle space: (i) high-temperature rigid body search, (ii) a rigid body SA, (iii) a semiflexible SA with flexible side chains at the interface, and (iv) a semiflexible SA with fully flexible interface (both backbone and side chains). The structures obtained after the semiflexible SA have been refined in an explicit 8 Å water layer. During the semiflexible SA and the water-refine steps, the amino acids declared at the interface

(side chains and backbone) are allowed to move in order to optimize the interface packing. The random exclusion of AIR restraint has been turned off. The restraint induced by the disulfide bond has been introduced using the "DISU" patch of CNS1.2. A total of 1000 structures were calculated in the it0 rigid-body step, and the 300 structures with the lowest energy have been selected for the it1 and it1-water refinement steps. Results were analyzed using the clustering approach of HADDOCK2.0. A cut-off value of 1.2 Å has been defined to select the most well-resolved ensembles of structures for the mixed-disulfide complex nDsbD-SS-NterPilB.

ACCESSION NUMBERS

The ten best structures of nDsbD-SS-NterPilB have been deposited in the PDB (www.rcsb.org/pdb) under access code 2k9f.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include one table, three figures, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at [http://www.cell.com/structure/supplemental/S0969-2126\(09\)00221-4](http://www.cell.com/structure/supplemental/S0969-2126(09)00221-4).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, and the IFR 111 Bioingénierie. M.Q. and L.S.-R. gratefully thank the French Ministry of Research, the CNRS, and the Région Lorraine for financial support. Access to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) and Bruker DRX 800 (Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif/Yvette) was deeply appreciated. We thank Chrystel Beaufils for technical support on the Bruker DRX 600, and G. Bechade and S. Sanglier-Cianferani for mass spectrometry analyses.

Received: November 21, 2008

Revised: May 4, 2009

Accepted: May 6, 2009

Published: July 14, 2009

REFERENCES

- Beaufils, C., Neiers, F., Coudeville, N., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.C., Branlant, G., and Cung, M.T. (2006). ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. J. Biomol. NMR 36, 6.
- Boehr, D.D., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2006). An NMR perspective on enzyme dynamics. Chem. Rev. 106, 3055–3079.
- Bouguet-Bonnet, S., and Buck, M. (2008). Compensatory and long-range changes in picosecond-nanosecond main-chain dynamics upon complex formation: ¹⁵N relaxation analysis of the free and bound states of the ubiquitin-like domain of human plexin-B1 and the small GTPase Rac1. J. Mol. Biol. 377, 1474–1487.
- Brot, N., Collet, J.F., Johnson, L.C., Jönsson, T.J., Weissbach, H., and Lowther, W.T. (2006). The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. J. Biol. Chem. 281, 32668–32675.
- Brunger, A.T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR System. Nat. Protoc. 2, 2728–2733.
- Chung, J., Chen, T., and Missiakas, D. (2000). Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulfide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. Mol. Microbiol. 35, 1099–1109.
- De Vries, S.J., van Dijk, A.D.J., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A.M.J.J. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. Proteins 69, 726–733.

Structure

NMR Structure and Dynamics of nDsbD-SS-NterPilB



- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M.J.J. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731–1737.
- Goulding, C.W., Sawaya, M.R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D., and Missiakas, D. (2002). Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* **41**, 6920–6927.
- Haebel, P.W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J., and Metcalf, P. (2002). The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD α complex. *EMBO J.* **21**, 4774–4784.
- Hubbard, T.J.P., Murzin, A.G., Brenner, S.E., and Chothia, C. (1997). A structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* **25**, 236–239.
- Katzen, F., and Beckwith, J. (2000). Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* **103**, 769–779.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55.
- Oly, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PilB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022.
- Porat, A., Cho, S.H., and Beckwith, J. (2004). The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *Res. Microbiol.* **155**, 617–622.
- Quinternet, M., Beaufils, C., Neiers, F., Tsan, P., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.C., Branlant, G., and Cung, M.T. (2007). ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* **1**, 143–145.
- Quinternet, M., Tsan, P., Neiers, F., Beaufils, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.C., Branlant, G., and Cung, M.T. (2008a). Solution structure and backbone dynamics of the reduced and oxidized forms of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* **47**, 8577–8589.
- Quinternet, M., Tsan, P., Selme, L., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.C., Branlant, G., and Cung, M.T. (2008b). Solution structure and backbone dynamics of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* **47**, 12710–12720.
- Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.C., Branlant, G., and Cung, M.T. (2008c). ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* **2**, 85–87.
- Ranaivoson, F.M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjikar, S., Aubry, A., Branlant, G., and Favier, F. (2006). The X-ray structure of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J. Mol. Biol.* **358**, 443–454.
- Rozhkova, A., Stimimann, C.U., Frei, P., Grauschopf, U., Brunisholz, R., Gruetter, M.G., Capitani, G., and Glockshuber, R. (2004). Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* **23**, 1709–1719.
- Skaar, E.P., Tobiason, D.M., Quick, J., Judd, R.C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Seifert, S.H. (2002). The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10108–10113.
- Stewart, E.J., Katzen, F., and Beckwith, J. (1999). Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 5963–5971.
- Stimimann, C.U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Gruetter, M.G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2005). Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. *Structure* **13**, 985–993.
- Stimimann, C.U., Grütter, M.G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2006). nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1642–1648.
- Sue, S.C., Cervantes, C., Komives, E.A., and Dyson, H.J. (2008). Transfer of flexibility between ankyrin repeats in I κ B upon formation of the NF- κ B complex. *J. Mol. Biol.* **380**, 917–931.
- Williamson, R.A., Carr, M.D., Frenkiel, T.A., Feeney, J., and Freedman, R.B. (1997). Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* **36**, 13882–13889.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2005). The N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* **280**, 12344–12350.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L.E. (1997). Methods for measurement of intermolecular NOEs by multi-nuclear NMR spectroscopy: Application to an N-peptide:boxB RNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6711–6721.

Structure 17

Supplemental Data

Formation of the Complex between DsbD and PilB

N-Terminal Domains from *Neisseria Meningitidis*

Necessitates an Adaptability of nDsbD

Marc Quinternet, Pascale Tsan, Laure Selme-Roussel, Christophe Jacob, Sandrine Boschi-Muller, Guy Branlant, and Manh-Thong Cung

Table S1. Statistical Analysis of HADDOCK2.0 Results after Clustering of Solutions for the Mixed Disulfide Complex between NterPilB and nDsbD from *Neisseria meningitidis* using a Cut-Off Value of 1.2 Å

	Cluster 1	Cluster 2
<i>Number of structures</i>	30	29
<i>RMSD from the mean structure (Å)</i>		
All backbone atoms	1.12 ± 0.28	1.09 ± 0.32
All heavy atoms	1.30 ± 0.26	1.29 ± 0.30
<i>Energies (kcal.mol⁻¹)^a</i>		
E _{inter}	10 ± 41	-98 ± 34
E _{vdw}	-32 ± 5	-49 ± 3
E _{elec}	-60 ± 39	-129 ± 25
E _{AIR}	102 ± 9	78 ± 13
<i>Number of AIR violation (>0.3 Å)</i>	4.5 ± 0.9	3.3 ± 0.5
<i>Buried surface area (Å²)^b</i>	1330 ± 165	1435 ± 84
<i>Haddock score</i>	-48 ± 10	-79 ± 9

In all categories, cluster number 2 exhibits best parameters than cluster 1. Consequently, it has been considered as the cluster in best agreement with the experimental data.

^aThe non-bonded energies were calculated with the OPLS parameters using a 8.5 Å cut-off.

^bThe buried surface area was calculated with CNS using a 1.4 Å radius water probe and an accuracy of 0.075 Å.

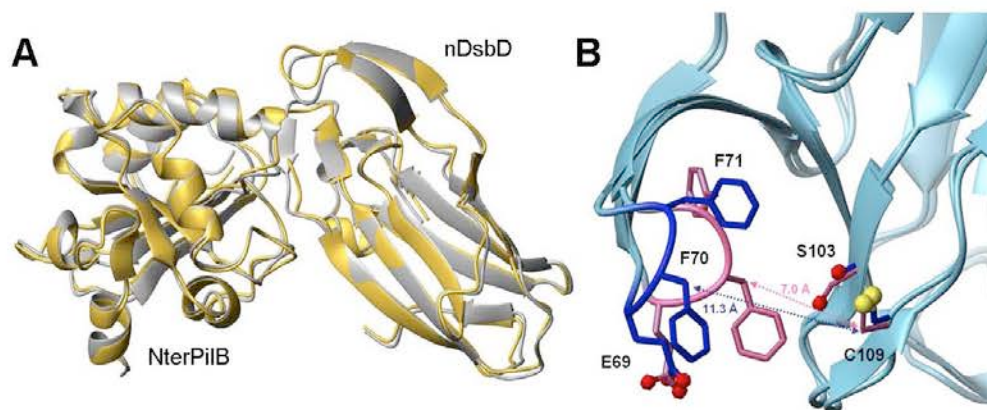


Figure S1. Structure Superimposition of Free and Complexed Forms of *N. meningitidis* NterPilB and nDsbD

(A) Starting structures of NterPilB_{free} and nDsbD_{free} (grey) have been superimposed on the mean structure of nDsbD-SS-NterPilB (yellow) using a ribbon representation of secondary structures.

(B) Superimposition of *N. meningitidis* nDsbD_{free} and nDsbD_{cx}. The heavy atoms of the side-chains for residues E69, F70 and F71 are figured using blue (nDsbD_{cx}) and violet (nDsbD_{free}) sticks. Oxygen and sulfur atoms are respectively represented with red and yellow balls. The C^β...C^β distance between F70 and C109 is indicated with a blue (nDsbD_{cx}) or violet (nDsbD_{free}) dotted line and reported on the drawing.

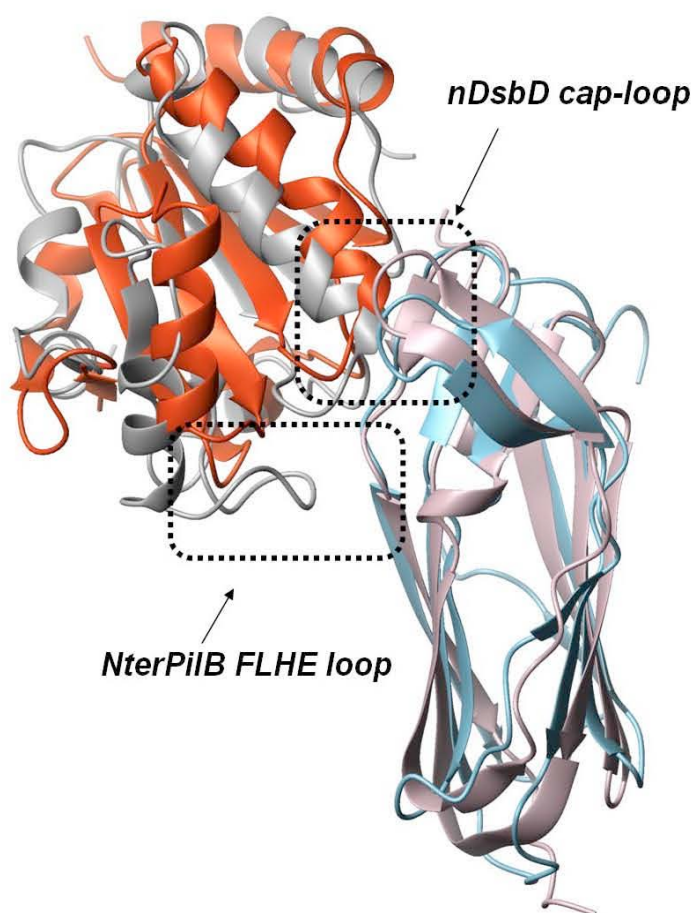


Figure S2. Superimposition of the X-ray Structure of nDsbD-SS-DsbE with the NMR Modeled Structure of nDsbD-SS-NterPilB

The superimposition has been done considering C α atoms in the nDsbD partner of both complexes. The structures are represented using blue ribbon for the nDsbD partner of nDsbD-SS-NterPilB, a grey ribbon for the NterPilB α subunit of nDsbD-SS-NterPilB, a pink ribbon for the nDsbD partner of nDsbD-SS-DsbE and an orange ribbon for the DsbE partner of DsbD-SS-DsbE. The cap-loop of nDsbD and the FLHE loop of NterPilB are highlighted in dotted black boxes. The figure has been generated by MOLMOL.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

NMR Spectroscopy for Assignment and ^{15}N Relaxation of the Mixed Disulfide Complex Between nDsbD and NterPilB from *Neisseria Meningitidis*

All spectra were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz and Avance 800 MHz spectrometers, both equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARA (Keller, 2004). Trimethylsilylpropionic- 2,2,3,3- d_4 acid sodium salt (TSP- d_4 , Euriso-top) was used as an internal reference for ^1H chemical shift whereas indirect referencing was used for ^{13}C and ^{15}N chemical shifts (Wishart et al., 1995).

For both selectively labeled mixed-disulfide complex samples, backbone $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}'$, and side-chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCOC, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HCCH-TOCSY and ^1H - ^{15}N -, ^1H - ^{13}C - HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 120 ms) were also performed for side-chain assignments.

The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2) and the steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE experiments were recorded at 298K on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer, using the usual pulse sequences (Farrow et al., 1994). 128 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points were collected for the R_1 and R_2 experiments, with 16 transients/increment and a recycle delay of 5 s. Ten inversion recovery delays of 2, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 and 1200 ms were used for R_1 measurements, whereas eight delays of 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 and 64 ms were typically used during the CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) period of the R_2 experiments. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE spectra were recorded in an interleaved way with and without proton saturation during relaxation delay, using 128×2 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points and 96 transients/increment typically. The ^1H saturation was achieved by the application of 120° ^1H pulses separated by 5 ms, for a period of 4 s. Spectral widths for all heteronuclear experiments were 2433 Hz (^{15}N) and 8389 Hz (^1H) with carrier frequencies at 117.6 and 4.70 ppm, respectively. Data were processed using XWINNMR (Bruker). They were zero-filled in the ^{15}N dimension and apodized with shifted square sine-bell window in both dimensions. NMRVIEW software version 6.6.2 (Johnson et al., 1994) was used to measure the peak heights of the ^{15}N - ^1H cross-peaks and to determine the R_1 and R_2 values from a fit to a single-exponential decay function and also the $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE from the ratio between the intensities of a peak in the spectra collected with and without proton saturation, respectively. All experiments were performed twice to provide an estimation of the uncertainty on R_1 , R_2 and NOE values.

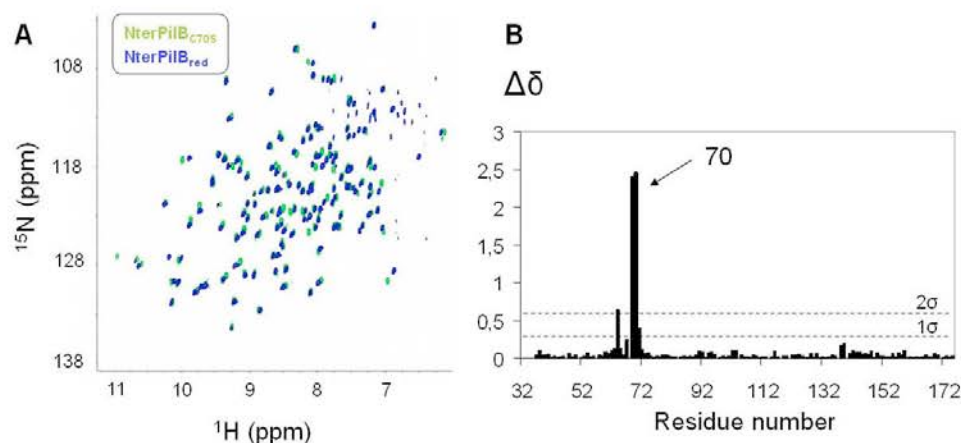


Figure S3. Chemical Shift Perturbation between the Reduced Form and the C70S Variant of NterPilB

^1H - ^{15}N HSQC spectra of the reduced form (blue) and the C70S variant (green) of NterPilB are superimposed (A) and the chemical shift perturbation has been calculated using the consensual value $\Delta\delta$ (B). Backbone amide group assignment of NterPilB_{C70S} was performed using ^1H - ^{15}N HSQC and ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 120 ms). The almost-complete assignments of reduced and oxidized forms of NterPilB, reported previously, were used as a starting point for the reassignment of the variant (Beaufils et al., 2006; Quinternet et al., 2007).

The C70S variant of the N-terminal domain of the PilB protein was constructed from the pETNterPilB plasmid (Wu et al., 2005) using a site-directed mutagenesis approach to substituted the C70 by a serine (NterPilB_{C70S}). ^{15}N NterPilB_{C70S} protein was produced and purified as described previously (Quinternet et al., 2008 and Wu et al., 2005). The NMR sample contained 0.5 mM protein concentration (95% H_2O , 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0.

All spectra were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARRA (Keller, 2004). The mutant assignment was obtained for all

of its backbone amide groups except for the N-terminal residues M32, V33, P34, H35 and S137. The ^1H - ^{15}N HSQC spectra comparison between the mutant and the reduced wild type form of NterPilB shows that the substitution Cys→Ser does not cause any major structural modification. Even if significant changes appear in the chemical shift variation plot, they are located around the substitution, suggesting that it is the consequence of a local change of the chemical environment due to the presence of an OH group instead of a SH group.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Beaufils, C., Neiers, F., Coudeville, N., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. J. Biomol. NMR 36, 6.

Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994). Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. Biochemistry 33, 5984-6003.

Hiyama, Y., Niu, C., Silverton, J. V., Bavoso, A., and Torchia, D. A. (1988) Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - ^2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester. J. Am. Chem. Soc. 110, 2378-2383.

Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. J. Biomol. NMR 4, 603-614.

Keller, R. (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

Quinternet, M., Beaufils, C., Neiers, F., Tsan, P., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2007) ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis*. Biomol. NMR Assign. 1, 143-145.

Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008c) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. Biomol. NMR Assign. 2, 85-87.

Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., and Oldfield, E. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. J. Biomol. NMR 6, 135-140.

Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. J. Biol. Chem. 280, 12344-12350.

Matériels

&

Méthodes

1. Matériel biologique et milieux de culture

1.1. Souches bactériennes

- *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ*AM15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique.
- *E. coli* BL21(DE3) : *hdsS gal* (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 *lacUV5-T7* gène1). Cette souche contient le gène codant l'ARN polymérase du bactériophage T7 dans son génome sous le contrôle du promoteur Lac. Elle est utilisée pour exprimer une séquence codante clonée sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7 (plasmides de la série pET, Novagen).
- *E. coli* C41(DE3) : souche dérivée de la souche BL21(DE3): *hdsS gal* (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 *lacUV5-T7* gène1) plus deux mutations non caractérisées (Miroux et Walker, 1996).
- *E. coli* C600 : e14⁻(McrA⁻) *supE44 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21*. Cette souche est utilisée pour l'obtention du plasmide pFP10.
- *N. meningitidis* 8013 *AsiaD* : mutant *AsiaD* du variant 2C43 de la souche 8013, isolat clinique appartenant au séro groupe C, provenant de l'unité INSERM U570 dirigée par le Pr. Nassif (Paris). Souche piliée, efficacement transformable (Geoffroy *et al.*, 2003) par de l'ADN sous forme linéaire ou circulaire. En inactivant le gène *siaD* qui code la polysialyl transférase (enzyme responsable de la polymérisation de l'acide polysialique, constituant principal de la capsule) la bactérie cesse d'être encapsulée et donc virulente. Le mutant *AsiaD* du variant 2C43 peut donc être manipulé sans risque pour la santé.

1.2. Vecteurs plasmidiques

- pSK195PILB : il s'agit du phagemide recombinant pBluescript II SK (+) portant la séquence codant la protéine PilB de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lacZ* ; dans laquelle la séquence correspondant aux 32 premiers résidus ont été délétés et le codon correspondant à la Met195 de réinitiation interne de la traduction a été remplacé par un codon codant une Ala. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline. Les variants NmPilB étudiés sont également issus de cette construction.
- pET-24c : phagemide recombinant portant le gène de résistance à la kanamycine et utilisé pour l'expression des protéines sauvages et des variants de PilB de *F. nucleatum*, les séquences

Matériels et Méthodes

codantes étant sous le contrôle du promoteur T7, ainsi que des trois domaines isolés (FnNter, FnMsra et FnMsrb) de PilB de *F. nucleatum*.

- pETnDsbD et pETDsbE1 : phagemides recombinants pET-20b portant respectivement les séquences codantes du domaine N-terminal de la protéine DsbD (nDsbD) et de la DsbE1 de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur T7. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline.

- pETapoc_x : phagemide recombinants pET-28b portant la séquence codante du cytochrome *c_x* de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur T7, déléetée de la séquence correspondant à la séquence signal d'export et fusionnée en 5' à une séquence codant une étiquette poly-His. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.

- pBR322 : Plasmide portant un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la tétracycline. Il possède de nombreux sites de restrictions uniques permettant de le linéariser. Il est utilisé en vue de la recombinaison homologue chez *N. meningitidis*. Ce plasmide ne peut pas se répliquer dans cet organisme.

- pFP10 : Plasmide portant un gène de résistance au chloramphénicol (Pagotto *et al.*, 2000). Il est répliatif chez *E. coli* comme chez *N. meningitidis*.

- pHSS6Erm_1 : Plasmide portant la séquence du promoteur LacIOP entre les sites de restriction *NotI* et portant un gène de résistance à l'erythromycine et à la kanamycine (plasmide de Peter Van Ulsen, Department of Molecular Microbiology, Utrecht, Pays-Bas).

1.3. Milieux de culture bactérienne

1.3.1. Milieu riche LB (Luria Bertani)

Le LB est composé de : tryptone (20 g/l), extrait de levure (5 g/l), NaCl (5 g/l). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH et le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour la production en grande quantité des plasmides et des protéines recombinantes. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/l de milieu de culture avant stérilisation.

1.3.2. Milieu autoinductible ZYM 5052 (Studier, 2005)

Le milieu ZYM 5052 est composé de tryptone (1 %), extrait de levure (0,5 %), Na₂HPO₄ (25 mM), K₂HPO₄ (25 mM), NH₄Cl (50 mM), Na₂SO₄ (5 mM), MgSO₄ (1 mM), glycérol (0,5 %), lactose (0,2 %), glucose (0,05 %) et est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour la production en grande quantité des protéines recombinantes à partir de plasmides de type pET.

1.3.3. Milieu riche SOC

Le SOC est composé de : tryptone (20 g/l), extrait de levure (5 g/l), NaCl (5 g/l), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM) et le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour la régénération des bactéries compétentes après transformation.

1.3.4. Milieu minimum M9

Ce milieu est composé de : NaCl (0,5 g/l), KH₂PO₄ (5 mM), Na₂HPO₄, 2H₂O (17,5 mM), NH₄Cl (1 g/l), glucose (4 g/l), riboflavine (1 mg/l), nicotinamide (1 mg/l), pyridoxine monohydrochloride (1 mg/l), thiamine (1 mg/l), MgSO₄, 7H₂O (1 mM), FeSO₄, 7H₂O (25 mg/l) et le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour les productions de la nDsbDC103S et du domaine NterC70S de PilB de *N. meningitidis* simplement marquées au ¹⁵N avec du ¹⁵NH₄Cl (1 g/l) ou doublement marqué ¹⁵N ¹³C avec du ¹⁵NH₄Cl (1 g/l) et du ¹³C-Glucose (4 g/l), ou triplement marqué ¹⁵N ¹³C ²H avec du ¹⁵NH₄Cl (1 g/l), du ¹³C-Glucose (4 g/l) et du D₂O (90 %).

1.3.5. Milieux pour la culture de *N. meningitidis*

- TSB : Bouillon Trypticase Soja (30 g/l). Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour la transformation de souches de *N. meningitidis*.

- GCB liquide : Protéase peptone #3 (15 g/l), K₂HPO₄ (4 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), NaCl (5 g/l), auxquels sont ajoutés après autoclavage et juste avant utilisation 1 % de Supplément 1 (Glucose 400 g/l, Thamine 20 mg/l), 0,1 % de Supplément 2 (Fe(NO₃)₃, 9H₂O 1,25 g/l) et 1 % de Supplément 3 (L-Glutamine 10 g/l). Ce milieu est utilisé pour la culture en milieu liquide de *N. meningitidis*.

Matériels et Méthodes

- GCB solide : GC medium base (36,25 g/l), Agar (5 g/l). Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Les mêmes suppléments 1, 2 et 3 cités précédemment sont également ajoutés au moment de couler le milieu en boîtes de Pétri.

2. Techniques de génie génétique

2.1. Extraction d'ADN génomique de *N. meningitidis*

L'extraction est réalisée à l'aide du kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®]). Le protocole se décompose en 5 étapes : les cellules préalablement cultivées en milieu liquide ou solide sont lysées. Les ARN contaminants sont alors dégradés par l'ajout de RNase (60 µg/ml). Ensuite les protéines sont précipitées et éliminées par centrifugation. L'ADN génomique est alors précipité par ajout d'éthanol à 95 %, puis lavé à l'éthanol à 70 %. Une fois l'éthanol éliminé par centrifugation, les culots contenant l'ADN génomique sont repris dans de l'eau.

2.2. Préparation de l'ADN plasmidique

2.2.1. La minipréparation

La minipréparation d'ADN est utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN dans un but analytique, à partir de 5 mL de culture. Le protocole passe par la lyse alcaline des cellules grâce à une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1 %. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 90 %. Le culot ainsi obtenu est ensuite lavé à l'éthanol à 70 % puis séché, repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, et finalement traité 1 h à 37 °C par la ribonucléase A (1 µg/ml).

2.2.2. Préparation et transformation des cellules compétentes d'*E. coli*

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5α, C600, BL21(DE3) et C41(DE3). Une culture bactérienne est réalisée dans 100 ml de milieu LB à 37 °C sous agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TfbI (CH₃COOK 30 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, Glycérol 15 %, pH 7,0). Après une incubation de 10 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 4 ml de solution TfbII (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, Glycérol 15 %, pH 7,0).

pH 7,0). Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C.

La transformation est réalisée en mélangeant 1 ng de plasmide et 50 µl de bactéries compétentes (Sambrook *et al.*, 1989). Après incubation sur glace, le mélange est soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42 °C ; puis les cellules sont régénérées 1h à 37 °C en milieu LB avant d'être étalées sur boîte LB avec l'antibiotique de résistance approprié au plasmide utilisé et incubées une nuit à 37 °C.

2.2.3. Préparation et transformation des cellules compétentes de *N. meningitidis*

Une préculture de *N. meningitidis* est réalisée sur milieu solide pendant la nuit. Une suspension cellulaire de DO_{600nm} égale à 1 est préparée dans du milieu TSB. Dans 1 ml de TSB contenant 10 mM MgCl₂ sont ajoutés 200 µl de la suspension cellulaire et 2 µg d'ADN plasmidique. Le mélange est incubé à 37 °C sous agitation pendant 1 h. Cinq cent µl sont prélevés, additionnés de 4,5 ml de TSB et incubés à 37 °C sans agitation en présence de 5 % CO₂, pendant 4 à 6 h. Après incubation, 5 ml du mélange précédent est étalé sur boîte GCB contenant les antibiotiques appropriés, et incubé à 37 °C en présence de 5 % de CO₂.

2.3. Mutagenèse du matériel plasmidique

La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* (MBI Fermentas) pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse. Elle nécessite aussi un plasmide double brin superenroulé et deux oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, vont servir d'amorces 3'-OH pour la synthèse de l'ADN par la *Pfu*, conduisant à un plasmide muté aux extrémités non reliées. Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *DpnI* (MBI Fermentas) (séquence cible 5'-Gm6ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, afin de digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. En effet, l'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *DpnI*. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et coupé, est utilisée pour transformer des bactéries DH5α compétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et l'amplifier. Après transformation de 50 µl de cellules DH5α compétentes par 1 à 5 µl de mélange de PCR, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide.

2.4. Clonage des ORF codant les protéines étudiées

Le clonage des ORF codant les différentes protéines de *N. meningitidis* a été réalisé à partir du génome de la souche *N. meningitidis* serogroupe C 8013 et celles de *F. nucleatum* à partir du génome de la souche ATCC 25586 fournie par le Pr H. Jensen de l'Institut de Biologie Moléculaire de Bergen (Norvège).

La technique de PCR permet de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADN génomique compris entre deux oligodésoxyribonucléotides, dont les séquences sont complémentaires aux bordures du fragment d'ADN à amplifier et permet également de créer les sites de restriction *NdeI* et *SacI* (MBI Fermentas). L'enzyme utilisée pour la réaction est l'ADN polymérase *Pfu*. La présence et la taille de l'ADN amplifié est vérifié par dépôt sur gel d'agarose 1 %. Cet ADN est ensuite extrait du gel et purifié grâce à un kit Nucleobond Extract II (Macherey Nagel). Cette extraction est basée sur l'utilisation de colonnes échangeuses d'anions, l'ADN étant chargé négativement. Les vecteurs et les inserts sont ensuite digérés pendant 1h30 à 37 °C par les enzymes de restriction *NdeI* et *SacI* à raison de 3 unités par µg d'ADN. La formation des liaisons phosphodiester entre les extrémités de l'insert et du vecteur est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4 (MBI Fermentas). La ligation se fait en présence d'un excès d'insert de 3 fois par rapport au vecteur linéarisé. Les mélanges de ligations sont placés dans un bain à 16 °C pendant au moins 4 h. Après ligation, la présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonies en utilisant cette fois-ci l'ADN Polymérase *GoTaq* (MBI Fermentas) et les oligodésoxyribonucléotides de clonage.

3. Production et purification des différentes protéines

3.1. Production des protéines recombinantes étudiées (NmPilB, FnMsrA, FnMsrB, FnNter, FnPilB, DsbE1 et nDsbD)

Les souches BL21(DE3) et C41(DE3) sont transformées avec les différents plasmides mentionnés ci-dessus et permettent la surproduction des différentes protéines étudiées. Typiquement, quatre litres de LB ou de ZYM 5052 contenant l'antibiotique approprié sontensemencés au 1/50^{ème} à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB avec antibiotique. Les cultures sont incubées de 18 à 24 h à 37 °C sous agitation. Les antibiotiques de résistance sont ajoutés à 200 mg/l pour l'ampicilline et 50 mg/l pour la kanamycine. Les cellules récoltées par centrifugation à 3 000 g, sont lavées dans du tampon A (saccharose 25 %, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) puis centrifugées et les culots cellulaires sont stockés à -20 °C.

3.2. Désintégration des cellules

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 ml de tampon de purification TE pH 8,0 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) puis les cellules sont désintégrées à une température de 4 °C à l'aide d'un sonicateur ou d'un désintegrateur de cellules (Constant Cell Disruption Systems, Constantsystems). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 12 000 g durant 45 min.

3.3. Purifications

3.3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Pour FnPilB et nDsbD, le surnageant de sonication subit une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. Ainsi, le surnageant de sonication est amené respectivement à 35 et 40 % de saturation en sulfate d'ammonium pour FnPilB et la nDsbD et précipité pendant 2 h sous légère agitation à 4 °C. A cette concentration les protéines d'intérêt ne sont pas précipitées. Après centrifugation pendant 45 min à 12 000 g, le surnageant est ensuite amené respectivement à 55 et 70 % de saturation en sulfate d'ammonium pour FnPilB et la nDsbD, et précipité pendant 2 h sous légère agitation à 4 °C. A cette seconde concentration les protéines d'intérêt sont précipitées et récupérées dans le culot après centrifugation pendant 45 min à 12 000 g.

Pour NmPilB et la DsbE1, le surnageant de sonication est directement amené à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium et précipité pendant 2 h sous légère agitation à 4 °C. A cette concentration NmPilB est précipitée et récupérée dans le culot après centrifugation pendant 45 min à 12 000 g.

3.3.2. Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA54 (acrylamide 5 %, agarose 4 %, Ultragel PALL) dont le domaine de fractionnement se situe entre 5 et 70 kDa. L'élution se fait grâce au tampon de purification. L'analyse des fractions est effectuée par lecture de la $DO_{280/260nm}$ et électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE à 10 ou 12,5 %). Les fractions contenant la protéine sont ensuite rassemblées. Cette étape permet d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes présentes dans le culot de précipitation et une grande quantité d'acides nucléiques.

3.3.3. Chromatographie d'échange d'anions

La solution protéique issue de la filtration sur gel est filtrée puis injectée sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose (résine sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de purification et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences). L'élution se fait par un gradient linéaire croissant de KCl de 0 à 400 mM sous un débit de 5 ml/min. Les protéines sont éluées dans le gradient entre 50 et 200 mM KCl. Cette étape permet d'éliminer des contaminants protéiques.

3.3.4. Chromatographie par interactions hydrophobes

Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la protéine sont amenées à une concentration finale de 1 M en sulfate d'ammonium. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl-Sepharose (agarose 6 % comprenant des groupements phényles, GE Healthcare) équilibrée en tampon TE pH 8,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M et couplée au système FPLC (Amersham Biosciences). L'enzyme est éluee par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sous un débit de 5 ml/min. Cette étape permet d'éliminer les acides nucléiques.

3.3.5. Purification du cytochrome c_x

Pour faciliter la purification, le cytochrome c_x a été produit fusionné à son extrémité N-terminale à une étiquette poly-His (plasmide pETapoc_x). Après sonication, le culot contenant la protéine est repris avec un tampon (Chlorure de guanidinium 4 M, PMSF 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 50 mM), puis dialysé contre le tampon A (KPi 50 mM, KCl 500 mM, pH 7,0) pendant 2 h à 4 °C. Après une centrifugation permettant d'éliminer quelques précipités, le surnageant est amené à 4 % d'imidazole. La protéine est ensuite purifiée par chromatographie sur une colonne Ni-Sepharose préalablement chargée avec du nickel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mM) et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences). La protéine est éluee par un gradient par paliers à 50 % de tampon B (KPi 50 mM, KCl 500 mM, pH 7,0, imidazole 1 M d'imidazole) sous un débit de 5 ml/min. Après concentration, la protéine est purifiée par chromatographie sur une colonne de filtration sur gel (Superdex75) préalablement équilibrée avec tampon B (Tris 50 mM, KCl 100 mM, pH 8,0) et couplée à un système Akta-FPLC (GE Healthcare).

3.3.6. Concentration et conservation des protéines

Les solutions enzymatiques pures sont finalement concentrées par ultra-filtration sous pression à l'aide d'une membrane Amicon YM10 (domaines isolés de PilB, DsbE, nDsbD, cytochrome c_x) ou YM30 (NmPilB et FnPilB) jusqu'à une concentration de l'ordre de 15-30 DO/ml. Les protéines sont ensuite précipitées en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservées à -20 °C.

4. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes

Toutes les études ont été effectuées avec des préparations enzymatiques préalablement réduites par 50 mM de DTT pendant 30 minutes à 4 °C, qui subissent ensuite deux dialyses contre le tampon de purification sous un flux continu d'azote. Cette procédure permet d'obtenir des enzymes à l'état réduit et sans traces de DTT.

4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

4.2. Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon sans aucune trace de sels, 500 µg de protéines sont dessalés sur une colonne de filtration sur gel (HiPrep 26/10 Desalting, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC, ou sur une colonne de filtration sur gel PD-10 (BioRad). L'élution est réalisée par un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 7,6 préparé extemporanément. La fraction la plus concentrée est récupérée puis lyophilisée. Les masses moléculaires des protéines recombinantes ont été déterminées au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO) de Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer. L'appareil utilisé est un spectromètre VG-Bio Q triple quadripole (Micromass).

4.3. Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été déterminé à l'aide des méthodes de Lewis (Mach *et al.*, 1992), et de Gill et von Hippel (Gill et von Hippel, 1989). La méthode de Lewis repose sur le calcul de la concentration en protéine par une relation empirique :

$$C = \frac{DO_{280} - 10^{(2,5 * \text{Log} DO_{320} - 1,5 * \text{Log} DO_{350})}}{5540 * \text{nombre de Trp par monomère} + 1480 * \text{nombre de Tyr par monomère}}$$

La méthode de Gill et von Hippel est fondée sur la mesure des densités optiques à 280 nm pour la protéine en conditions native et dénaturante (en présence de chlorure de guanidinium). Le calcul de la concentration en condition dénaturante repose sur la valeur théorique du coefficient d'extinction molaire à 280 nm ($\epsilon_{\text{dénat}} = 1280 * \text{nombre Tyr} + 5690 * \text{nombre Trp}$).

Coefficients d'extinction molaire des différentes protéines : PilBNm 77 130 M⁻¹.cm⁻¹ ; NterNm 33 690 M⁻¹.cm⁻¹ ; MsrANm 26 200 M⁻¹.cm⁻¹ ; MsrBNm 17 330 M⁻¹.cm⁻¹ ; PilBFn 77 000 M⁻¹.cm⁻¹ ; NterFn 30 055 M⁻¹.cm⁻¹ ; MsrAFn 26 400 M⁻¹.cm⁻¹ ; MsrBFn 21 950 M⁻¹.cm⁻¹ ; nDsbDNm 13 500 M⁻¹.cm⁻¹ ; nDsbDEc 20 340 M⁻¹.cm⁻¹ ; DsbE1 14 770 M⁻¹.cm⁻¹ ; DsbE2 29 700 M⁻¹.cm⁻¹.

4.4. Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB) ou par le dithiodipiridine (2-PDS)

Le contenu en thiols libres des protéines purifiées est déterminé par réaction avec le DTNB (0,3 mM) ou le 2-PDS (0,1 mM) en suivant l'apparition respective du thionitrobenzoate libéré à 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13\,600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ou de pyridine-2-thione libéré à 343 nm ($\epsilon_{343\text{nm}} = 8\,080 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La concentration en protéine est choisie pour donner respectivement un signal de 0,1 DO_{412 nm} ou 0,1 DO_{343nm} par SH libre. Le test se fait en conditions dénaturantes (SDS 1 % final pour le DTNB et urée 0,8 M pour le 2-PDS) en tampon TE pH 8,0.

4.5. Spectres de fluorescence des protéines réduites et oxydées

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été réalisés sur un fluorimètre Flx (SAFAS) à une concentration en enzyme de 1 à 10 µM, en tampon TE pH 8,0. Pour les spectres d'excitation, la longueur d'onde d'émission est fixée à 340 nm, la longueur d'onde d'excitation variant de 250 à 300 nm par incrément de 1 nm. Pour les spectres d'émission, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 282 ou à 293 nm, la longueur d'émission variant de 300 à 450 nm par incrément de 1 nm.

4.6. Potentiels redox à l'équilibre

Pour déterminer le potentiel redox de la nDsbD de *N. meningitidis*, une méthode à l'équilibre avec la Trx P34H ($E^\circ = -235 \text{ mV}$, Krause *et al.*, 1991) basée sur la quantification

des différentes espèces formées par chromatographie en phase inverse a été utilisée. Les deux mélanges équimolaires de Trx P34H réduite / nDsbD oxydée, et de Trx P34H oxydée / nDsbD réduite en tampon KPi 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 sont laissés pendant 24 h à 25 °C, et les réactions ont été arrêtées par ajout de 0,2 % de TFA. Les mélanges ont ensuite été injectés sur chromatographie en phase inverse C8 (Aquapore RP-300 7 µm, Applied Biosystems). Le gradient utilisé permet de séparer les quatre espèces (Trx P34H réduite, Trx P34H oxydée, nDsbD réduite et nDsbD oxydée). Chaque espèce a été injectée seule afin de déterminer son propre volume d'élution et de corréler l'aire du pic à la quantité de protéine. Les quantités relatives des quatre espèces dans les deux mélanges sont mesurées. Les constantes d'équilibre des deux mélanges sont déterminées grâce à l'équation suivante :

$$K_{eq} = [\text{TrxP34H réduite}][\text{nDsbD oxydée}] / [\text{Trx P34H oxydée}][\text{nDsbD réduite}]$$

Les potentiels redox sont calculés grâce à l'équation de Nernst en utilisant une valeur de -0,235 V pour le potentiel redox de la Trx P34H.

$$E'_0 = E'_{0 \text{ Trx P34H}} - (RT/nF) \ln K_{eq}$$

4.7. Spectres de dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés en utilisant un dichrographe CD6 Jobin Yvon, avec une vitesse de mesure de 2 nm/s. Les cuves en quartz utilisées présentent un trajet optique de 1 mm. Les échantillons contiennent 12,5 µM de protéine en tampon Tris 10 mM, pH 8,0. La mesure du spectre dichroïque du tampon est réalisée en début d'expérience et les valeurs obtenues sont ensuite soustraites des données recueillies pour les échantillons. Trois spectres sont effectués pour chaque mesure et sont moyennés pour augmenter la qualité du rapport signal / bruit.

5. Préparation des substrats sulfoxydes

La synthèse du substrat doublement protégé Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe est décrite précisément dans la publication Olry *et al.* 2004. Le produit brut de synthèse est ensuite purifié au laboratoire. Le produit Ac-L-Met-R,S-O-NHMe est isolé par HPLC en phase inverse préparative à l'aide d'une colonne Atlantis® dC18 (5 µm , 4,6x250 mm) couplée à une chaîne HPLC (Waters), comme décrit dans Olry *et al.* 2004.

6. Techniques d'études des propriétés enzymatiques des protéines

Toutes nos études ont été effectuées avec des préparations enzymatiques préalablement réduites par 50 mM de DTT pendant 30 minutes à 4 °C, qui subissent ensuite deux dialyses contre le tampon de purification sous un flux continu d'azote. Cette procédure permet d'obtenir des enzymes à l'état réduit et sans trace de DTT.

6.1. Quantification de la Met en absence de réducteur

Un mélange réactionnel contenant 100 mM de *D,L*-Met-*R,S*-O et 100 à 200 µM d'enzyme, en tampon TE pH 8,0, est incubé à 25 °C durant 15 min. La quantification de la Met dans chaque échantillon est effectuée sur une colonne en phase inverse Atlantis dC18 (4.6x250 mm, Waters), couplée au système ÄKTA Explorer (GE Healthcare). La colonne est équilibrée avec un tampon aqueux acétonitrile 7,5 %, TFA 0,1 %. Une boucle d'injection de 100 µl est utilisée et la Met est éluée en condition isocratique, avec un temps d'élution supérieur à celui de la Met-O. L'intégration du pic est réalisée à 215 nm. Avant chaque série de mesure, un étalonnage de la colonne est effectué avec trois solutions de Met de concentration connue. La stœchiométrie est alors calculée en rapportant la quantité de Met formée à la quantité d'enzyme présente.

6.2. Détermination des K_M et du k_{cat} en présence du système réducteur Trx/Trx réductase/NADPH à l'état stationnaire

Les tests d'activité sont effectués dans le tampon TE pH 8,0 à 25 °C. La disparition du NADPH est suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm au cours du temps. L'activité de l'enzyme est exprimée en µmoles de NADPH disparues par seconde et par µmoles d'enzyme. Le mélange réactionnel comporte : Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe (concentration variable), Trx1 d'*E. coli* (concentration variable), Trx réductase d'*E. coli* (1,2 µM), NADPH (0,3 mM) et MsrA (0,2 µM) ou MsrB (0,5 µM). La Trx1 et la Trx réductase d'*E. coli* ont été produites et purifiées au laboratoire (Mössner et al., 1998 ; Mulrooney, 1997).

Les mesures d'activité ont été réalisées en faisant varier soit la concentration en Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe, la concentration en Trx1 étant saturante ; soit la concentration en Trx1, la concentration en Ac-*L*-Met-*R,S*-O-NHMe étant saturante. Les points expérimentaux ont été ajustés par régression non linéaire à l'équation de Michaelis-Menten à l'aide du logiciel SigmaPlot 2000 (Jandel Scientific):

$$v = (k_{cat} \cdot [E_0] \cdot [S]) / (K_M + [S]) \quad \text{Equation 1}$$

6.3. Cinétique d'apparition de Met par mélange rapide résolu en temps (« quenched flow »)

Cette technique permet de réaliser des cinétiques de formation de Met ou de disparition de SH à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R modifié (Leatherhead, UK). Cet appareil permet de mélanger rapidement deux solutions, contenues initialement dans des seringues, et de stopper la réaction à un temps déterminé par acidification du milieu par ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) contenu dans une troisième seringue. La première seringue contient l'enzyme à la concentration de 300 μ M en tampon TE pH 8,0, la deuxième seringue contient le substrat *D,L*-Met-*R,S*-O à la concentration de 200 mM en tampon TE pH 8,0 et la troisième seringue contient du TFA à 2 %. La température est maintenue à 25 °C. Trois tirs indépendants sont récupérés et rassemblés. Une partie du mélange réactionnel permet de vérifier la concentration en protéines dans le mélange final, une autre à quantifier la Met formée (paragraphe 6.1) et la dernière à titrer les thiols restants par le 2-PDS (paragraphe 4.4).

6.4. Mesure de la vitesse de formation (ou d'échange) des ponts disulfures par spectroscopie de fluorescence résolue en temps (« stopped flow »)

Cette technique est basée sur la différence d'intensité d'émission de fluorescence lors du passage de la forme réduite à oxydée (ou inversement) de la protéine étudiée. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R (Leatherhead, UK). Cet appareil permet de mélanger rapidement deux solutions, contenues initialement dans des seringues, et de suivre l'émission de fluorescence du mélange, le temps mort de l'appareil étant d'environ 1,3 ms. La première seringue contient l'enzyme à la concentration de 10 μ M, en tampon TE pH 8,0, la deuxième seringue contient le substrat à différentes concentrations (10 à 800 mM) en tampon TE pH 8,0. La température est maintenue à 25 °C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 293 nm et un filtre permet de ne mesurer que l'émission de fluorescence de longueur d'onde supérieure à 320 nm.

Les traces expérimentales obtenues sont ajustées à l'équation d'une monoexponentielle croissante (**Equation 2**) ou décroissante (**Equation 3**) afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes (k_{obs}) à l'aide du logiciel SigmaPlot 2000 (Jandel Scientific) :

$$y = y_0 + \text{Amp}(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad \text{Equation 2}$$

$$y = y_0 + \text{Amp} \cdot e^{-k_{obs}t} \quad \text{Equation 3}$$

Le logiciel d'analyse Pro-Kinetics a été utilisé lorsque les ajustements à l'équation de doubles exponentielles n'étaient pas satisfaisants (trop grande divergence entre la trace

Matériels et Méthodes

expérimentale et l'ajustement). Pour cela, nous avons utilisé un modèle cinétique simplifié, à deux étapes : $A \rightarrow B \rightarrow C$, avec lequel les constantes de vitesses associées aux deux étapes sont calculées.

L'ajustement des valeurs de k_{obs} obtenues en fonction de la concentration en substrat à l'équation 4 donne les paramètres cinétiques k_{obsmax} et K_S :

$$k_{obs} = k_{obsmax} \cdot S / (K_S + S) \quad \text{Equation 4}$$

6.5. Vitesse de modification des Cys par le 2-PDS en fonction du pH

Les mesures sont effectuées en utilisant un appareil de cinétique rapide (stopped-flow) permettant de mélanger rapidement volume à volume deux solutions, contenues initialement dans des seringues, et de suivre l'absorbance à 343 nm. La température est maintenue à 25 °C. La première seringue contient du 2-PDS à la concentration de 200 μ M et du tampon (acide acétique 30 mM, tris 120 mM, imidazole 30 mM) à différents pH à force ionique constante. La seconde seringue contient de la protéine à la concentration de 10 μ M dans le même tampon à différents pH.

Les résultats expérimentaux sont ajustés à l'équation d'une monoexponentielle croissante (**équation 2**) afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes (k_{obs}). La constante de pseudo-deuxième-ordre k_2 est obtenue en divisant la valeur de la constante k_{obs} par la concentration en 2-PDS, puis ajustée à l'équation 5 :

$$k_2 = k_{2max} / (1 + 10^{(pK_{app} - pH)}) \quad \text{Equation 5}$$

6.6. Formation de complexes covalents pont disulfure

Voir publication Annexe 3 page 165.

7. Rôle des protéines DsbE1 et PilB chez *N. meningitidis*

7.1. Délétion des gènes correspondants

Pour obtenir une souche de *N. meningitidis* délétée d'un du gène *PilB* ou *dsbE1*, ces derniers sont remplacés par recombinaison homologue par un gène codant la résistance à la kanamycine dans la souche *N. meningitidis* 8013 *AsiaD*. Pour cela, les régions d'ADN flanquant l'ORF à remplacer sont amplifiées par PCR. Les produits d'amplification ont une taille de 500 paires de bases au minimum afin de permettre une double recombinaison homologue au niveau des régions bordant le gène cible. Ces amplicons présentent à leur extrémité une zone de recouvrement de 20 pb générée lors de la conception des

oligodésoxyribonucléotides B et C. De plus, le site de restriction correspondant à l'enzyme *KpnI* est introduit dans la séquence de l'oligodésoxyribonucléotide B comme indiqué sur la Figure 99. La séquence 5'-gccgtctgaa-3' qui permet l'absorption d'ADN exogène par *N. meningitidis* est introduite dans la séquence de l'oligodésoxyribonucléotide A. Cette séquence nucléotidique, appelée « DNA-uptake sequence ou DUS », est nécessaire pour la transformation naturelle de cette bactérie (Smith *et al.*, 1999).

Lors de la deuxième étape, les deux amplicons vont être fusionnés par PCR grâce à la présence des régions chevauchantes présentes sur les oligodésoxyribonucléotides B et C. Cette étape permet d'obtenir un fragment de PCR comprenant le site de restriction de l'enzyme *KpnI* bordé par les régions d'ADN flanquant l'ORF à remplacer.

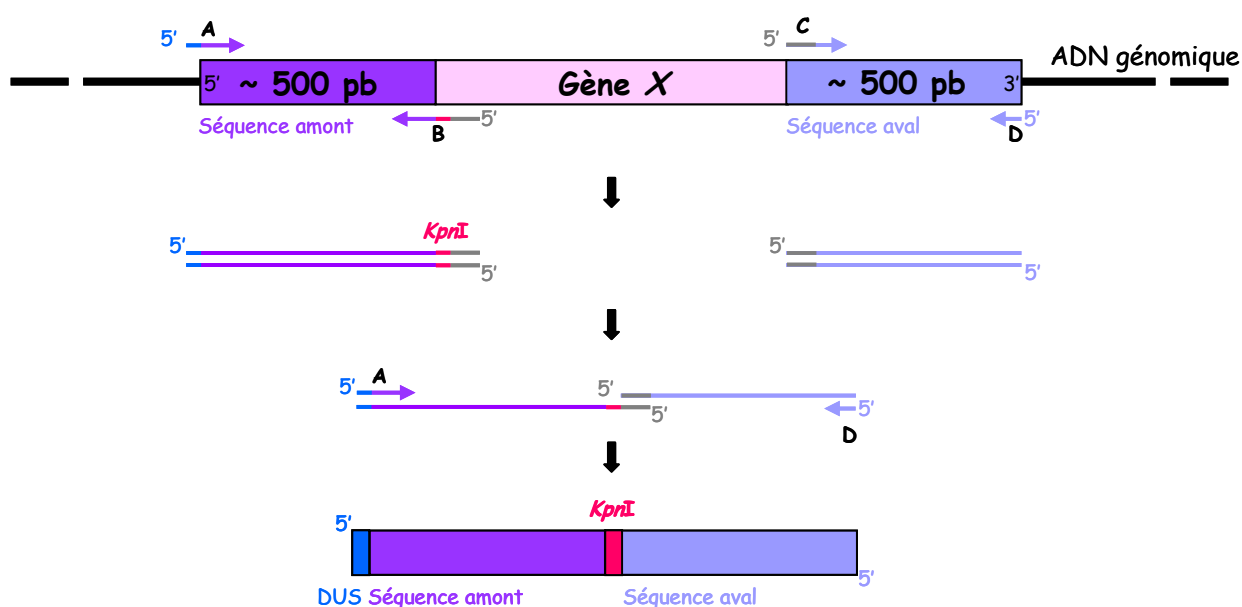


Figure 99 : Premières étapes de la construction d'un mutant de délétion. Lors de ces étapes, les régions flanquantes de l'ORF à remplacer sont amplifiées par PCR à l'aide de deux couples d'oligodésoxyribonucléotides (A/B et C/D). Les deux fragments peuvent s'hybrider (séquences complémentaires représentée en gris présentes sur les oligodésoxyribonucléotides B et C) et sont ensuite fusionnés par une autre étape de PCR à l'aide des oligodésoxyribonucléotides A et D, afin d'obtenir un unique fragment constitué des régions flanquantes précédées de la séquence DUS, et contenant entre celles-ci le site de restriction *KpnI*.

Dans une troisième étape, le produit PCR obtenu est alors cloné au site *EcoRV* du plasmide pBR322. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche DH5α d'*E. coli*. L'ADN plasmidique de clones résistants à l'ampicilline est alors extrait et la séquence de l'insert est vérifiée par séquençage.

Une quatrième étape correspond au sous-clonage d'une cassette Kan^R au site *KpnI* du plasmide pBR322 recombinant obtenu à l'étape précédente. La cassette Kan^R est obtenue par digestion du plasmide pBSL99 à l'aide de l'enzyme de restriction *KpnI* (Alexeyev *et al.*, 1995).

Matériels et Méthodes

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche DH5 α d'*E. coli*. L'ADN plasmidique de clones résistants à l'ampicilline et à la kanamycine est alors extrait.

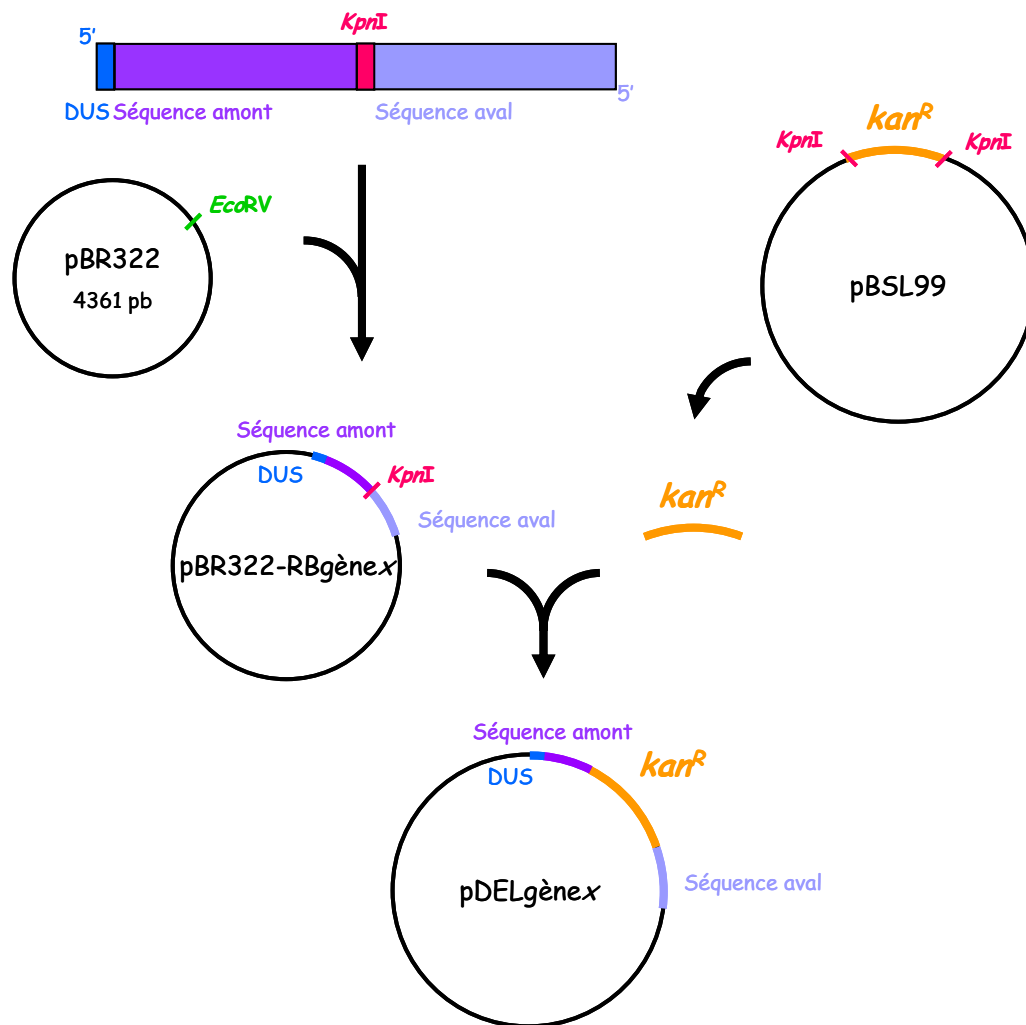


Figure 100 : Construction du plasmide pDELgènex.

L'amplicon obtenu précédemment est cloné au site *EcoRV* du plasmide pBR322. Dans un même temps, la cassette kan^R est obtenue par digestion du plasmide pBSL99 à l'aide de l'enzyme de restriction *KpnI*. Cette cassette kan^R est alors clonée au site *KpnI* du plasmide pBR322 recombinant.

Enfin, ce plasmide recombinant appelé pDELgènex est utilisé sous forme circulaire pour transformer des cellules de *N. meningitidis*. Les clones ont été sélectionnés sur milieu GCB contenant de la kanamycine, ce qui permet de sélectionner les souches pour lesquelles le gène *x* a été remplacé par la cassette Kan^R. Lors de cet événement, il se produit un échange des séquences situées entre les régions homologues présentes sur le chromosome et sur le plasmide pDELgènex. Par ailleurs, le plasmide pBR322 qui a servi de base pour la construction du plasmide pDELgènex ne possède pas d'origine de réplication permettant sa multiplication chez *N. meningitidis*. Par conséquent, il sera perdu par dilution au cours des générations.

7.2. Construction du plasmide pFP10-PLacIOP-*dsbE1*

Cette construction est utilisée pour pouvoir contrôler l'expression de la DsbE1 chez *N. meningitidis*. Pour cela, le gène *dsbE1* est placé sous le contrôle d'un promoteur Lac inductible à l'IPTG dans un plasmide réplcatif chez *E. coli* et chez *N. meningitidis* (Voulhoux *et al.*, 2003).

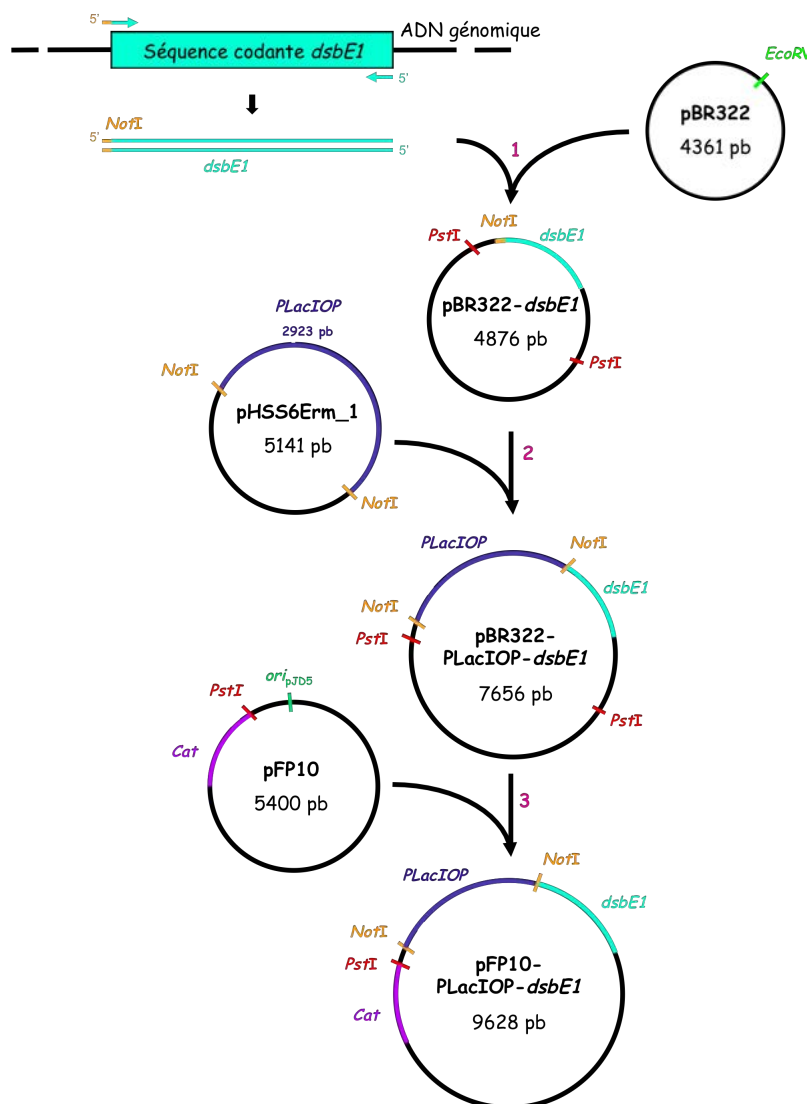


Figure 101 : Construction du plasmide pFP10-PLacIOP-*dsbE1*

1. L'amplicon obtenu par PCR, correspondant à la séquence codante du gène *dsbE1*, est cloné au site *EcoRV* du plasmide pBR322. 2. La cassette PLacIOP est obtenue par digestion du plasmide pHSS6Erm_1 à l'aide de l'enzyme de restriction *NotI*. Cette cassette est alors clonée au site *NotI* du plasmide pBR322-*dsbE1* recombinant. 3. La construction PLacIOP-*dsbE1* obtenue est extraite du plasmide pBR322 recombinant par digestion par l'enzyme de restriction *PstI* et sous clonée au site *PstI* du plasmide pFP10 portant le gène de résistance au chloramphénicol (*Cat*).

Dans un premier temps, la séquence nucléotidique correspondant à la séquence codante de la DsbE1 a été amplifiée par PCR grâce à un couple d'oligodésoxyribonucléotides apportant

à l'extrémité 5' le site de restriction *NotI* (Figure 101), et clonée au site *EcoRV* du plasmide pBR322. Ensuite, après vérification de la bonne insertion de la séquence *dsbE1* dans le plasmide pBR322, la séquence correspondant au promoteur LacIOP (issu du plasmide pHSS6Erm_1) a été clonée au site *NotI* de ce plasmide recombinant pBR322-*dsbE1*. A cette étape, il est nécessaire de vérifier par séquençage que la séquence « LacIOP » est bien orientée dans le même sens de lecture que la séquence *dsbE1*, pour que le promoteur soit bien placé en amont de la séquence à transcrire. Enfin, la construction obtenue (*PLacIOP-dsbE1*) a ensuite été extraite du plasmide pBR322 par digestion par l'enzyme *PstI* du plasmide recombinant pBR322-*PLacIOP-dsbE1* et sous-clonée au site *PstI* du plasmide pFP10. Cette dernière construction a été nommée « pFP10-*PLacIOP-E1* ».

7.3. Vérification de l'expression des protéines par Western blotting

La technique de Western-blotting (WB) permet la séparation et la révélation de protéines. Après avoir été séparées par électrophorèse dans un gel d'acrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose, les protéines d'intérêts sont mises en évidence par un anticorps primaire spécifique. Un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à une enzyme, la peroxydase, permet de révéler le complexe protéine-anticorps primaire.

Après avoir été séparées par électrophorèse sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Trans-Blot[®] (Bio-Rad) dans du tampon de transfert à une tension de 100V pendant une heure, à l'aide du système Mini Trans Blot[®] (Bio-Rad).

Les sites de fixation libres de la membrane sont bloqués par une incubation pendant une nuit à 4°C dans du tampon TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, tween 20 0,05 %) contenant 2% de lait en poudre. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine souhaitée est dilué dans une solution de TBS-T-lait (Tableau 13) et mis au contact des membranes pendant deux heures à 4°C. Ensuite la membrane est lavée pendant 20 min dans 4 bains successifs de tampon TBS-T. La membrane est alors incubée pendant 1 h à température ambiante dans le tampon TBS-T-lait contenant l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugués à la peroxydase de Raifort, Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/10 000^{ème}. Après cette incubation, la membrane est rincée abondamment dans du tampon TBS-T puis recouverte par 2 mL de réactif HRP (ImmobilonTM Western, Millipore) pendant 5 min. Après avoir éliminé le réactif en excès, la membrane est emballée de film plastique Saran et recouverte en chambre noire d'un film photosensible (Fuji RX, Coradio). La peroxydase, en présence de H₂O₂ et de son substrat oxydable (le luminol), produit une chimioluminescence qui permet la détection des protéines.

Protéines cibles	Nter	MsrA	MsrB	nDsbD	DsbE1
Dilution des anticorps primaires	1 / 2 500 ^{ème}	1 / 20 000 ^{ème}	1 / 10 000 ^{ème}	1 / 40 000 ^{ème}	1 / 5 000 ^{ème}

Tableau 13 : Liste des anticorps primaires polyclonaux, dirigés contre les différentes protéines étudiées et indication des dilutions de l'immunsérum utilisées pour les expériences de WB.

Une fraction de chaque protéine purifiée a été envoyée au Centre LAGO (Vonnas, France), qui a pris en charge l'immunisation des lapins et les prélèvements sanguins. La saignée finale est conservée à -80 °C et constitue l'immunsérum.

7.4. Tests vis-à-vis des ERO et ERA en milieu liquide

Ces expériences ont été réalisées d'après le protocole décrit par Hasset *et al.*, 1989. Une préculture de *N. meningitidis* est réalisée sur milieu solide pendant la nuit. Une suspension cellulaire de DO_{600nm} égale à 0,05 est préparée dans du milieu GCB, puis incubée sous agitation à 37 °C, 5 % CO₂, jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} entre 0,2-0,4). Ensuite, 250 à 500 µl de cette culture sont ajoutés à un volume de 9,75 à 9,5 ml de GCB, de manière à avoir une DO_{600nm} égale à 0,01. Dix µl de cette suspension sont étalés sur boîte GCB contenant les antibiotiques appropriés, et représentent le temps 0. Le générateur de stress oxydant est alors ajouté (100 µM d'H₂O₂ ou 10 mM de paraquat) pendant des durées de 0 à 60 min, et la survie des bactéries est suivie. Pour cela, à un temps donné, 10 µl de culture sont prélevés et étalés sur milieu solide GCB, ainsi que d'éventuelles dilutions. Les boîtes sont alors incubées à 37 °C en présence de 5 % CO₂ pendant 24 heures.

7.5. Détection des cytochromes c

L'expression des cytochromes *c* est mise en évidence en utilisant une méthode par chimioluminescence (Vargas *et al.*, 1993) pour mesurer l'activité peroxydase de l'hème lié de façon covalente au cytochrome *c*. Après avoir été séparées par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE 12,5 %), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Trans-Blot[®] (Bio-Rad) dans du tampon de transfert à une tension de 100V pendant une heure, à l'aide du système Mini Trans Blot[®] (Bio-Rad). Puis, 500 µl de réactif de détection par chimioluminescence (GE Healthcare, Amersham TM, ECL Plus Western Blotting Detection System) ont été préparés, déposés sur la membrane et laissés pendant 5 min. Après avoir éliminé le réactif en excès, la membrane est emballée de film plastique Saran et recouverte en chambre noire d'un film photosensible pendant quelques minutes (Fuji RX, Coradio). Les bandes correspondant à des cytochromes *c* sont visualisées sur le film développé.

8. Localisation de la protéine PilB de *N. meningitidis*

8.1. Fractionnement subcellulaire

8.1.1. Méthode d'enrichissement des fractions membrane interne / membrane externe

A partir d'une culture de *N. meningitidis* sur boîte, une suspension bactérienne à DO_{600nm} égale à 0,8 environ est réalisée dans 10 ml de tampon DPBS (pour « Dubelco's Phosphate Buffered Saline », $CaCl_2$ 0.9 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $MgCl$ $6H_2O$ 0.3 mM, NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8 mM, pH 7,3). Après centrifugation à 1 000g pendant 10 min, le culot est repris avec 300 μ l de DPBS froid, puis soniqué pendant 2 min. Les cellules non soniquées sont éliminées par une centrifugation à 1 000 g pendant 5 min, puis le surnageant obtenu est centrifugé une seconde fois à 15 000 g pendant 10 min. Le surnageant correspond à la fraction soluble contenant le cytoplasme et le périplasme (C+P) et le culot correspond aux membranes (M). Les protéines de la fraction C+P sont ensuite précipitées avec 10 % (p/v) d'acide trichloroacétique, et après centrifugation à 15 000 g pendant 10 min, le culot est repris avec 20 μ l de tampon Tris-Base 2 M et 40 μ l de SDS à 0,1 %. Le culot M est repris avec 20 μ l de DPBS contenant 4 % de Triton X-100 et incubé à 37 °C pendant 30 min. Après centrifugation à 15 000 g 10 min, 40 μ l de SDS à 0,1 % est ajouté au surnageant correspondant à la fraction « membrane interne », et le culot correspondant à la fraction « membrane externe » est repris avec 40 μ l de SDS à 0,1 %. Les protéines totales contenues dans les fractions C+P, MI et ME sont ensuite dosées par l'acide bicinchronique (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) et 20 μ g de protéines totales sont déposées sur SDS-PAGE pour les WB (paragraphe 7.3).

8.1.2. Séparation des membranes par gradient de saccharose

A partir de cultures sur milieu solide de *N. meningitidis*, une suspension bactérienne dense est réalisée dans 5 ml de tampon PBS 1X ($NaCl$ 1,37 M, KCl 27 mM, KH_2PO_4 11,5 mM, Na_2HPO_4 64 mM). Après deux lavages du culot au PBS 1X (centrifugation à 4 000 rpm, 20 min), les bactéries sont désintégrées par deux passages successifs au désintégateur de cellule à 15 kPsi, et les cellules entières sont éliminées par deux centrifugations à 4 000 rpm de 10 min. Trois ml du surnageant sont déposés sur le premier gradient de saccharose composé de 4 ml à 15 % de saccharose sur 3 ml à 55 % de saccharose dans des tubes « polyallomer » de 12 ml, et ultra-centrifugé dans un rotor SW41Ti à 38 000 rpm à 4 °C pendant 2 h (Beckman, L8-70M). La bande blanchâtre, située vers le bas du tube (50 % saccharose environ) correspondant aux membranes, est récupérée. Cette fraction est amenée à 30 % de saccharose (mesure au réfractomètre). Deux ml de cette fraction sont ensuite déposés sur le second

gradient de saccharose composé de quatre couches de 2 ml de saccharose à 35 %, 40 %, 45 % et 50 % dans des tubes « polyallomer » de 12 ml. Après une ultra-centrifugation à 35 000 rpm à 4 °C pendant 20 h, dix fractions de 1 ml sont récupérées à partir du haut du tube. La linéarité du gradient en saccharose est vérifiée par mesure au réfractomètre. Les membranes contenues dans chaque fraction sont ensuite précipitées par ajout de 8 ml de tampon EDTA 3 mM, et centrifugées à 50 000 rpm à 4 °C pendant 2 h (rotor Ti 70.1, tubes 355 603). Les culots sont repris dans 300 µl de tampon L (Triéthanolamine 50 mM pH 7,5, saccharose 250 mM, DTT 1 mM). Les protéines totales contenues dans les dix fractions sont ensuite dosées par l'acide bicinchronique (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) et 2 à 10 µg de protéines totales sont déposées sur SDS-PAGE pour les WB (paragraphe 7.3).

8.2. Préparation des coupes de *N. meningitidis* pour la microscopie électronique à transmission (collaboration J. Gérard et Dr A. Brun-Jacob, UHP Nancy 1)

A partir d'une culture de *N. meningitidis* sur milieu solide, les bactéries sont fixées, déhydratées puis incluses dans une résine acrylique (LR White). Des coupes d'une épaisseur de 100 nm sont réalisées avec un ultramicrotome à l'aide d'un couteau de diamant. Les coupes sont déposées sur des grilles de nickel recouvertes d'un film de « formvar ». Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par une incubation dans un tampon de blocage (tampon K₂HPO₄ 0,1 M pH 7,2, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20) pendant 30 min, puis les grilles sont déposées dans une goutte d'anticorps anti-MsrB (dilution 1/100^{ème} dans le tampon de blocage) toute la nuit à 4 °C dans une chambre humide. Après 5 lavages de 5 min avec du PBS-tween 0,2 %, les grilles sont déposées dans des gouttes d'anticorps secondaires anti-lapin (Sigma Gar-IgG) marqués avec des particules d'or de 10 nm (dilution 1/50^{ème} dans le tampon de blocage) pendant 1 h à température ambiante. Les grilles sont ensuite lavées 5 fois pendant 5 min avec du PBS-tween 0,2 %, puis lavées à l'eau ultrapure. Les coupes sont enfin contrastées par une double coloration à l'acétate d'uranyle (15 min) et au citrate de plomb (15 min). Les clichés ont été pris au Service Commun de Microscopies Electroniques et de Microanalyses X, UHP Nancy 1, avec un MET Philips CM20 (200 kV).

8.3. Utilisation de la globomycine pour mettre en évidence une lipoprotéine

A partir d'une préculture de *N. meningitidis* est réalisée sur milieu solide pendant la nuit, une suspension cellulaire de DO_{600nm} égale à 2 est préparée en milieu GCB. 20 ml de milieu GCB sont ensuiteensemencé avec 1 ml de la suspension, en absence ou en présence de 30 mg / l de globomycine (fournie par le Dr M. Inukai, Université de Tokyo, Japon), puis incubée sous agitation à 37 °C, 5 % CO₂, pendant 2 h. Les cultures sont ensuite arrêtées par

Matériels et Méthodes

centrifugation à 4000 rpm, pendant 20 min à 4 °C, et les culots sont repris avec 200 µl de SDS à 0,1 %. Les protéines totales sont ensuite dosées par l'acide bicinchronique (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) et 20 µg de protéines totales sont déposées sur SDS-PAGE 7,5 % pour les WB (paragraphe 7.3).

Références
Bibliographiques

- Archard M. E., Hamilton A. J., Dankowski T., Heras B., Schembri M. S., Edwards J. L., Jennings M. P. et McEwan A. G.** (2009) A periplasmic thioredoxin-like protein plays a role in defense against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun, 77, 4934-9.
- Ahuja U., Kjelgaard P., Schulz B. L., Thony-Meyer L. et Hederstedt L.** (2009) Haem-delivery proteins in cytochrome c maturation System II. Mol Microbiol, 73, 1058-71.
- Ahuja U. et Thony-Meyer L.** (2005) CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation. J Biol Chem, 280, 236-43.
- Ala'Aldeen D. A., Davies H. A., Wall R. A. et Borriello S. P.** (1990) The 70 kilodalton iron regulated protein of *Neisseria meningitidis* is not the human transferrin receptor. FEMS Microbiol Lett, 57, 37-42.
- Alderton W. K., Cooper C. E. et Knowles R. G.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, 357, 593-615.
- Alexeyev M. F., Shokolenko I. N. et Croughab T. P.** (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. Gene, 160, 63-7.
- Anjum M. F., Stevanin T. M., Read R. C. et Moir J. W.** (2002) Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. J Bacteriol, 184, 2987-93.
- Antoine M., Boschi-Muller S. et Branlant G.** (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. J Biol Chem, 278, 45352-7.
- Archibald F. S. et Duong M. N.** (1986) Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. Infect Immun, 51, 631-41.
- Arredondo S. A., Chen T. F., Riggs A. F., Gilbert H. F. et Georgiou G.** (2009) Role of dimerization in the catalytic properties of the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. J Biol Chem, 284, 23972-9.
- Aslund F., Berndt K. D. et Holmgren A.** (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. J Biol Chem, 272, 30780-6.
- Assari T.** (2006) Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. Med Immunol, 5, 4.
- Atkinson H. J. et Babbitt P. C.** (2009) An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. PLoS Comput Biol, 5, e1000541.
- Bader M. W., Hiniker A., Regeimbal J., Goldstone D., Haebel P. W., Riemer J., Metcalf P. et Bardwell J. C.** (2001) Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. Embo J, 20, 1555-62.

Références bibliographiques

Badger J., Sauder J. M., Adams J. M., Antonysamy S., Bain K., Bergseid M. G., Buchanan S. G., Buchanan M. D., Batiyenko Y., Christopher J. A., Emtage S., Eroshkina A., Feil I., Furlong E. B., Gajiwala K. S., Gao X., He D., Hendle J., Huber A., Hoda K., Kearins P., Kissinger C., Laubert B., Lewis H. A., Lin J., Loomis K., Lorimer D., Louie G., Maletic M., Marsh C. D., Miller I., Molinari J., Muller-Dieckmann H. J., Newman J. M., Noland B. W., Pagarigan B., Park F., Peat T. S., Post K. W., Radojicic S., Ramos A., Romero R., Rutter M. E., Sanderson W. E., Schwinn K. D., Tresser J., Winhoven J., Wright T. A., Wu L., Xu J. et Harris T. J. (2005) Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins*, 60, 787-96.

Banaszak K., Mechin I., Frost G. et Rypniewski W. (2004) Structure of the reduced disulfide-bond isomerase DsbC from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 1747-52.

Bartlett R. K., Bieber Urbauer R. J., Anbanandam A., Smallwood H. S., Urbauer J. L. et Squier T. C. (2003) Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, 42, 3231-8.

Beckett C. S., Loughman J. A., Karberg K. A., Donato G. M., Goldman W. E. et Kranz R. G. (2000) Four genes are required for the system II cytochrome c biogenesis pathway in *Bordetella pertussis*, a unique bacterial model. *Mol Microbiol*, 38, 465-81.

Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagenzen J. A., Molin S., Prensier G., Arbeille B. et Ghigo J. M. (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol*, 51, 659-74.

Berlett B. S. et Stadtman E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272, 20313-6.

Bessette P. H., Cotto J. J., Gilbert H. F. et Georgiou G. (1999) In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem*, 274, 7784-92.

Bong S. M., Kwak G. H., Moon J. H., Lee K. S., Kim H. S., Kim H. Y. et Chi Y. M. Structural and kinetic analysis of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Staphylococcus aureus*: conformational changes during catalysis and implications for the catalytic and inhibitory mechanisms. *J Biol Chem*,

Borregaard N., Sorensen O. E. et Theilgaard-Monch K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28, 340-5.

Boschi-Muller S., Azza S. et Branlant G. (2001) *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci*, 10, 2272-9.

Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Van Dorsselaar A. et Branlant G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275, 35908-13.

Boschi-Muller S., Olry A., Antoine M. et Branlant G. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*, 1703, 231-8.

Boschi-Muller S., Gand A., Antoine M. et Branlant G. (2008) The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. *Arch Biochem Biophys*, 474, 266-73.

Brennan L. A., Lee W., Cowell T., Giblin F. et Kantorow M. (2009) Deletion of mouse MsrA results in HBO-induced cataract: MsrA repairs mitochondrial cytochrome c. *Mol Vis*, 15, 985-99.

Brot N., Collet J. F., Johnson L. C., Jonsson T. J., Weissbach H. et Lowther W. T. (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem*, 281, 32668-75.

Brot N. et Weissbach H. (1981) Chemistry and biology of *E. coli* ribosomal protein L12. *Mol Cell Biolchem*, 36, 47-63.

Caldwell P., Luk D. C., Weissbach H. et Brot N. (1978) Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5349-52.

Carbonnelle E., Hill D. J., Morand P., Griffiths N. J., Bourdoulous S., Murillo I., Nassif X. et Virji M. (2009) Meningococcal interactions with the host. *Vaccine*, 27 Suppl 2, B78-89.

Chivers P. T., Prehoda K. E., Volkman B. F., Kim B. M., Markley J. L. et Raines R. T. (1997) Microscopic pKa values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, 36, 14985-91.

Chivers P. T. et Raines R. T. (1997) General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, 36, 15810-6.

Cho S. H. et Beckwith J. (2009) Two snapshots of electron transport across the membrane: insights into the structure and function of DsbD. *J Biol Chem*, 284, 11416-24.

Cho S. H., Porat A., Ye J. et Beckwith J. (2007) Redox-active cysteines of a membrane electron transporter DsbD show dual compartment accessibility. *Embo J*, 26, 3509-20.

Colbert C. L., Wu Q., Erbel P. J., Gardner K. H. et Deisenhofer J. (2006) Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4410-5.

Coudeville N., Antoine M., Bouguet-Bonnet S., Mutzenhardt P., Boschi-Muller S., Branlant G. et Cung M. T. (2007) Solution structure and backbone dynamics of the reduced form and an oxidized form of *E. coli* methionine sulfoxide reductase A (MsrA): structural insight of the MsrA catalytic cycle. *J Mol Biol*, 366, 193-206.

Coureuil M., Mikaty G., Miller F., Lecuyer H., Bernard C., Bourdoulous S., Dumenil G., Mege R. M., Weksler B. B., Romero I. A., Couraud P. O. et Nassif X. (2009) Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science*, 325, 83-7.

Davies K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83, 301-10.

Deeudom M., Koomey M. et Moir J. W. (2008) Roles of c-type cytochromes in respiration in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 154, 2857-64.

Deeudom M., Rock J. et Moir J. (2006) Organization of the respiratory chain of *Neisseria meningitidis*. *Biochem Soc Trans*, 34, 139-42.

Depuydt M., Leonard S. E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K. S. et Collet J. F. (2009) A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, 326, 1109-11.

Références bibliographiques

Dhandayuthapani S., Blaylock M. W., Bebear C. M., Rasmussen W. G. et Baseman J. B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. J Bacteriol, 183, 5645-50.

Dumont M. E., Cardillo T. S., Hayes M. K. et Sherman F. (1991) Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 11, 5487-96.

Dumont M. E., Ernst J. F. et Sherman F. (1988) Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes c. J Biol Chem, 263, 15928-37.

Dunn K. L., Farrant J. L., Langford P. R. et Kroll J. S. (2003) Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by human monocytes/macrophages. Infect Immun, 71, 1604-7.

Edeling M. A., Guddat L. W., Fabianek R. A., Thony-Meyer L. et Martin J. L. (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. Structure, 10, 973-9.

Edwards J. L. et Apicella M. A. (2004) The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. Clin Microbiol Rev, 17, 965-81, table of contents.

Evans T. J., Buttery L. D., Carpenter A., Springall D. R., Polak J. M. et Cohen J. (1996) Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 9553-8.

Ezraty B., Grimaud R., El Hassouni M., Moinier D. et Barras F. (2004) Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*. Embo J, 23, 1868-77.

Fabianek R. A., Hennecke H. et Thony-Meyer L. (2000) Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev, 24, 303-16.

Fang F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nat Rev Microbiol, 2, 820-32.

Fang I. M., Yang C. H., Lin C. P., Yang C. M., et Chen M. S. (2004) Expression of chemokine and receptors in Lewis rats with experimental autoimmune anterior uveitis. Exp Eye Res, 78, 1043-55.

Favier A. (2003) Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiels thérapeutique. L'actualité chimique, 11-12, 108-115.

Fisher W. R., Taniuchi H. et Anfinsen C. B. (1973) On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. J Biol Chem, 248, 3188-95.

Fransen F., Hamstra H. J., Boog C. J., van Putten J. P., van den Dobbelsteen G. P. et van der Ley P. The structure of *Neisseria meningitidis* lipid A determines outcome in experimental meningococcal disease. Infect Immun, 78, 3177-86.

Frawley E. R. et Kranz R. G. (2009) CcsBA is a cytochrome c synthetase that also functions in heme transport. Proc Natl Acad Sci U S A, 106, 10201-6.

Jand A., Antoine M., Boschi-Muller S. et Branlant G. (2007) Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of methionine sulfoxide reductase A. J Biol Chem, 282, 20484-91.

Gill S. C. et von Hippel P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem, 182, 319-26.

Goldman B. S., Beck D. L., Monika E. M. et Kranz R. G. (1998) Transmembrane heme delivery systems. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 5003-8.

Goldman B. S., Beckman D. L., Bali A., Monika E. M., Gabbert K. K. et Kranz R. G. (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome c biogenesis. J Mol Biol, 268, 724-38.

Goldstone D., Haebel P. W., Katzen F., Bader M. W., Bardwell J. C., Beckwith J. et Metcalf P. (2001) DsbC activation by the N-terminal domain of DsbD. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 9551-6.

Goulding C. W., Apostol M. I., Gleiter S., Parseghian A., Bardwell J., Gennaro M. et Eisenberg D. (2004) Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 279, 3516-24.

Goulding C. W., Sawaya M. R., Parseghian A., Lim V., Eisenberg D. et Missiakas D. (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. Biochemistry, 41, 6920-7.

Grimaud R., Ezraty B., Mitchell J. K., Lafitte D., Briand C., Derrick P. J. et Barras F. (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. J Biol Chem, 276, 48915-20.

Gruez A., Libiad M., Boschi-Muller S. et Branlant G. (2010) Structural and biochemical characterization of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Neisseria meningitidis*. J Biol Chem, 285, 25033-43.

Gunesekere I. C., Kahler C. M., Ryan C. S., Snyder L. A., Saunders N. J., Rood J. I. et Davies J. K. (2006) Ecf, an alternative sigma factor from *Neisseria gonorrhoeae*, controls expression of msrAB, which encodes methionine sulfoxide reductase. J Bacteriol, 188, 3463-9.

Haebel P. W., Goldstone D., Katzen F., Beckwith J. et Metcalf P. (2002) The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD α complex. Embo J, 21, 4774-84.

Hamel P., Corvest V., Giege P. et Bonnard G. (2009) Biochemical requirements for the maturation of mitochondrial c-type cytochromes. Biochim Biophys Acta, 1793, 125-38.

Hansel A., Jung S., Hoshi T. et Heinemann S. H. (2003) A second human methionine sulfoxide reductase (hMSRB2) reducing methionine-R-sulfoxide displays a tissue expression pattern distinct from hMSRB1. Redox Rep, 8, 384-8.

Références bibliographiques

Harrison L. H., Trotter C. L. et Ramsay M. E. (2009) Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 27 Suppl 2, B51-63.

Hassett D. J., Charniga L. et Cohen M. S. (1990) recA and catalase in H₂O₂-mediated toxicity in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 172, 7293-6.

Hassouni M. E., Chambost J. P., Expert D., Van Gijsegem F. et Barras F. (1999) The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 887-92.

Herzberg M. C., Nobbs A., Tao L., Kilic A., Beckman E., Khammanivong A. et Zhang Y. (2005) Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis*-induced thrombosis. *J Periodontol*, 76, 2101-5.

Heurlier K., Thomson M. J., Aziz N. et Moir J. W. (2008) The nitric oxide (NO)-sensing repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. *J Bacteriol*, 190, 2488-95.

Hiemstra P. S. (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res*, 33, 537-42.

Ho Y. S., Burden L. M. et Hurley J. H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo J*, 19, 5288-99.

Householder T. C., Fozo E. M., Cardinale J. A. et Clark V. L. (2000) Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, norB, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide. *Infect Immun*, 68, 5241-6.

Huston W. M., Lowe E. C., Butler C. S. et Moir J. W. (2005) Purification and characterization of cytochrome c' from *Neisseria meningitidis*. *Biochem Soc Trans*, 33, 187-9.

Jeva R., Roncarati D., Metruccio M. M., Seib K. L., Scarlato V. et Delany I. (2008) OxyR tightly regulates catalase expression in *Neisseria meningitidis* through both repression and activation mechanisms. *Mol Microbiol*, 70, 1152-65.

Ito K. et Inaba K. (2008) The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 450-8.

Jamet A., Rousseau C., Monfort J. B., Nassif X. et Martin P. (2010) Identification of a novel transcriptional regulator involved in pilC1 regulation in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 304, 140-7.

Jung S., Hansel A., Kasperczyk H., Hoshi T. et Heinemann S. H. (2002) Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Lett*, 527, 91-4.

Kadokura H., Katzen F. et Beckwith J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, 72, 111-35.

- Kantorow M., Hawse J. R., Cowell T. L., Benhamed S., Pizarro G. O., Reddy V. N. et Hejtmancik J. F.** (2004) Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9654-9.
- Kato S., Saeki Y., Aoki M., Nagai M., Ishigaki A., Itoyama Y., Kato M., Asayama K., Awaya A., Hirano A. et Ohama E.** (2004) Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation is common to SOD1-mutated motor neurons in humans and animal models. *Acta Neuropathol*, 107, 149-58.
- Katzen F. et Beckwith J.** (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, 103, 769-79.
- Kern M., Eisel F., Scheithauer J., Kranz R. G. et Simon J.** (2010) Substrate specificity of three cytochrome c haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem c binding motifs are not sufficient for haem c attachment by Nrfl and CcsA1. *Mol Microbiol*, 75, 122-37.
- Kim G., Cole N. B., Lim J. C., Zhao H. et Levine R. L.** (2010) Dual sites of protein initiation control the localization and myristoylation of methionine sulfoxide reductase A. *J Biol Chem*, 285, 18085-94.
- Kim H. Y., Fomenko D. E., Yoon Y. E. et Gladyshev V. N.** (2006) Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases. *Biochemistry*, 45, 13697-704.
- Kim H. Y. et Gladyshev V. N.** (2004) Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell*, 15, 1055-64.
- Kim H. Y. et Gladyshev V. N.** (2005) Role of structural and functional elements of mouse methionine-S-sulfoxide reductase in its subcellular distribution. *Biochemistry*, 44, 8059-67.
- Kim Y. K., Shin Y. J., Lee W. H., Kim H. Y. et Hwang K. Y.** (2009) Structural and kinetic analysis of an MsrA-MsrB fusion protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 72, 699-709.
- Kranz R. G., Beckett C. S. et Goldman B. S.** (2002) Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome c biogenesis pathway. *Res Microbiol*, 153, 1-6.
- Kranz R. G., Richard-Fogal C., Taylor J. S. et Frawley E. R.** (2009) Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 510-28, Table of Contents.
- Krause G., Lundstrom J., Barea J. L., Pueyo de la Cuesta C. et Holmgren A.** (1991) Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J Biol Chem*, 266, 9494-500.
- Kuboniwa M., Tribble G. D., James C. E., Kilic A. O., Tao L., Herzberg M. C., Shizukuishi S. et Lamont R. J.** (2006) *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol Microbiol*, 60, 121-39.
- Kumar R. A., Koc A., Cerny R. L. et Gladyshev V. N.** (2002) Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase. *J Biol Chem*, 277, 37527-35.
- Kwak G. H., Kim M. J. et Kim H. Y.** Cysteine-125 is the catalytic residue of *Saccharomyces cerevisiae* free methionine-R-sulfoxide reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 395, 412-5.

- Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J. S., Collet J. F. et Serre L.** (2009) Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J Mol Biol*, 392, 952-66.
- Lambeth J. D.** (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4, 181-9.
- Le Brun N. E., Bengtsson J. et Hederstedt L.** (2000) Genes required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 36, 638-50.
- Le D. T., Lee B. C., Marino S. M., Zhang Y., Fomenko D. E., Kaya A., Hacıoglu E., Kwak G. H., Koc A., Kim H. Y. et Gladyshev V. N.** (2009) Functional analysis of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 284, 4354-64.
- Lee C., Lee S. M., Mukhopadhyay P., Kim S. J., Lee S. C., Ahn W. S., Yu M. H., Storz G. et Ryu S. E.** (2004) Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1179-85.
- Lepoivre M., Fieschi F., Coves J., Thelander L. et Fontecave M.** (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 179, 442-8.
- Lescure A., Gautheret D., Carbon P. et Krol A.** (1999) Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem*, 274, 38147-54.
- Levine R. L., Mosoni L., Berlett B. S. et Stadtman E. R.** (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15036-40.
- Lewin A., Crow A., Oubrie A. et Le Brun N. E.** (2006) Molecular basis for specificity of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *J Biol Chem*, 281, 35467-77.
- Li Q., Hu H., Wang W. Q. et Xu G. J.** (2001) Structural and redox properties of the leaderless DsbE (CcmG) protein: both active-site cysteines of the reduced form are involved in its function in the *Escherichia coli* periplasm. *Biol Chem*, 382, 1679-86.
- Lin Z., Johnson L. C., Weissbach H., Brot N., Lively M. O. et Lowther W. T.** (2007) Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9597-602.
- Lo H., Tang C. M. et Exley R. M.** (2009) Mechanisms of avoidance of host immunity by *Neisseria meningitidis* and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis*, 9, 418-27.
- Lowther W. T., Brot N., Weissbach H. et Matthews B. W.** (2000) Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry*, 39, 13307-12.
- Lowther W. T., Weissbach H., Etienne F., Brot N. et Matthews B. W.** (2002) The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat Struct Biol*, 9, 348-52.
- Mach H., Middaugh C. R. et Lewis R. V.** (1992) Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem*, 200, 74-80.

- Marchetti M. A., Lee W., Cowell T. L., Wells T. M., Weissbach H. et Kantorow M.** (2006) Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells. *Exp Eye Res*, 83, 1281-6.
- Marchetti M. A., Pizarro G. O., Sagher D., Deamicis C., Brot N., Hejtmancik J. F., Weissbach H. et Kantorow M.** (2005) Methionine sulfoxide reductases B1, B2, and B3 are present in the human lens and confer oxidative stress resistance to lens cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2107-12.
- Mattick J. S.** (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56, 289-314.
- McCord J. M. et Fridovich I.** (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- Merchant S. S.** (2009) His protects heme as it crosses the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10069-70.
- Messens J. et Collet J. F.** (2006) Pathways of disulfide bond formation in Escherichia coli. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1050-62.
- Miroux B. et Walker J. E.** (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260, 289-98.
- Moore T. D. et Sparling P. F.** (1995) Isolation and identification of a glutathione peroxidase homolog gene, gpxA, present in Neisseria meningitidis but absent in Neisseria gonorrhoeae. *Infect Immun*, 63, 1603-7.
- Moore T. D. et Sparling P. F.** (1996) Interruption of the gpxA gene increases the sensitivity of Neisseria meningitidis to paraquat. *J Bacteriol*, 178, 4301-5.
- Moskovitz J., Bar-Noy S., Williams W. M., Requena J., Berlett B. S. et Stadtman E. R.** (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12920-5.
- Moskovitz J., Poston J. M., Berlett B. S., Nosworthy N. J., Szczepanowski R. et Stadtman E. R.** (2000) Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem*, 275, 14167-72.
- Moskovitz J., Rahman M. A., Strassman J., Yancey S. O., Kushner S. R., Brot N. et Weissbach H.** (1995) Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol*, 177, 502-7.
- Mossner E., Huber-Wunderlich M. et Glockshuber R.** (1998) Characterization of Escherichia coli thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*, 7, 1233-44.
- Mulrooney S. B. et Williams c. H.** (1997) Evidence for two conformational states of thioredoxin reductase from Escherichia coli: use of intrinsic and extrinsic quenchers of flavin fluorescence as probes to observe domain rotation. *Protein Sci*, 6, 2188-95.

Références bibliographiques

Namork E. et Brandtzaeg P. (2002) Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. Lancet, 360, 1741.

Nassif X., Beretti J. L., Lowy J., Stenberg P., O'Gaora P., Pfeifer J., Normark S. et So M. (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 3769-73.

Nathan C. et Shiloh M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 8841-8.

Neiers F., Kriznik A., Boschi-Muller S. et Branlant G. (2004) Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. J Biol Chem, 279, 42462-8.

Oke T. T., Moskovitz J. et Williams D. L. (2009) Characterization of the methionine sulfoxide reductases of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol, 1.

Olry A., Boschi-Muller S. et Branlant G. (2004) Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. Biochemistry, 43, 11616-22.

Olry A., Boschi-Muller S., Marraud M., Sanglier-Cianferani S., Van Dorsselear A. et Branlant G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. J Biol Chem, 277, 12016-22.

Olry A., Boschi-Muller S., Yu H., Burnel D. et Branlant G. (2005) Insights into the role of the metal binding site in methionine-R-sulfoxide reductases B. Protein Sci, 14, 2828-37.

Olyhoek A. J., Sarkari J., Bopp M., Morelli G. et Achtman M. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *opc*, the gene for an unusual class 5 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* (meningococci/surface antigen). Microb Pathog, 11, 249-57.

Ouyang N., Gao Y. G., Hu H. Y. et Xia Z. X. (2006) Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal beta-sheet and the fingerprint region. Proteins, 65, 1021-31.

Page M. D., Pearce D. A., Norris H. A. et Ferguson S. J. (1997) The *Paracoccus denitrificans* *ccmA*, *B* and *C* genes: cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- c-type cytochrome transporter. Microbiology, 143 (Pt 2), 563-76.

Pagotto F. J., Salimnia H., Totten P. A. et Dillon J. R. (2000) Stable shuttle vectors for *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus* spp. and other bacteria based on a single origin of replication. Gene, 244, 13-9.

Palsson-McDermott E. M. et O'Neill L. A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology, 113, 153-62.

Pascual I., Larrayoz I. M., Campos M. M. et Rodriguez I. R. (2009) Methionine sulfoxide reductase B2 is highly expressed in the retina and protects retinal pigmented epithelium cells from oxidative damage. Exp Eye Res,

- Pellic V.** (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol*, 68, 827-37.
- Perkins-Balding D., Ratliff-Griffin M. et Stojiljkovic I.** (2004) Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 154-71.
- Petropoulos I., Mary J., Perichon M. et Friguet B.** (2001) Rat peptide methionine sulfoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem J*, 355, 819-25.
- Picot C. R., Perichon M., Cintrat J. C., Friguet B. et Petropoulos I.** (2004) The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett*, 558, 74-8.
- Pomposiello P. J. et Demple B.** (2002) Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*, 46, 319-41.
- Quinternet M., Selme L., Beaufils C., Tsan P., Jacob C., Boschi-Muller S., Averlant-Petit M. C., Branlant G. et Cung M. T.** (2008) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol NMR Assign*, 2, 85-7.
- Quinternet M., Tsan P., Neiers F., Beaufils C., Boschi-Muller S., Averlant-Petit M. C., Branlant G. et Cung M. T.** (2008) Solution structure and dynamics of the reduced and oxidized forms of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*, 47, 8577-89.
- Quinternet M., Tsan P., Selme L., Beaufils C., Jacob C., Boschi-Muller S., Averlant-Petit M. C., Branlant G. et Cung M. T.** (2008) Solution structure and backbone dynamics of the cysteine 103 to serine mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*, 47, 12710-20.
- Quinternet M., Tsan P., Selme-Roussel L., Jacob C., Boschi-Muller S., Branlant G. et Cung M. T.** (2009) Formation of the complex between DsbD and PilB N-terminal domains from *Neisseria meningitidis* necessitates an adaptability of nDsbD. *Structure*, 17, 1024-33.
- Ranaivoson F. M., Antoine M., Kauffmann B., Boschi-Muller S., Aubry A., Branlant G. et Favier F.** (2008) A structural analysis of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J Mol Biol*, 377, 268-80.
- Ranaivoson F. M., Kauffmann B., Neiers F., Wu J., Boschi-Muller S., Panjikar S., Aubry A., Branlant G. et Favier F.** (2006) The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J Mol Biol*, 358, 443-54.
- Ranaivoson F. M., Neiers F., Kauffmann B., Boschi-Muller S., Branlant G. et Favier F.** (2009) Methionine sulfoxide reductase B displays a high level of flexibility. *J Mol Biol*, 394, 83-93.
- Reid E., Cole J. et Eaves D. J.** (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J*, 355, 51-8.
- Ritz D. et Beckwith J.** (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 21-48.

Références bibliographiques

- Rock J. D., Mahnane M. R., Anjum M. F., Shaw J. G., Read R. C. et Moir J. W.** (2005) The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolic levels. *Mol Microbiol*, 58, 800-9.
- Rouhier N. et Jacquot J. P.** (2003) Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin-glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. *FEBS Lett*, 554, 149-53.
- Rouhier N., Kauffmann B., Tete-Favier F., Palladino P., Gans P., Branlant G., Jacquot J. P. et Boschi-Muller S.** (2007) Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem*, 282, 3367-78.
- Rozhkova A. et Glockshuber R.** (2007) Kinetics of the intramolecular disulfide exchange between the periplasmic domains of DsbD. *J Mol Biol*, 367, 1162-70.
- Rozhkova A. et Glockshuber R.** (2008) Thermodynamic aspects of DsbD-mediated electron transport. *J Mol Biol*, 380, 783-8.
- Rozhkova A., Stirnimann C. U., Frei P., Grauschopf U., Brunisholz R., Grutter M. G., Capitani G. et Glockshuber R.** (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *Embo J*, 23, 1709-19.
- Ruan H., Tang X. D., Chen M. L., Joiner M. L., Sun G., Brot N., Weissbach H., Heinemann S. H., Iverson L., Wu C. F. et Hoshi T.** (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2748-53.
- Sadanandom A., Poghosyan Z., Fairbairn D. J. et Murphy D. J.** (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 123, 255-64.
- Salmon A. B., Perez V. I., Bokov A., Jernigan A., Kim G., Zhao H., Levine R. L. et Richardson A.** (2009) Lack of methionine sulfoxide reductase A in mice increases sensitivity to oxidative stress but does not diminish life span. *Faseb J*, 23, 3601-8.
- Sanders C., Turkarslan S., Lee D. W., Onder O., Kranz R. G. et Daldal F.** (2008) The cytochrome c maturation components CcmF, CcmH, and CcmI form a membrane-integral multisubunit heme ligation complex. *J Biol Chem*, 283, 29715-22.
- Sasindran S. J., Saikolappan S. et Dhandayuthapani S.** (2007) Methionine sulfoxide reductases and virulence of bacterial pathogens. *Future Microbiol*, 2, 619-30.
- Scandalios J. G.** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38, 995-1014.
- Scarselli M., Serruto D., Montanari P., Capecchi B., Adu-Bobie J., Veggi D., Rappuoli R., Pizza M. et Arico B.** (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol*, 61, 631-44.
- Schapiro J. M., Libby S. J. et Fang F. C.** (2003) Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8496-501.
- Schulz H., Fabianek R. A., Pelliccioli E. C., Hennecke H. et Thony-Meyer L.** (1999) Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation requires the CcmC protein,

which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 6462-7.

Seib K. L., Tseng H. J., McEwan A. G., Apicella M. A. et Jennings M. P. (2004) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. J Infect Dis, 190, 136-47.

Seib K. L., Wu H. J., Srikhanta Y. N., Edwards J. L., Falsetta M. L., Hamilton A. J., Maguire T. L., Grimmond S. M., Apicella M. A., McEwan A. G. et Jennings M. P. (2007) Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 63, 54-68.

Seib K. L., Wu H. J., Kidd S.P., Apicella M. A., McEwan A. G. et Jennings M. P. (2006) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. Microbiol Mol Biol Rev, 70, 344-61.

Serruto D., Adu-Bobie J., Scarselli M., Veggi D., Pizza M., Rappuoli R. et Arico B. (2003) *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. Mol Microbiol, 48, 323-34.

Singh V. K. et Moskovitz J. (2003) Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. Microbiology, 149, 2739-47.

Singh V. K., Moskovitz J., Wilkinson B. J. et Jayaswal R. K. (2001) Molecular characterization of a chromosomal locus in *Staphylococcus aureus* that contributes to oxidative defence and is highly induced by the cell-wall-active antibiotic oxacillin. Microbiology, 147, 3037-45.

Sinha S., Langford P. R. et Kroll J. S. (2004) Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. Microbiology, 150, 2993-3000.

Skaar E. P., Tobiasson D. M., Quick J., Judd R. C., Weissbach H., Etienne F., Brot N. et Seifert H. S. (2002) The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 10108-13.

Smith N. H. , Holmes E. c., Donovan, Carpenter G. A. et Spratt B. G. (1999) Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of argF, recA, rho and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. Mol Biol Evol, 16, 773-83.

Snape M. D., Kelly D. F., Lewis S., Banner C., Kibwana L., Moore C. E., Diggle L., John T., Yu L. M., Borrow R., Borkowski A., Nau C. et Pollard A. J. (2008) Seroprotection against serogroup C meningococcal disease in adolescents in the United Kingdom: observational study. Bmj, 336, 1487-91.

Steiner H., Kispal G., Zollner A., Haid A., Neupert W. et Lill R. (1996) Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. J Biol Chem, 271, 32605-11.

Stephens D. S. (2009) Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. Vaccine, 27 Suppl 2, B71-7.

Stevanin T. M., Moir J. W. et Read R. C. (2005) Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. Infect Immun, 73, 3322-9.

Références bibliographiques

- Stewart E. J., Katzen F. et Beckwith J.** (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. Embo J, 18, 5963-71.
- Stirnimann C. U., Rozhkova A., Grauschopf U., Grutter M. G., Glockshuber R. et Capitani G.** (2005) Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. Structure, 13, 985-93.
- Stone J. R. et Yang S.** (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. Antioxid Redox Signal, 8, 243-70.
- Studier F. W.** (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif, 41, 207-34.
- Sun G., Sharkova E., Chesnut R., Birkey S., Duggan M. F., Sorokin A., Pujic P., Ehrlich S. D. et Hulett F. M.** (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 178, 1374-85.
- Sun H., Gao J., Ferrington D. A., Biesiada H., Williams T. D. et Squier T. C.** (1999) Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. Biochemistry, 38, 105-12.
- Swanson J.** (1978) Studies on gonococcus infection. XIV. Cell wall protein differences among color/opacity colony variants of *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun, 21, 292-302.
- Taha M. K., Dupuy B., Saurin W., So M. et Marchal C.** (1991) Control of pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae* as an original system in the family of two-component regulators. Mol Microbiol, 5, 137-48.
- Taha M. K. et Marchal C.** (1990) Conservation of *Neisseria gonorrhoeae* pilus expression regulatory genes pilA and pilB in the genus *Neisseria*. Infect Immun, 58, 4145-8.
- Tamarit J., Cabiscol E. et Ros J.** (1998) Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. J Biol Chem, 273, 3027-32.
- Tarrago L., Laugier E., Zaffagnini M., Marchand C. H., Le Marechal P., Lemaire S. D. et Rey P.** Plant thioredoxin CDSP32 regenerates 1-cys methionine sulfoxide reductase B activity through the direct reduction of sulfenic acid. J Biol Chem, 285, 14964-72.
- Taylor A. B., Benglis D. M., Jr., Dhandayuthapani S. et Hart P. J.** (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. J Bacteriol, 185, 4119-26.
- Tete-Favier F., Cobessi D., Boschi-Muller S., Azza S., Branlant G. et Aubry A.** (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase at 1.9 Å resolution. Structure, 8, 1167-78.
- Thony-Meyer L., Fischer F., Kunzler P., Ritz D. et Hennecke H.** (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. J Bacteriol, 177, 4321-6.
- Tinsley C. R., Voulhoux R., Beretti J. L., Tommassen J. et Nassif X.** (2004) Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria*

meningitidis: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J Biol Chem*, 279, 27078-87.

Toledano M. B., Kullik I., Trinh F., Baird P. T., Schneider T. D. et Storz G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell*, 78, 897-909.

Tseng H. J., McEwan A. G., Apicella M. A. et Jennings M. P. (2003) OxyR acts as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 71, 550-6.

Tseng H. J., Srikhanta Y., McEwan A. G. et Jennings M. P. (2001) Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Mol Microbiol*, 40, 1175-86.

Turner S., Reid E., Smith H. et Cole J. (2003) A novel cytochrome c peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*: a lipoprotein from a Gram-negative bacterium. *Biochem J*, 373, 865-73.

Turner S. M., Moir J. W., Griffiths L., Overton T. W., Smith H. et Cole J. A. (2005) Mutational and biochemical analysis of cytochrome c', a nitric oxide-binding lipoprotein important for adaptation of *Neisseria gonorrhoeae* to oxygen-limited growth. *Biochem J*, 388, 545-53.

Tzeng Y. L., Ambrose K. D., Zughaier S., Zhou X., Miller Y. K., Shafer W. M. et Stephens D. S. (2005) Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 187, 5387-96.

Tzeng Y. L., Datta A. K., Strole C. A., Lobritz M. A., Carlson R. W. et Stephens D. S. (2005) Translocation and surface expression of lipidated serogroup B capsular Polysaccharide in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 73, 1491-505.

Ugarte N., Petropoulos I. et Friguet B. (2009) Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*,

Unkmeir A., Latsch K., Dietrich G., Wintermeyer E., Schinke B., Schwender S., Kim K. S., Eigenthaler M. et Frosch M. (2002) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol*, 46, 933-46.

Van Ulsen P. et Tommassen J. (2006) Protein secretion and secreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 292-319.

Vandeputte-Rutten L., Bos M. P., Tommassen J. et Gros P. (2003) Crystal structure of *Neisserial* surface protein A (NspA), a conserved outer membrane protein with vaccine potential. *J Biol Chem*, 278, 24825-30.

Vasta G. R. (2009) Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*, 7, 424-38.

Vargas C., McEwan A. G. et Downies J. A. (1993) Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem*, 209, 323-6.

Vieira Dos Santos C., Cuine S., Rouhier N. et Rey P. (2005) The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol*, 138, 909-22.

Références bibliographiques

Virji M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. Nat Rev Microbiol, 7, 274-86.

Virji M., Kayhty H., Ferguson D. J., Alexandrescu C., Heckels J. E. et Moxon E. R. (1991) The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. Mol Microbiol, 5, 1831-41.

Virji M., Watt S. M., Barker S., Makepeace K. et Doyonnas R. (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 22, 929-39.

Vivian J. P., Scoullar J., Rimmer K., Bushell S. R., Beddoe T., Wilce M. C., Byres E., Boyle T. P., Doak B., Simpson J. S., Graham B., Heras B., Kahler C. M., Rossjohn J. et Scanlon M. J. (2009) Structure and function of the oxidoreductase DsbA1 from *Neisseria meningitidis*. J Mol Biol, 394, 931-43.

Voulhoux R., Bos MP., Geurten J., Mols M. et Tommassen J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. Science, 299, 262-5.

Weissbach H., Resnick L. et Brot N. (2005) Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. Biochim Biophys Acta, 1703, 203-12.

Wilks K. E., Dunn K. L., Farrant J. L., Reddin K. M., Gorringer A. R., Langford P. R. et Kroll J. S. (1998) Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. Infect Immun, 66, 213-7.

Wizemann T. M., Moskovitz J., Pearce B. J., Cundell D., Arvidson C. G., So M., Weissbach H., Brot N. et Masure H. R. (1996) Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 7985-90.

Wu H. J., Seib K. L., Srikhanta Y. N., Edwards J., Kidd S. P., Maguire T. L., Hamilton A., Pan K. T., Hsiao H. H., Yao C. W., Grimmond S. M., Apicella M. A., McEwan A. G., Wang A. H. et Jennings M. P. (2009) Manganese regulation of virulence factors and oxidative stress resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. J Proteomics,

Wu J., Neiers F., Boschi-Muller S. et Branlant G. (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. J Biol Chem, 280, 12344-50.

Yermolaieva O., Xu R., Schinstock C., Brot N., Weissbach H., Heinemann S. H. et Hoshi T. (2004) Methionine sulfoxide reductase A protects neuronal cells against brief hypoxia/reoxygenation. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 1159-64.

Zughaier S. M., Shafer W. M. et Stephens D. S. (2005) Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. Cell Microbiol, 7, 1251-62.

Les espèces *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, sont des bactéries pathogènes obligatoires de l'Homme, qui ont acquis différents mécanismes de défense pour détecter et combattre le stress oxydant généré par les mécanismes de défense de l'hôte lors de l'infection. La protéine PilB périplasmique, ferait partie de ces mécanismes et serait de ce fait associée à leur pathogénicité. PilB est composée de trois domaines : un domaine N-terminal (Nter) à activité disulfure oxydoréductase, et les domaines central et C-terminal à activité Méthionine Sulfoxyde Réductase (Msr) respectivement de classe A et B. L'étude des domaines isolés de PilB avait montré que le domaine Nter réduit sélectivement le domaine MsrB. Par ailleurs, le domaine Nter présente un repliement de type DsbE. Les DsbE sont des disulfure oxydoréductases périplasmiques impliquées dans la maturation des cytochromes *c*. En particulier, la DsbE1 de *N. meningitidis* a été identifiée par le Dr Adeline Gand lors de son doctorat.

Lors de ma thèse, l'étude des protéines PilB de *N. meningitidis* et de *Fusobacterium nucleatum* m'a permis de montrer que : 1) la sélectivité de réduction du domaine Nter pour le domaine MsrB n'est pas conservée, 2) la sélectivité de réduction des domaines Nter observée sur les domaines isolés n'est pas retrouvée sur les PilB entiers ; et 3) dans tous les PilB, la réduction du domaine MsrB par le domaine Nter peut se faire selon un mécanisme intramoléculaire. De plus, nous avons étudié *in vivo* l'effet de la délétion du gène *pilB* sur la survie d'une souche de *N. meningitidis* en présence d'agents oxydants. D'autre part, le domaine N-terminal de la protéine DsbD (nDsbD) de *N. meningitidis* a été identifié comme étant le réducteur périplasmique de PilB et de la DsbE1 de *N. meningitidis*. Enfin, la caractérisation de l'activité apocytochrome *c* réductase de la DsbE1 de *N. meningitidis* a été complétée par des approches *in vitro* et *in vivo* chez *N. meningitidis*.

The *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* species are human obligatory pathogenic bacteria, which acquired various defense mechanisms to detect and fight oxidative stress generated by mechanisms of host defense during infection. The periplasmic PilB protein, specific to these bacteria, would be part of such mechanisms and would be associated with their pathogenicity. PilB is composed of three domains: an N-terminal domain (Nter) with disulfide oxidoreductase activity, and central and C-terminal domains with Methionine sulfoxide reductase activity (Msr) of A and B class respectively. The study of isolated domains of PilB showed that the Nter domain selectively reduced MsrB domain. Moreover, this Nter domain presents a DsbE-fold. The DsbE are periplasmic disulfide oxidoreductases involved in the maturation of cytochrome *c*. In particular, Dr. Adeline Gand identified the DsbE1 from *N. meningitidis* during his PhD.

During my PhD, the study of PilB proteins from *N. meningitidis* and *Fusobacterium nucleatum* allowed me to show that: 1) the selective reduction of Nter domain for the MsrB domain is not conserved, 2) the selective reduction of Nter domains observed on the isolated domains is not found in entire PilB, and 3) in all PilB, the MsrB domain reduction by Nter domain could be an intramolecular mechanism. Moreover, we studied the *in vivo* effect of the *pilB* gene deletion on the survival of a strain of *N. meningitidis* in the presence of oxidants. And, the N-terminal domain of DsbD protein (nDsbD) from *N. meningitidis* was identified as the reducing partner of periplasmic PilB and DsbE1 of *N. meningitidis*. Finally, the characterization of apocytochrome *c* reductase activity of DsbE1 *N. meningitidis* was complemented by *in vitro* and *in vivo* approaches in *N. meningitidis*.