



HAL
open science

Les Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A : catalyse, spécificité structurale et relations structure-fonction

Mathias Antoine

► **To cite this version:**

Mathias Antoine. Les Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A : catalyse, spécificité structurale et relations structure-fonction. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10169 . tel-01746971

HAL Id: tel-01746971

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746971>

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>

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Enzymologie Moléculaire

par **Mathias ANTOINE**

Les Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A : catalyse, spécificité structurale et relations structure-fonction

Soutenance publique le 14 Septembre 2006

Membres du jury :

| | | |
|---------------|----------------------|--|
| Rapporteurs : | M. B. Friguet | Professeur, Université Denis Diderot, Paris VII |
| | M. D. Kern | Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg I |
| Examineurs : | M. M. T. Cung | Directeur de Recherche, CNRS/ENSIC Nancy I |
| | M. M. Ruiz-Lopez | Directeur de Recherche, CNRS/UHP Nancy I |
| | M. J. P. Jacquot | Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I |
| | Mme S. Boschi-Muller | Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I |
| | M. G. Branlant | Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I |

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à Madame le Docteur Christiane Branlant, Directeur de l'UMR 7567 CNRS-UHP, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Guy Branlant, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire, qui a encadré ce travail. Je lui suis profondément reconnaissant pour m'avoir encadré depuis le DEA jusqu'à l'aboutissement de ma thèse. Je le remercie pour ses enseignements en Licence et Maîtrise de Biochimie qui ont été déterminant pour mon orientation, ainsi que pour la formation, la rigueur, la culture scientifique et les conseils avisés qu'il m'a transmis au cours de ma thèse. Par les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et ses conseils continus, il m'a guidé et aidé jusque dans la rédaction de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller qui a co-encadré mon travail depuis le DEA. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour sa disponibilité, ses compétences, sa franchise, sa forte implication dans ce travail, ses conseils, et toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues au cours de ses quatre années. Merci encore pour son aide tout au long de ma thèse et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent à Messieurs les Professeurs Bertrand Friguet et Daniel Kern, qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Messieurs Manh Thong Cung, Manuel Ruiz-Lopez et Jean-Pierre Jacquot d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer et de partager de nombreuses discussions scientifiques. Messieurs Brice Kauffmann, Moutsé Ranaivoson et le Docteur Frédérique Tête-Favier du groupe Biocristallographie du LCM3B (UMR 7036 CNRS-UHP) pour leur collaboration de longue date ; Messieurs Nicolas Coudeville, Aurélien Thureau et le Docteur Manh Thong Cung du LCPM (UMR 7568 CNRS-ENSIC) pour les études structurales par RMN des Msr ; Monsieur Guillaume Chevreux et les docteurs Sarah Sanglier et Noëlle Potier du LSMBO à Strasbourg (UMR 7509 CNRS-ULP) pour les très nombreuses analyses de spectrométrie de masse, les Docteurs Jacques Bodiguel et Michel Marraud du LCPM pour leurs expertises en chimie organique et les synthèses de sulfoxydes ; le Docteur Bulent Balta, Monsieur Eddy Thiriot et les Docteurs Gérald Monard et Manuel Ruiz-Lopez du laboratoire CBT (UMR 7565 CNRS-UHP) pour l'étude par chimie théorique du mécanisme des Msr, ainsi que les réunions et discussions toujours très enrichissantes que nous avons eues.

Merci encore à Nicolas pour son très gros travail sur la MsrA, pour m'avoir fait découvrir une partie des possibilités de la RMN, et pour ses propositions pas si farfelues et toujours intéressantes, et à Guillaume pour son investissement dans ce travail, pour m'avoir initié au monde de la spectrométrie de masse et m'avoir accueilli chez lui à plusieurs reprises. Je vous remercie pour les excellents moments partagés ensemble, pourvu que ça dure !

Je veux remercier les Docteurs Franck Travers, Corinne Lionne et Tom Barman pour leur accueil, conseils et assistance lors de mon passage à Montpellier.

Merci aux Docteurs François Talfournier, Sophie Rahuel, Christophe Jacob et au Professeur Athanase Visvikis pour leurs conseils, les discussions, l'aide et la bonne humeur partagés ensemble.

Je tiens à dire ma reconnaissance au Docteur Stéphane Marchal pour m'avoir encadré lors de mon stage de Licence au MAEM et pour m'avoir montré la voie à suivre.

J'adresse un remerciement tout particulier à Arnaud, mon jumeau de thèse, et Adeline pour la bonne humeur, l'humour, la convivialité, les discussions scientifiques ou autres, et l'entraide partagés au quotidien.

Je remercie également les thésards, postdoc et DEA du laboratoire que j'ai pu côtoyer durant ma thèse. Notamment Xav' et Laure, Sylvain, Aileen, Raphaël ainsi que les MsrB boys Alex, Fabrice et Sanjiv.

Je remercie grandement Christophe, Séverine, Alex K, Lionel, Carine et particulièrement Saïd pour leurs précieuses assistances et expertises techniques. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Je remercie particulièrement Jackie pour sa gentillesse et sa bonne humeur inoxydable, sans compter sa grande contribution à la bonne marche du laboratoire.

Merci enfin à tous à tous les autres membres du laboratoire MAEM.

Merci à toute ma famille, Papa et Joëlle, Marine, Mamama, mes oncles et tantes, notamment Jean et Béné, cousins et cousines, ma belle-famille et à tous mes amis, en particulier Cédric et Sandrine, Guillaume et Virginie, Michael et Delphine, Rémi et Hélène, Marco et Manue, pour leurs soutien, écoute et conseils.

Enfin, je voudrais terminer en disant toute mon affection à Hélène et en la remerciant pour m'avoir supporté, écouté, soutenu et encouragé surtout pendant cette dernière année de thèse, et ce malgré la distance et l'éloignement. Sa présence et les moments passés ensemble me sont indispensables et m'ont permis de trouver la force de mener à bien ce travail.

Table des matières

INTRODUCTION

| | |
|---|-----------|
| PARTIE I : LA CHIMIE DES SULFOXYDES ET DES ACIDES SULFENIQUES | 1 |
| I.1 La fonction sulfoxyde | 1 |
| I.1.1 Structure et réactivité..... | 1 |
| I.1.1.1 Aspects structuraux de la fonction sulfoxyde..... | 1 |
| I.1.1.2 Réactivité chimique des sulfoxydes | 3 |
| I.1.1.2.1 Réduction des sulfoxydes en sulfures..... | 3 |
| I.1.1.2.2 Oxydation des sulfoxydes en sulfones | 5 |
| I.1.1.2.3 Propriétés basiques des sulfoxydes | 5 |
| I.1.1.2.4 Dismutation des sulfoxydes..... | 5 |
| I.1.1.2.5 Caractère nucléophile des sulfoxydes | 6 |
| I.1.2 Sulfoxyde naturel..... | 6 |
| I.1.2.1 Le sulforaphène et composés analogues..... | 6 |
| I.1.2.2 Les S-alkyle(cène) cystéine sulfoxydes..... | 7 |
| I.1.2.3 Les polythéonamides A et B..... | 8 |
| I.1.2.4 La biotine sulfoxyde | 8 |
| I.1.2.5 Le DMSO | 9 |
| I.1.3 Enzymologie de la formation et de la réduction des sulfoxydes | 10 |
| I.1.3.1 Diméthyle Sulfoxyde Réductase (DMSOR) | 11 |
| I.1.3.1.1 Organisation de la chaîne respiratoire | 11 |
| I.1.3.1.2 Structure et mécanisme catalytique | 12 |
| I.1.3.2 Biotine Sulfoxyde Réductase (BSOR) | 18 |
| I.1.3.3 Diméthyle Sulfure Déshydrogénase | 21 |
| I.2 La fonction acide sulfénique..... | 21 |
| I.2.1 Structure et réactivité..... | 21 |
| I.2.1.1 Réactivité de l'atome de soufre des acides sulféniques..... | 22 |
| I.2.1.2 Stabilisation des acides sulféniques..... | 23 |
| I.2.2 Acides sulféniques et protéines | 25 |
| I.2.2.1 Acide sulfénique et catalyse | 26 |
| I.2.2.1.1 Réductases à FAD : NADH Peroxydase, NADH Oxydase..... | 26 |
| I.2.2.1.1.1 NADH Peroxydase (Npx)..... | 26 |
| I.2.2.1.1.2 NADH Oxydase (Nox) | 31 |
| I.2.2.1.2 Formylglycine-Generating Enzyme | 33 |
| I.2.2.1.3 Peroxydases à Cys (Prx)..... | 35 |
| I.2.2.2 Acide sulfénique et régulation rédox enzymatique | 41 |
| I.2.2.2.1 Peroxyrédoxine eucaryote/Sulfirédoxine | 41 |
| I.2.2.2.2 Tyr Phosphatase | 43 |
| I.2.2.2.3 Nitrile hydratase | 45 |
| I.2.2.2.4 Protéine S100A8 murine | 47 |
| I.2.2.2.5 Albumines Sériques Humaine et Bovine..... | 49 |
| I.2.2.3 Régulation rédox de facteurs de transcription | 50 |
| I.2.2.3.1 Facteurs bactériens (OxyR/OhrR) | 51 |
| I.2.2.3.2 Facteurs eucaryotes (Yap1) | 51 |
| PARTIE II : OXYDATION DES METHIONINES ET CONSEQUENCES POUR LA FONCTION DES PROTEINES | 52 |
| II.1 Oxydation de la Met par les FAO | 53 |
| II.1.1 Radical hydroxyle | 53 |
| II.1.2 Peroxyde d'hydrogène | 54 |
| II.1.3 Peroxynitrite..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| II.2 Conséquences de l'oxydation des Met | 56 |
| II.2.1 Implication dans la lutte contre les FAO | 57 |
| II.2.2 Modulation de la fonction des protéines | 57 |
| II.2.2.1 Inhibiteurs de protéases | 58 |
| II.2.2.2 Calmoduline | 58 |
| II.2.2.3 Canaux ioniques | 59 |
| II.2.2.4 Ffh | 60 |
| II.2.3 Implication dans les maladies neurodégénératives | 60 |
| II.2.4 Adressage vers les voies de dégradation | 61 |
| PARTIE III : LES METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASES | 61 |
| III.1 Rôle physiologique des Msr, un système de réparation aux multiples implications | 62 |
| III.1.1 Rôle dans la lutte contre le stress oxydant | 62 |
| III.1.2 Rôle dans la réparation des protéines et la régulation de leurs fonctions | 63 |
| III.1.2.1 Calmoduline | 63 |
| III.1.2.2 Ffh | 64 |
| III.1.3 Rôle dans le vieillissement cellulaire | 64 |
| III.1.4 Rôle dans la virulence de bactéries pathogènes | 65 |
| III.2 Distribution tissulaire et localisation subcellulaire chez les mammifères | 66 |
| III.2.1 MsrA | 66 |
| III.2.2 MsrB | 67 |
| III.3 Organisation génomique des Msr | 67 |
| III.4 Propriétés biochimiques, structurales et enzymatiques des Msr | 68 |
| III.4.1 Mécanisme catalytique | 68 |
| III.4.2 Sous-classes de Msr | 69 |
| III.4.2.1 MsrA | 69 |
| III.4.2.2 MsrB | 72 |
| III.4.3 Structure tridimensionnelle | 74 |
| III.4.3.1 MsrA | 74 |
| III.4.3.2 MsrB | 77 |
| III.4.4 Stéréosélectivité et spécificité de substrat | 78 |
| OBJECTIFS | 80 |

RESULTATS

| | |
|---|-----------|
| Partie I : Caractérisation cinétique des trois étapes du mécanisme de la MsrA de <i>N. meningitidis</i> | 82 |
| I.1 Techniques de cinétiques rapides | 82 |
| I.1.1 Mélange rapide résolu en temps ("Quenched-flow") | 82 |
| I.1.2 Spectrofluorimétrie en flux interrompu ("Stopped-flow") | 83 |
| I.2 Caractérisation cinétique du mécanisme de la MsrA de <i>N. meningitidis</i> | 84 |
| I.2.1 Etape réductase et étape de formation du pont disulfure. Mise en évidence de l'étape cinétiquement limitante du mécanisme | 84 |
| I.2.2 Paramètres cinétiques de l'étape réductase | 85 |
| I.2.3 Etape de réduction de la MsrA par la Trx | 86 |
| I.2.4 Conclusion | 88 |

| | |
|--|------------|
| I.3 Détermination du potentiel rédox de la MsrA | 89 |
| I.3.1 Equilibre rédox MsrA / Trx | 89 |
| I.3.2 Conclusion..... | 91 |
| I.5 Publication 1 | 93 |
| I.6 Publication 2 (Revue) | 99 |
| | |
| Partie II : Mécanisme de l'étape de réduction du substrat par la MsrA de <i>N. meningitidis</i> et mise en évidence des acides aminés impliqués dans la catalyse. | 107 |
| II.1 Activation de la Cys51 dans le complexe MsrA/substrat | 108 |
| II.1.1 Détermination du pKa des Cys51 et 198 dans l'enzyme libre | 108 |
| II.1.2 Détermination des pKapp gouvernant l'étape MetSO réductase | 108 |
| II.2 Rôle des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans la catalyse | 109 |
| II.3 Publication 3 | 111 |
| II.4 Etude complémentaire de l'étape réductase par spectrométrie de masse et marquage isotopique | 127 |
| II.4.1 Synthèse et purification de l'AcMetSO ¹⁸ NHMe..... | 127 |
| II.4.2 Caractérisation par spectrométrie de masse de l'intermédiaire acide sulfénique . | 128 |
| II.4.3 Caractérisation de l'acide sulfénique par marquage isotopique de substrat ou de solvant..... | 129 |
| II.5 Scénario proposé pour la catalyse de l'étape réductase | 130 |
| | |
| Partie III : Interaction Msr/Trx : identification du pont disulfure intermoléculaire transitoire formé lors de la réduction de la MsrA de <i>N. meningitidis</i> par la Trx | 132 |
| III.1 Caractérisation cinétique | 133 |
| III.2 Caractérisation par spectrométrie de masse | 134 |
| III.3 Conclusion | 135 |
| III.4 Publication 4 | 137 |

DISCUSSION et PERSPECTIVES

| | |
|--|------------|
| Partie I : Formation de l'intermédiaire acide sulfénique | 152 |
| Partie II : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance du substrat | 160 |
| Partie III : Formation de l'intermédiaire pont disulfure | 162 |
| Partie IV : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans l'interaction entre MsrA et Trx. | 164 |

ANNEXES

| | |
|-----------------------|------------|
| Annexe 1 | 169 |
| Annexe 2 | 178 |
| Annexe 3 | 182 |

MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|------------|
| I Matériel biologique et milieux de culture | 208 |
| I.1 Souches bactériennes | 208 |
| I.2 Vecteurs plasmidiques | 208 |
| I.3 Milieux de culture bactérienne | 208 |
| I.3.1 Milieu riche LB | 209 |
| I.3.2 Milieu minimum M9 | 209 |
| I.3.3 Milieu riche SOB..... | 209 |
| II Techniques de génie génétique | 209 |
| II.1 Préparation de l'ADN plasmidique..... | 209 |
| II.1.1 La minipréparation | 209 |
| II.1.2 La maxipréparation | 209 |
| II.1.3 Séquençage de l'ADN double brin | 210 |
| II.1.4 Préparation et transformation des bactéries compétentes | 210 |
| II.2 Mutagenèse du matériel plasmidique | 211 |
| III Production et purification des MsrA de <i>N. meningitidis</i> | 211 |
| III.1 Production des protéines recombinantes | 211 |
| III.2 Purification des MsrA..... | 212 |
| III.2.1 Désintégration des cellules | 212 |
| III.2.2 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium..... | 212 |
| III.2.3 Filtration sur gel..... | 213 |
| III.2.4 Chromatographie d'échange d'anions | 213 |
| III.2.5 Concentration et conservation des protéines | 213 |
| III.3 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées..... | 213 |
| III.3.1 Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes | 213 |
| III.3.2 Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes | 214 |
| IV Préparation des substrats sulfoxydes | 214 |
| V Techniques d'étude enzymatique | 215 |
| V.1 Récapitulatif des procédures décrites dans les publications et manuscrits | 215 |
| V.2 Equilibre rédox et séparation des formes réduites et oxydée à l'état disulfure des MsrA et Trx..... | 216 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 218 |

Abréviations

| | |
|-------------------------|--|
| <i>B. subtilis</i> | : <i>Bacillus subtilis</i> |
| <i>B. taurus</i> | : <i>Bos taurus</i> |
| <i>E. faecalis</i> | : <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>E. chrysanthemii</i> | : <i>Erwinia chrysanthemii</i> |
| <i>E. coli</i> | : <i>Escherichia coli</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. furiosus</i> | : <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| <i>R. capsulatus</i> | : <i>Rhodobacter capsulatus</i> |
| <i>R. sphaeroides</i> | : <i>Rhodobacter sphaeroides</i> |
| <i>X. campestris</i> | : <i>Xanthomonas campestris</i> |
| BSOR | : biotine sulfoxyde réductase |
| DO | : densité optique |
| DMS | : diméthyle sulfure |
| DMSDH | : diméthyle sulfure déshydrogénase |
| DMSOR | : diméthyle sulfoxyde réductase |
| DMSP | : diméthylesulfopropionate |
| DTNB | : dithionitrobenzoate |
| DTT | : dithiothréitol |
| EDTA | : acide éthylène diamide tétraacétique |
| EXAFS | : extended x-ray absorption fine structure |
| FAD | : flavine adénine dinucléotide |
| FAO | : formes activées de l'oxygène |
| FPLC | : chromatographie liquide moyenne pression |
| GFP | : protéine fluorescente verte |
| Gpx | : glutathion peroxydase |
| GSH | : glutathion (forme réduite) |
| HPLC | : chromatographie liquide haute pression |
| IAM | : iodoacétamide |
| IPTG | : isopropylthiogalactoside |
| IR | : infrarouge |
| ITC | : calorimétrie de titration isothermique |
| k_{cat} | : constante catalytique |
| K_M | : constante de Michaélis |
| k_{obs} | : constante de vitesse observée |
| k_{obsmax} | : constante de vitesse observée maximale |
| $k_{sulfoxyde}$ | : constante de vitesse de réduction du sulfoxyde |
| k_{SS} | : constante de vitesse de formation du pont disulfure |
| $K_{sulfoxyde}$ | : constante apparente d'affinité pour le sulfoxyde (étape réductase) |
| K_S | : constante apparente d'affinité |
| K_{Trx} | : constante apparente d'affinité pour la Trx |
| LB | : Luria Bertani |
| MetSO | : méthionine sulfoxyde |
| MGD | : molybdoptérine guanine dinucléotide |
| MsrA B | : méthionine sulfoxyde réductase A et B |
| NAD(P)H | : nicotinamide dinucléotide (phosphate), forme réduite |
| NBD-Cl | : 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole |

Abréviations

| | |
|------------------|--|
| NHase | : nitrile hydratase |
| Nox | : NADH oxydase |
| Npx | : NADH peroxydase |
| PAGE | : gel d'électrophorèse en polyacrylamide |
| 2PDS | : 2, 2' dithiodipyridine |
| <i>Pfu</i> | : ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| Prx | : peroxyrédoxine |
| PTP | : protéine tyrosine phosphatase |
| RMN | : résonance magnétique nucléaire |
| RX | : rayons X |
| SDS | : sodium dodécyle sulfate |
| SOD | : superoxyde dismutase |
| TFA | : acide trifluoroacétique |
| TNB ⁻ | : thionitrobenzoate |
| Tris | : N-tris(hydroxyméthyle)éthyle-2-aminométhanesulfonate |
| Trx | : thiorédoxine |

Introduction

Mon travail de thèse concerne la caractérisation biochimique et enzymatique des méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Leur mécanisme catalytique fait appel à un mécanisme réactionnel original faisant intervenir deux fonctions chimiques clés : la fonction sulfoxyde ($R_2S=O$) portée par le substrat et la fonction acide sulfénique ($RS-OH$) formée transitoirement sur la cystéine catalytique du site actif des Msr. La première partie de l'introduction sera consacrée à la présentation des principaux aspects de la chimie et de la biochimie des fonctions sulfoxyde et acide sulfénique. La seconde partie de l'introduction sera consacrée aux mécanismes d'oxydation des méthionines et aux conséquences que peut avoir cette oxydation sur la fonction des protéines ainsi modifiées. Enfin, la troisième et dernière partie de l'introduction sera dédiée à la présentation synthétique des données biologiques, biochimiques, enzymatiques et structurales concernant les Msrs, disponibles au début et au cours de ma thèse.

PARTIE I : LA CHIMIE DES SULFOXYDES ET DES ACIDES SULFENIQUES

I.1 La fonction sulfoxyde

L'oxydation formelle d'un thioether R_2S par un atome d'oxygène conduit à la fonction sulfoxyde, $R_2S=O$, l'addition d'un deuxième oxygène aboutissant à la fonction sulfone $R_2S(=O)_2$. Les méthodes de synthèse des sulfoxydes reposent principalement sur des protocoles d'oxydation de thioether par différents composés tels que des peroxydes, des peracides, l'ozone, l'acide nitrique et d'autres oxydes d'azote ou encore l'acide chromique (Szmant, 1961).

I.1.1 Structure et réactivité

I.1.1.1 Aspects structuraux de la fonction sulfoxyde

Le diméthyle sulfoxyde (DMSO) est le sulfoxyde modèle prototype. Plusieurs structures tridimensionnelles du DMSO ont été résolues par cristallographie. La géométrie adoptée par le DMSO dans ces structures est tétraédrique et caractérisée par une distance moyenne entre l'atome de soufre et l'atome d'oxygène de 1,49 Å, un angle C-S-O de 107° et un angle C-S-C

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

de 100°. Une étude statistique de 119 structures de sulfoxydes non coordonnés conduit à une longueur de liaison S-O « référence » de 1,492 Å (Calligaris, 2004).

Du fait de la présence de la paire d'électrons non appariés sur le soufre de la fonction sulfoxyde, l'atome de soufre devient un centre asymétrique quand ses deux substituants sont chimiquement différents. Deux stéréoisomères *R* et *S* sont alors à considérer.

La nature de la liaison entre le soufre et l'oxygène dans la fonction sulfoxyde et la fonction sulfone a été un sujet majeur de controverse. En effet, l'écriture formelle de la double liaison covalente de la fonction sulfoxyde est en violation avec la règle de l'octet, en faisant passer le nombre d'électrons de valence de l'atome de soufre de 8 à 10. Pour cette raison, une structure a été proposée dans laquelle l'oxygène n'est lié au soufre que par une seule paire d'électrons partagés, provenant du soufre. Cette liaison impliquant la perte d'un électron par le soufre et le gain de cet électron par l'oxygène, une charge positive est alors portée par l'atome de soufre et une charge négative est portée par l'oxygène. Ainsi, cette liaison pourrait être décrite comme la combinaison d'une liaison covalente simple et d'une liaison ionique. Ce type de liaison a été appelé liaison semi-polaire (Price et Oae, 1962). Un équilibre de résonance entre les structures double liaison covalente et liaison semi-polaire peut être considéré (Figure 1).

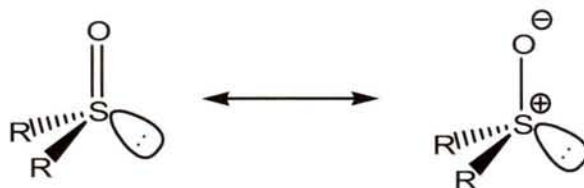


Figure 1 : Equilibre entre les deux formes limites de résonance de la fonction sulfoxyde. A gauche, la forme double liaison covalente, à droite la forme liaison semi-polaire.

De nombreuses études expérimentales, puis théoriques ont été entreprises afin de caractériser les propriétés physiques de la liaison S=O.

La majorité des données expérimentales acquises est en faveur d'une structure hybride entre les deux formes de résonance, dominée par une forte contribution de la forme semi-polaire. La longueur de la liaison S-O de 1,492 Å observée dans les sulfoxydes est plus courte que la distance de 1,57 Å attendue pour une liaison simple S-O, suggérant un caractère de double liaison (Cotton, 1988 ; Kucsman et Kapovits, 1985). La spectroscopie par rayons X a mis en évidence la polarisation des sulfoxydes et le développement d'une charge positive sur l'atome

de soufre (Davies, 1981). La mesure d'un moment dipolaire de 3,96 D conforte cette observation du caractère ionique des sulfoxydes (Dreizler et Dendle, 1964). Enfin, la force de la liaison S-O, calculée à partir de spectres IR, est en faveur d'une liaison semi-polaire.

Plusieurs études de chimie théorique, utilisant en particulier l'approche quantique *atoms in molecules* (AIM), ont permis de rationaliser ces données expérimentales en montrant clairement que la liaison S-O des sulfoxydes est décrite comme la contribution d'une liaison covalente σ partiellement ionique et fortement polarisée, et d'une liaison π presque entièrement ionique. La densité de charge dans cette liaison π étant portée à plus de 90 % par l'atome d'oxygène, la participation de la liaison π peut être également représentée comme une paire d'électrons non partagée portée par l'oxygène. Cette représentation conduit à décrire la liaison sulfoxyde comme une simple liaison σ polarisée, dont la force dépend principalement des interactions électrostatiques. (Cioslowski et Mixon, 1993 ; Dobado *et al.*, 1999 ; Reed et Schleyer, 1990). Les paramètres géométriques calculés à partir de cette description de la fonction sulfoxyde sont en excellent accord avec les mesures expérimentales, en particulier celles concernant la longueur de la liaison S-O, son moment dipolaire et sa fréquence de vibration IR.

Des données structurales relatives à des sulfoxydes engagés dans des liaisons H et à des sulfoxydes protonés ont pu être obtenues par les mêmes techniques. D'une longueur de 1,492 Å, la liaison S-O passe à 1,513 Å pour un sulfoxyde engagé dans une liaison H et à 1,587 Å pour un sulfoxyde protoné. La coordination de l'atome d'oxygène d'un sulfoxyde par un métal conduit à une longueur moyenne de liaison de 1,527 Å (Calligaris, 2004).

I.1.1.2 Réactivité chimique des sulfoxydes

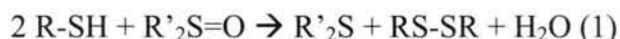
I.1.1.2.1 Réduction des sulfoxydes en sulfures

A la différence des sulfones, les sulfoxydes peuvent être facilement réduits en sulfures correspondants par divers composés : zinc en conditions acides, ions bisulfite ou titane, hydrure de lithium aluminium, butyle lithium. Dans certain cas, le chauffage à 100°C en présence d'alcool et en conditions acides peut suffire à réduire une fonction sulfoxyde en sulfure (Szmant, 1961).

Une autre voie repose sur la réduction de sulfoxydes par les thiols, ces derniers étant oxydés sous forme de disulfure. Cette voie de synthèse de disulfure réalisée en conditions expérimentales douces s'est révélée particulièrement intéressante en terme de rendement de synthèse et de facilité de purification des produits de la réaction.

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

En 1964, les travaux de Wallace, *et al*, en absence d'oxygène et en solvant non aqueux, ont conduit à proposer un mécanisme réactionnel, la stœchiométrie de la réaction étant la suivante (Réaction 1).



L'étude cinétique de la réaction chimique entre sulfoxydes et thiols a permis de montrer que celle-ci obéit à un comportement cinétique de pseudo-premier ordre, en présence d'excès d'un des deux réactifs et que la vitesse et l'énergie d'activation de la réaction sont dépendantes du pKa des thiols. Ces résultats ont conduit à proposer un mécanisme de réduction des sulfoxydes par les thiols passant par l'attaque nucléophile du thiol (probablement sous forme thiolate) sur le soufre de la fonction sulfoxyde, entraînant la formation d'un intermédiaire covalent de type sulfurane. Cette étape serait cinétiquement limitante, l'intermédiaire sulfurane réagissant très rapidement avec un deuxième thiol (Figure 2). En effet, il a été impossible de caractériser la présence de cet intermédiaire au cours de la réaction (Wallace, 1964 ; Wallace et Mahon, 1964).

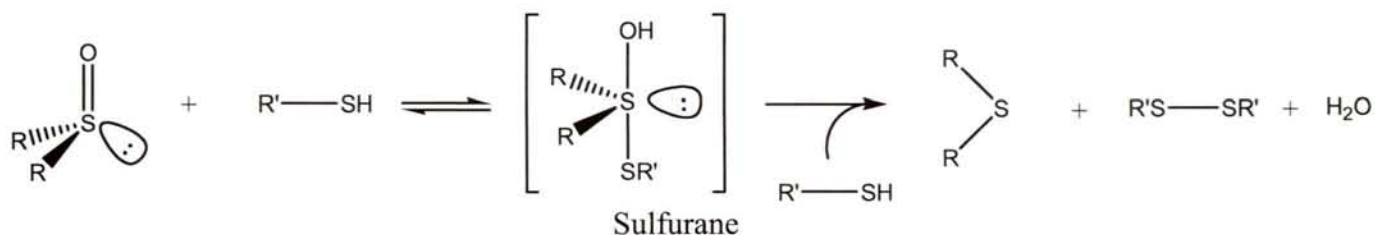


Figure 2 : Mécanisme de réduction d'une fonction sulfoxyde par des thiols. (D'après Wallace et Mahon, 1964).

Il est important de noter que, sur la base des résultats expérimentaux obtenus, cette étude ne permet pas d'exclure l'implication d'un intermédiaire sulfénate (R-S-O^-) dans le mécanisme de réduction des sulfoxydes.

Ces études ont également montré que la réduction des sulfoxydes par les thiols peut être catalysée à la fois par un acide (acide acétique) ou par une base (amine aliphatique). Il a été proposé que l'effet catalytique observé en présence d'amines aliphatiques soit dû à l'augmentation du caractère ionique de la liaison soufre-hydrogène du thiol via son interaction avec l'amine. L'effet catalytique observé en présence d'un acide a, quant à lui, été interprété comme résultant de la protonation initiale de la fonction sulfoxyde avant l'attaque du thiolate (Wallace et Mahon, 1965).

L'intérêt porté à l'oxydation de thiols en disulfures ainsi obtenus *via* la réduction de sulfoxydes a abouti à la mise au point de catalyseurs basé sur la chimie du rhénium^V du type $\text{Re}(\text{O})\text{Cl}_3(\text{PPh}_3)_2$. Ce type de catalyseurs à activité oxotransférase augmente nettement l'efficacité de la réaction à température ambiante. Le mécanisme catalytique proposé implique la coordination de l'oxygène du sulfoxyde par l'atome de rhénium puis l'attaque nucléophile du thiol sur ce complexe, aboutissant à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique coordonné (Abu-Omar et Khan, 1998 ; Arterburn et Nelson, 1996 ; Arterburn *et al.*, 1997).

I.1.1.2.2 Oxydation des sulfoxydes en sulfones

L'oxydation d'une fonction sulfoxyde en fonction sulfone est réalisable par les mêmes composés oxydants que ceux utilisés pour oxyder un sulfure en sulfoxyde (Szmant, 1961).

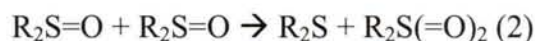
I.1.1.2.3 Constante d'acidité des sulfoxydes

L'oxygène de la fonction sulfoxyde est un bon accepteur de liaison H (Renault et Le Questel, 2004). Cette propriété explique les excellentes capacités de solvation du DMSO et, par ailleurs, est indicative du caractère polaire de la liaison S-O de la fonction sulfoxyde.

Cette capacité de la fonction sulfoxyde à accepter des liaisons H peut être reliée à son comportement de base faible. La valeur du $\text{p}K_a$ de la fonction sulfoxyde de différents méthyle sulfoxydes a été déterminée expérimentalement par titration dans l'acide sulfurique ou perchlorique aqueux, le degré de protonation du sulfoxyde étant mesuré par RMN et/ou par spectroscopie UV dans le cas de sulfoxydes aromatiques. Les $\text{p}K_a$ des différents sulfoxydes testés sont extrêmement bas et se situent tous entre -2 et -5 (Landini *et al.*, 1969).

I.1.1.2.4 Dismutation des sulfoxydes

L'éventualité d'une réaction de dismutation entre deux fonctions sulfoxydes a été proposée pour expliquer l'impossibilité d'isoler un disulfoxyde de 2,5-diphényl-1,4-dithiadiène. Le mécanisme proposé pour cette dismutation implique l'association de deux fonctions sulfoxydes et aboutit au transfert de l'oxygène du premier sulfoxyde sur le soufre du deuxième sulfoxyde, conduisant au sulfure et à la sulfone correspondante (Réaction 2) (Szmant, 1961).



I.1.1.2.5 Caractère nucléophile des sulfoxydes

Malgré la charge partielle positive portée par l'atome de soufre, la présence de la paire d'électrons libres portée par le soufre de la fonction sulfoxyde lui confère un caractère nucléophile. Cette nucléophilie s'exprime en particulier au travers de la capacité des sulfoxydes à échanger leur atome d'oxygène dans l'acide sulfurique concentré. Un autre exemple réside dans la possibilité d'alkyler l'atome de soufre en présence d'un composé halogéné électrophile (Price et Oae, 1962).

I.1.2 Sulfoxyde naturel

La fonction sulfoxyde est peu présente au sein des molécules du vivant. Quelques exemples seront présentés ici.

I.1.2.1 Le sulforaphène et composés analogues

La première molécule naturelle isolée dont le centre asymétrique ne soit pas un carbone fut un sulfoxyde : le sulforaphène (Figure 3). Le sulforaphane, un isothiocyanate analogue au sulforaphène, isolé initialement à partir du brocoli, possède une activité anticarcinogène (Zhang *et al.*, 1992). De nombreuses études ont été entreprises dans le but de comprendre les mécanismes d'actions du sulforaphane. Il a ainsi pu être montré en particulier que cette molécule est un puissant inducteur des enzymes de détoxification de phase II (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002), génère une apoptose induite par le stress oxydant (Singh *et al.*, 2005), et inhibe les histone déacétylases (Myzak *et al.*, 2006) ainsi que la polymérisation de la tubuline (Jackson et Singletary, 2004). La fonction sulfoxyde n'est pas essentielle à l'activité biologique de ce type d'isothiocyanates.



Figure 3 : Structure du sulforaphène (A) et du sulforaphane (B).

I.1.2.2 Les S-alkyle(cène) cystéine sulfoxydes

La biosynthèse des arômes chez l'oignon, l'ail et les autres plantes du genre *Alliums* repose sur la chimie de composés soufrés volatils dont les précurseurs sont des S-alkyle(cène) cystéine sulfoxydes (Rose *et al.*, 2005). Parmi ces sulfoxydes, on trouve principalement la S-allyle cystéine sulfoxyde (alliine), la S-*trans*-1-propényle cystéine sulfoxyde (isoalliine), la S-méthyle cystéine sulfoxyde (methiine) et la S-propyle cystéine sulfoxyde (propiine). Ces précurseurs relativement stables et non odorants sont pris en charge par deux enzymes : l'alliinase va cliver ces précurseurs et libérer un acide sulfénique. Ces composés très instables (voir chapitre suivant) vont soit se condenser en thiosulfonates, soit être transformés par la lachrymatory-factor synthase pour générer le propanethial S-oxyde (Imai *et al.*, 2002), qui n'est autre que le facteur responsable de l'irritation des yeux provoquée lors de la découpe d'un oignon (Figure 4).

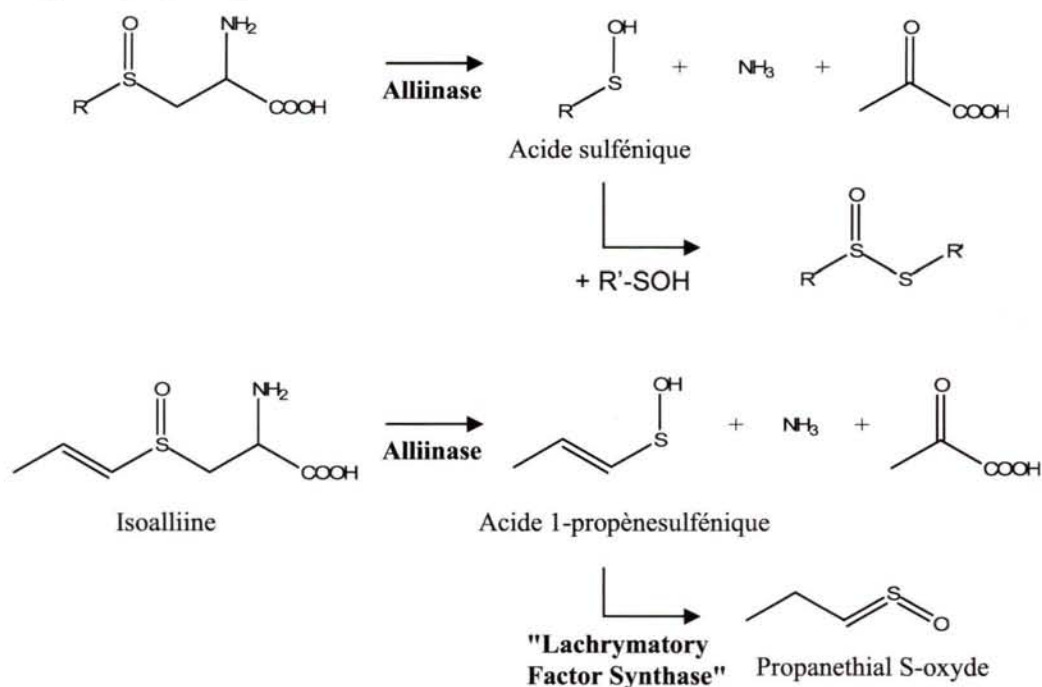


Figure 4 : Voie de biosynthèse des arômes chez les plantes du genre *Allium*. L'alliinase catalyse la dégradation des alkyle Cys sulfoxydes en ammoniac, pyruvate et acide sulfénique. Ces acides sulféniques vont se condenser pour former différents thiosulfonates. Dans le cas de l'isoalliine, l'acide sulfénique correspondant est immédiatement utilisé par la "Lachrymatory Factor Synthase" pour produire le propanethial S-oxyde ou facteur lachrymal (D'après Rose *et al.*, 2005)

I.1.2.3 Les polythéonamides A et B

De manière plus anecdotique, deux polypeptides linéaires hautement cytotoxiques ont été isolés de l'éponge *Theonella swinhoei*, et nommés polythéonamides A et B. Ces peptides présentent une structure très particulière, caractérisée par la présence d'acides aminés modifiés tel que la *tert*-leucine, la β -hydroxyvaline, la γ -*N*-méthylasparagine et une β - β -diméthyle méthionine sulfoxyde. Seule la stéréochimie de la fonction sulfoxyde différencie ces deux polythéonamides (Hamada *et al.*, 2005). Il a été montré que la polythéonamide B est capable de s'insérer dans une bicouche lipidique et d'y former des canaux présentant une spécificité vis-à-vis des cations monovalents (Andersen et Koeppe, 1992).

I.1.2.4 La biotine sulfoxyde

La biotine, ou vitamine B8 (ou H), est un coenzyme indispensable à l'activité de plusieurs carboxylases. La biotine est liée *via* la formation d'une liaison amide entre son groupement carboxyle et le groupement ϵ -amino d'une lysine de l'enzyme et joue un rôle essentiel dans le mécanisme catalytique de ces carboxylases, en tant que transporteur de carboxyle. La présence d'un atome de soufre sur la biotine la rend sensible à l'oxydation. Le premier produit d'oxydation formé par action du peroxyde d'hydrogène sur la biotine est la biotine sulfoxyde. Les deux stéréoisomères de la fonction sulfoxyde (*d*-sulfoxyde et *l*-sulfoxyde) sont produits lors de cette oxydation, avec un rapport de 4/1 en faveur de l'isomère *d*- (Melville *et al.*, 1954). Il a été montré que la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus arabinosis* en présence de la biotine *d*-sulfoxyde est identique à celle en présence de la biotine alors qu'elle est fortement ralentie en présence de la biotine *l*-sulfoxyde. Ces résultats suggéraient l'existence d'un système enzymatique capable de réduire spécifiquement la biotine *d*-sulfoxyde en biotine chez la levure (Figure 5) (Melville *et al.*, 1954). Le gène codant l'enzyme responsable de cette réduction, appelée Biotine Sulfoxyde Réductase (BSOR), a été caractérisée chez *Escherichia coli* (Dykhuisen, 1973).

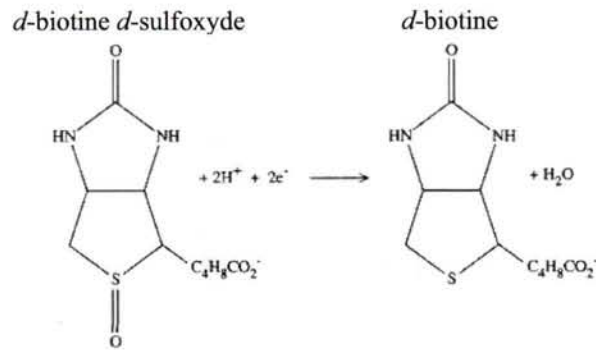


Figure 5 : Réaction catalysée par la Biotine Sulfoxyde Réductase (d'après Temple *et al.*, 2000).

1.1.2.5 Le DMSO

Le diméthyle sulfure (DMS) est considéré comme le composé soufré réduit majoritaire dans l'atmosphère, provenant de la surface des océans (Andreae, 1997), et représente plus de 20 % des émissions soufrées globales (Liss *et al.*, 1997). Dans l'atmosphère, la présence de DMS peut avoir un effet significatif sur le climat *via* la formation d'aérosols qui augmentent la réflectance des nuages et ainsi diminuent la quantité de lumière solaire atteignant la surface terrestre. La source principale de DMS est le diméthylesulfoniopropionate (DMSP), produit par les algues marines. Seule une petite fraction du DMS produit dans les océans passe dans l'atmosphère, les bactéries « piégeant » près de 75 % du DMSP et du DMS produit (Kiene et Linn, 2000). Une des voies de transformation du DMS est son oxydation en DMSO. Récemment, il a été montré que les bactéries pourpres phototrophes comme *Rhodovulum sulfidiphilum* peuvent utiliser, dans certaines conditions, le DMS comme donneur d'électrons et rejeter du DMSO comme produit de cette oxydation (Hanlon *et al.*, 1994). Le DMSO peut également provenir directement du clivage du DMSP par les algues marines. Le DMSO est détecté dans les océans à des niveaux comparables au DMSP.

Par ailleurs, de nombreux micro-organismes sont capables de se développer en absence d'oxygène grâce à des mécanismes de fermentation ou de respiration utilisant des accepteurs d'électrons alternatifs, le DMSO pouvant être l'un de ces accepteurs. La biochimie et la génétique de la respiration du DMSO ont été caractérisées ces vingt dernières années, plus particulièrement chez *E. coli*, chez les bactéries marines du genre *Shewanella* et chez les bactéries pourpres phototrophes *Rhodobacter sphaeroides* et *R. capsulatus* (Voir paragraphe 1.1.3.1 et pour revue, voir McCrindle *et al.*, 2005).

I.1.3 Enzymologie de la formation et de la réduction des sulfoxydes

Dans le paragraphe précédent, il a été souligné l'implication de la fonction sulfoxyde dans plusieurs mécanismes biologiques et la mise en évidence de l'existence de systèmes enzymatiques impliqués dans la formation ou la réduction de cette fonction sulfoxyde. Le rôle de ces enzymes et les différents types de catalyses chimiques utilisés par ces protéines vont maintenant être abordés. La description détaillée des Méthionine Sulfoxyde Réductases sera abordée dans la partie III de cette introduction.

Trois enzymes catalysant la réduction de sulfoxyde en sulfure ou, inversement, l'oxydation de sulfure en sulfoxyde ont été étudiées de manière particulièrement détaillée. Il s'agit de la Diméthyle Sulfoxyde Réductase (DMSOR), la Biotine Sulfoxyde Réductase (BSOR) et la Diméthyle Sulfure Déshydrogénase (DMSDH). Ces trois protéines appartiennent à la superfamille des enzymes à cofacteur molybdène et plus particulièrement à la famille des DMSOR.

La superfamille des enzymes à cofacteurs molybdène rassemble un groupe de protéines catalysant toutes le transfert d'un atome d'oxygène mais présentant des différences tant au niveau de leur structure que de celle du cofacteur molybdène. La caractéristique commune à toutes les enzymes de cette superfamille est de posséder un mécanisme catalytique reposant sur le cycle redox de l'atome de molybdène entre son état oxydé Mo^{VI} et son état réduit Mo^{IV} . Ces enzymes catalysant des réactions redox à deux électrons, il est probable que l'atome de molybdène subisse lui aussi un changement de son état d'oxydation via un mécanisme à deux électrons lors de l'étape de transformation du substrat en produit. Le second centre redox impliqué dans la régénération du molybdène à son état d'oxydation initial étant souvent un centre redox à un électron (centre Fe-S ou hème), ce retour à l'état initial doit se faire *via* une séquence de deux transferts à un électron, impliquant la génération d'un intermédiaire Mo^{V} . Quatre familles ont été définies sur la base des similarités de séquences : les familles des DMSOR, des Xanthine Oxydases, des Sulfite Oxydases et de l'Aldéhyde Ferredoxine Oxydoréductase (Kisker *et al.*, 1997 ; Kisker *et al.*, 1998).

Au sein de cet ensemble, les membres de la famille des DMSOR partagent une structure tertiaire et une organisation de domaines très proches et sont caractérisés notamment par la présence d'une forme de cofacteur molybdène appelée molybdoptérine guanine dinucléotide (MGD) (Figure 6). Cette famille d'enzyme n'est présente que chez les bactéries

et inclus entre autres la DMSOR, les Nitrate Réductases, plusieurs Formate Déshydrogénases et la Pyrogallol-phloroglucinol Transhydroxylase.

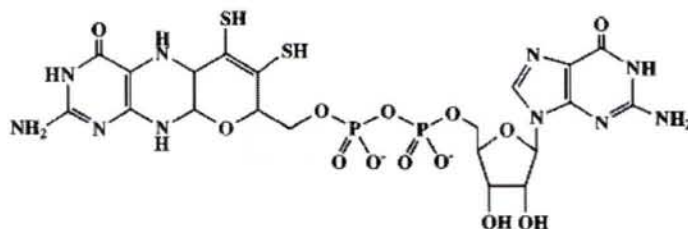


Figure 6 : Structure du cofacteur ptérine guanosine dinucléotide présent dans la DMSOR. Le groupement dithiolène porté par la ptérine permet la coordination de l'atome de molybdène (d'après Kisker *et al.*, 1997).

I.1.3.1 Diméthyle Sulfoxyde Réductase (DMSOR)

I.1.3.1.1 Organisation de la chaîne respiratoire

Cette enzyme catalyse la réduction du diméthyle sulfoxyde en diméthyle sulfure (DMS) et a été caractérisée chez *E. coli*, *R. sphaeroides* et *R. capsulatus*.

Chez *E. coli*, la DMSOR (DmsABC) est une réductase respiratoire terminale membranaire, indispensable lors de la croissance anaérobie des cellules en présence de DMSO. Le DMSO est alors utilisé en tant qu'accepteur terminal d'électrons. Les électrons sont transférés à la DMSOR *via* le ménaquinol (Wissenbach *et al.*, 1990).

DmsABC est une enzyme homotrimérique comprenant deux sous-unités externes à la membrane (DmsA et B), liées à DmsC. DmsC (31 kDa) est la sous-unité membranaire impliquée dans la fixation et l'oxydation à deux électrons du ménaquinol (Geijer et Weiner, 2004 ; Sambasivarao et Weiner, 1991 ; Zhao et Weiner, 1998). DmsB (23 kDa) est la sous-unité faisant le lien entre DmsC et DmsA et contient quatre centres [4Fe-4S] (Cammack et Weiner, 1990). Enfin, DmsA (86 kDa) est la sous-unité catalytique portant l'activité DMSO réductase et contenant le cofacteur MGD.

Le flux d'électrons est supposé procéder à partir du ménaquinol réduit (MQH₂), oxydé au niveau de DmsC. Les électrons sont ensuite transportés *via* successivement deux centres Fe-S de DmsB pour être acceptés par le cofacteur MGD qui les transférera au DMSO lors de sa réduction en DMS. L'action de l'enzyme permet la formation d'un gradient transmembranaire de protons, utilisé pour la synthèse d'ATP (Figure 7).

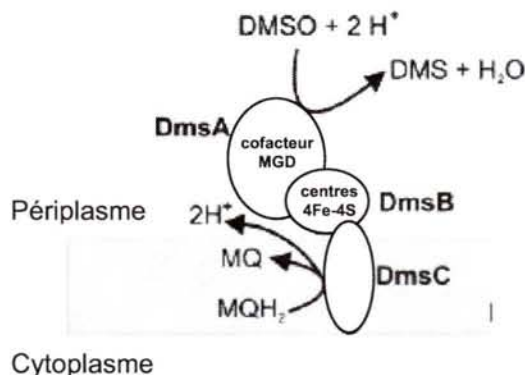


Figure 7 : Représentation schématique de l'organisation des trois sous-unités de la DMSOR d'*E. coli*. MQ : ménaquinol (d'après McCrindle *et al.*, 2005).

Chez *Rhodobacter*, la DMSOR est une enzyme monomérique soluble périplasmique de 85 kDa, ne contenant pas d'autre centre redox que son cofacteur molybdène. De manière similaire au cas d'*E. coli*, cette enzyme est impliquée dans un mécanisme respiratoire utilisant préférentiellement le DMSO mais également, à la différence de la DMSOR d'*E. coli*, la triméthylamine oxyde (TMAO) (McEwan *et al.*, 1983 ; McEwan *et al.*, 1985). Les électrons nécessaires à la réduction proviennent de l'ubiquinol cellulaire et sont transférés à la réductase par le cytochrome c pentahémique membranaire DorC (Shaw *et al.*, 1999).

I.1.3.1.2 Structure et mécanisme catalytique

La DMSOR a fait l'objet d'études extrêmement détaillées tant au niveau structural que biochimique et enzymatique dans le but d'élucider son mécanisme réactionnel.

Du fait de la simplicité de sa structure par rapport à la DMSOR d'*E. coli*, et de l'absence de cofacteur autre que le MGD, la DMSOR des bactéries du genre *Rhodobacter* se présente comme le modèle le plus favorable à une caractérisation biochimique et biophysique approfondie. Plusieurs études extrêmement détaillées ont été réalisées à l'aide d'une très large gamme de techniques expérimentales (cristallographie, EXAFS, Raman de résonance, RPE, absorption UV/visible, Protein Film Voltametry). La grande majorité des travaux réalisés font donc référence à cette enzyme.

La première structure de DMSOR à être résolue par radiocristallographie fut celle de l'enzyme de *R. sphaeroides*, sous formes oxydée et réduite (Schindelin *et al.*, 1996), suivie de

deux structures de la DMSOR de *R. capsulatus*, à une résolution respectivement de 1,88 Å et 1,82 Å (McAlpine *et al.*, 1997 ; Schneider *et al.*, 1996).

Les DMSOR sont constituées de quatre domaines et comprennent approximativement 40 % d'hélices α et 20 % de brins β (Figure 8A). Le site actif de la DMSOR contient deux cofacteurs MGD qui peuvent coordiner l'atome de Mo *via* leurs deux groupements dithiolènes. Ces deux cofacteurs adoptent un positionnement tête-bêche formant une structure allongée (Figure 8B), fortement stabilisée par près de 45 liaisons H.

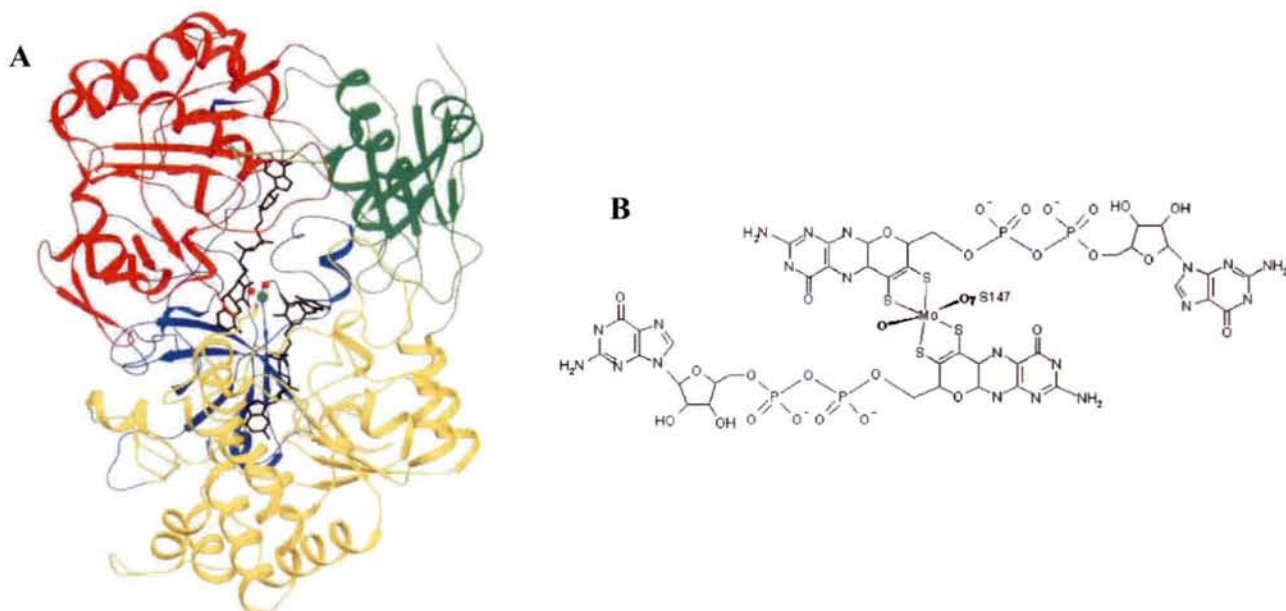


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la DMSOR de *R. capsulatus* et représentation de la sphère de coordination de l'atome de molybdène. A) Architecture de la DMSOR et localisation du site actif. Les quatre domaines de l'enzyme sont différenciés par leur couleur. Les deux cofacteurs MGD sont représentés en noir, le molybdène est représenté par la boule verte et ses deux ligands sont représentés en rouge (d'après McAlpine, 1997), B) Structure du centre molybdène de la DMSOR. En plus des deux groupements dithiolène provenant des cofacteurs MGD, le molybdène est coordonné par un ligand mono-oxo et la chaîne latérale de la Ser147 (d'après McCrindle *et al.*, 2005).

Bien que les trois premières structures de DMSOR décrites aient un très fort pourcentage d'identité de séquence (>70 %), la conformation exacte du site actif et l'état de coordination de l'atome de molybdène ont été fortement controversés. Grâce à la résolution de nouvelles structures à plus haute résolution (Bray *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000), il est maintenant acquis que dans la forme oxydée catalytiquement compétente de la DMSOR, six ligands sont présents dans la sphère de coordination du Mo^{VI} : les quatre thiolates des deux cofacteurs MGD, le groupement hydroxyle de la Ser147 et un atome d'oxygène formant un

ligand mono-oxo, en accord avec les données obtenues par spectroscopie Raman de résonance (Bell *et al.*, 2001 ; Garton *et al.*, 1997 et EXAFS George *et al.*, 1999).

Le cycle réactionnel catalysé par la DMSOR peut être divisé en deux demi-réactions ou étapes : 1) lors de l'étape d'oxydation, la forme réduite Mo^{IV} de la DMSOR forme un complexe michaelien avec le substrat, précédant le transfert de l'atome d'oxygène du DMSO vers l'atome de molybdène. Ce transfert aboutit à un complexe entre la forme oxydée Mo^{VI} de l'enzyme et le produit DMS, qui se dissocie de l'enzyme, 2) lors de l'étape de réduction, deux protons et deux électrons doivent être transférés à l'atome de molybdène afin de libérer l'atome d'oxygène sous forme d'une molécule d'eau et de régénérer la forme réduite Mo^{IV} du métal. Ces deux électrons pouvant provenir du cytochrome c pentahémique DorC, il est attendu que leur transfert se fasse séquentiellement, impliquant donc la formation transitoire d'un intermédiaire Mo^{V} .

Des informations structurales sur le complexe non covalent enzyme-substrat ont été obtenues notamment grâce à la résolution de la structure de la DMSOR de *R. capsulatus* sous forme Mo^{VI} mise en présence de DMS (McAlpine *et al.*, 1998). Dans ces conditions, le DMS réduit le centre molybdène à l'état Mo^{IV} . Le DMSO ainsi formé reste coordonné à l'atome de Mo et y remplace le ligand mono-oxo. Ce complexe est un bon modèle pour mettre en évidence les interactions existant dans le complexe enzyme-substrat catalytiquement compétent. Ainsi, les deux groupements méthyle du substrat sont situés à moins de 5 Å des cycles aromatiques des résidus Trp388, Trp196, Trp116, Tyr114, Tyr360 et Tyr165 : les interactions hydrophobes entre ces cycles aromatiques et ces deux groupements méthyles constituent une force stabilisatrice favorable à la fixation du substrat. Le résidu Trp388 adopte une conformation lui permettant de refermer le canal d'accès au site actif et d'en exclure le solvant (Figure 9).

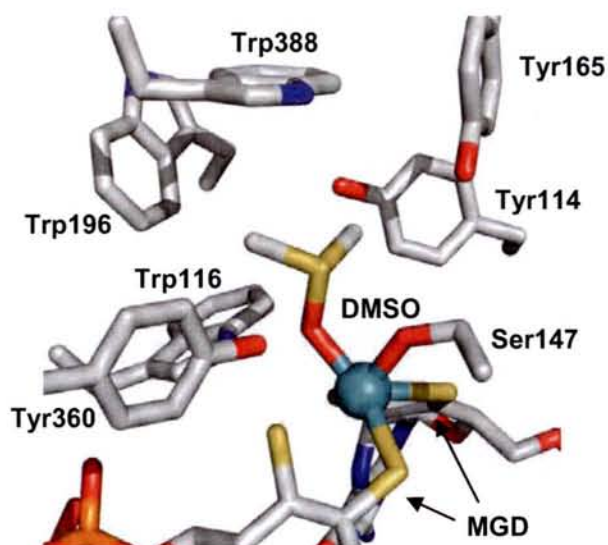


Figure 9 : Structure du site actif de la DMSOR de *R. capsulatus* complexé par une molécule de DMSO. Les chaînes latérales aromatiques interagissant avec le DMSO sont représentées. L'atome de molybdène est représenté en mode sphère, et une partie des cofacteurs MGD est visible (d'après McAlpine *et al.*, 1998).

Il est particulièrement intéressant de noter que les données cristallographiques et de spectroscopie Raman démontrent clairement que la coordination du sulfoxyde avec l'atome de molybdène entraîne un allongement de la liaison S-O du substrat, qui ne présente plus qu'un caractère de liaison simple. En effet, la distance S-O est augmentée (1,7 Å) par rapport au DMSO libre (1,492 Å) et la fréquence d'étirement de la liaison S-O est fortement diminuée (de 1003 cm⁻¹ dans le DMSO libre à 862 cm⁻¹ dans le DMSO coordiné), davantage que dans les complexes modèles DMSO/métaux de transitions. Ces résultats suggèrent l'activation de la fonction sulfoxyde par l'atome de molybdène, indispensable pour initier le transfert de l'atome d'oxygène.

Ce transfert direct de l'atome d'oxygène du DMSO à l'atome de molybdène, qui est proposé lors de l'étape d'oxydation, a été clairement démontré pour la DMSOR de *R. sphaeroides*. La méthodologie retenue s'appuie sur le marquage isotopique du DMSO par un atome d'O¹⁸ et par l'utilisation d'une phosphine tertiaire capable d'accepter le ligand oxo porté par la forme oxydée Mo^{VI} puis par sa caractérisation par spectrométrie de masse (Schultz *et al.*, 1995). Les analyses par spectrométrie Raman ont confirmé ce transfert direct ainsi que l'implication des formes Mo^{IV} et Mo^{VI} mono-oxo lors du mécanisme catalytique de la DMSOR (Figure 10) (Garton *et al.*, 1997).

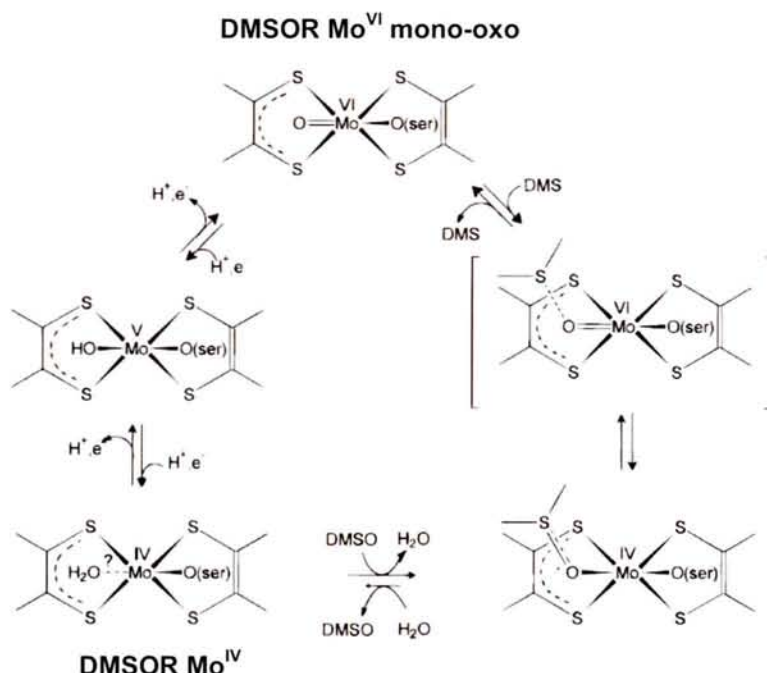


Figure 10 : Mécanisme chimique détaillé de réduction du DMSO catalysé par la DMSOR. (d'après Garton *et al.*, 1997).

La caractérisation cinétique détaillée du mécanisme de la DMSOR a été entreprise avec l'enzyme de *R. capsulatus*, à la fois à l'état stationnaire et à l'état pré-stationnaire, en s'appuyant principalement sur les propriétés d'absorption du cofacteur molybdène dans le domaine visible (Adams *et al.*, 1999). Les résultats obtenus sont compatibles avec un cycle catalytique simple, modélisé par quatre étapes (association, transfert de l'oxygène, dissociation, recyclage redox) gouvernées par huit constantes de vitesses qui ont pu être mesurées spécifiquement (Figure 11).

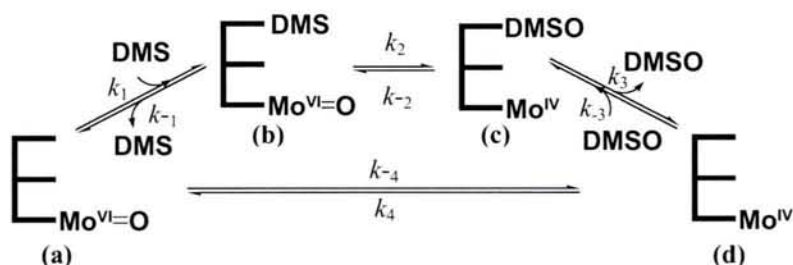


Figure 11 : Modèle cinétique du mécanisme catalytique de la DMSOR. Les formes b et c représentent les complexes Michaeliens (d'après Adams *et al.*, 1999).

Ces travaux ont montré que la DMSOR est capable de catalyser efficacement la réaction dans les deux sens, à savoir la réduction du DMSO par l'enzyme sous forme Mo^{IV} et l'oxydation du DMS par l'enzyme sous forme Mo^{VI}. Dans les conditions utilisées à pH 5,5,

les étapes de formation des complexes enzyme/DMS ou enzyme/DMSO sont cinétiquement déterminantes car plus lentes que l'étape de transfert d'oxygène qui suit. Les vitesses de l'étape de transfert d'oxygène, dans les deux sens, sont donc au moins aussi rapides que les précédentes et ont été estimées supérieures à 70 s^{-1} pour k_{-2} et 220 s^{-1} pour k_2 . L'étape de régénération redox artificielle utilisée lors des mesures à l'état stationnaire est l'étape cinétiquement limitante globale du cycle catalytique. Les constantes de dissociation mesurées sont de 0,16 mM pour le DMS et de 109 mM pour le DMSO. Il est assez surprenant de noter que, paradoxalement, la DMSOR catalyse plus efficacement l'oxydation du DMS que la réduction du DMSO.

Le rôle de deux résidus conservés du site actif de la DMSOR, le Trp116 et la Tyr114, a été étudié en caractérisant l'effet du remplacement de ces deux résidus sur les propriétés spectroscopiques et cinétiques à l'état stationnaire de l'enzyme. Les résultats obtenus après la substitution de la Tyr114 en Phe ou Ala sont en accord avec l'implication de la Tyr114 dans la reconnaissance du substrat ainsi que dans la modulation des propriétés électrochimiques du centre Mo et le mécanisme catalytique de l'enzyme (Johnson et Rajagopalan, 2001 ; Ridge *et al.*, 2002). Les conséquences du remplacement du Trp116 en Phe sont également en accord avec le rôle structural crucial joué par ce résidu qui doit stabiliser le centre molybdène sous forme mono-oxo *via* l'établissement d'une liaison H entre ce ligand et le noyau indole du Trp (Ridge *et al.*, 2004).

Un point important concerne l'étude de la spécificité de substrat des DMSOR. Dès les premières études menées sur ces enzymes, il a été montré qu'elles étaient capables de réduire une large gamme de substrat. La DMSOR d'*E. coli* peut réduire de nombreux sulfoxydes, dont la méthionine sulfoxyde (Simala-Grant et Weiner, 1996). Parmi les substrats identifiés pour les DMSOR de *R. capsulatus* et *R. sphaeorides* figurent notamment la triméthylamine-oxyde, la méthionine sulfoxyde et le chlorate. Enfin, les sulfoxydes étant des composés chiraux, il a été montré que la DMSOR de *R. capsulatus* est stéréosélective de l'isomère S, alors que la DMSOR d'*E. coli* présente une stéréosélectivité pour l'isomère R (Hanlon *et al.*, 1998).

I.1.3.2 Biotine Sulfoxyde Réductase (BSOR)

La BSOR est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la réduction de la biotine sulfoxyde en biotine et a été caractérisée chez *E. coli* et *R. sphaeroides*.

La fonction cellulaire de cette enzyme n'a pas été identifiée. Il a été proposé que cette protéine permettrait à la cellule d'utiliser la biotine sulfoxyde en tant que source de biotine. Un autre rôle de la BSOR serait de protéger la cellule contre les dommages causés par un stress oxydant, par exemple en restaurant l'activité d'enzymes inactivées par l'oxydation de leur cofacteur biotine (Pierson et Campbell, 1990).

La BSOR de *R. sphaeroides*, à la différence des DMSOR, n'a pas besoin d'un système enzymatique de recyclage redox car elle utilise directement le NADPH comme source d'électrons (Pollock et Barber, 1997). Il existe 50% d'identité de séquence entre la DMSOR et la BSOR de *R. sphaeroides*.

La BSOR d'*E. coli*, quant à elle, n'est pas capable d'utiliser directement le NADPH et nécessite la présence d'une protéine de type thiorédoxine (Trx) pour son activité catalytique (del Campillo-Campbell *et al.*, 1979).

Comme pour la DMSOR, la structure du site actif renfermant les deux cofacteurs MGD a été particulièrement étudiée. La caractérisation des formes oxydée (Mo^{VI}), réduite par le NADPH ou le dithionite (Mo^{IV} et Mo^{V}), par spectroscopie d'absorption visible, RPE, absorption des rayons X et EXAFS a permis de proposer une structure à l'état oxydé Mo^{VI} où la sphère de coordination de l'atome de molybdène est formée par les quatre thiolates des deux cofacteurs MGD, l'oxygène de la Ser121 (équivalente à la Ser127 chez la DMSOR) et un ligand mono-oxo. A l'état réduit Mo^{IV} , l'atome de molybdène a perdu le ligand oxo et conserve la coordination par les quatre thiolates et la Ser121 auxquels s'ajoute probablement un ligand hydroxo (Temple *et al.*, 2000) (Figure 12).



Figure 12 : Structure du site actif de la BSOR sous formes oxydée Mo^{VI} et réduite Mo^{IV} , obtenues par EXAFS. La proposition de géométrie n'est qu'indicative (d'après Temple *et al.*, 2000).

En parallèle, la caractérisation de la BSOR par spectroscopie Raman de résonance, de manière analogue à l'étude réalisée antérieurement sur la DMSOR, a conforté les structures proposées précédemment. Les résultats obtenus en utilisant un substrat sulfoxyde marqué par un atome de O^{18} sont en faveur d'un mécanisme de transfert direct de l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat vers l'atome de molybdène de l'enzyme, comme dans le cas de la DMSOR. Il a également pu être montré que le mécanisme de la BSOR implique bien un cycle redox entre la forme Mo^{IV} et la forme Mo^{VI} mono-oxo, dont le ligand mono-oxo provient du substrat. Durant ce cycle, les quatre ligands thiolates des groupements dithiolènes des deux cofacteurs restent coordonnés au métal, une fois de plus comme dans le cas de la DMSOR. Cependant, à la différence de cette dernière, la BSOR à l'état oxydé mono-oxo Mo^{VI} ne peut être réduite ni par la biotine, ni par le DMS. Cette différence de comportement indique que la thermodynamique du mécanisme de la BSOR ne lui permet de catalyser que la réaction de réduction de la biotine sulfoxyde (Garton *et al.*, 2000) (Figure 13).

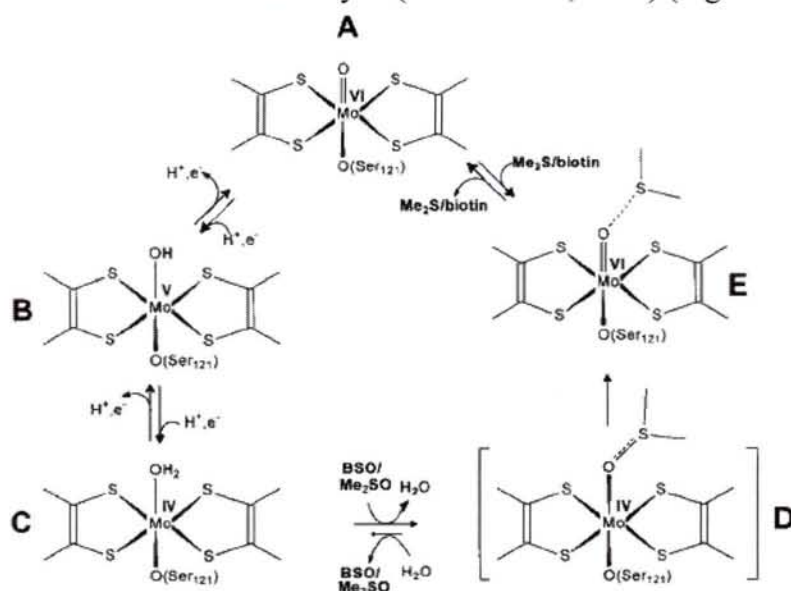


Figure 13 : Mécanisme chimique proposé pour la réduction de la BSO catalysée par la BSOR. C : BSOR réduite (Mo^{IV}), D : complexe BSOR réduite/BSO, E : complexe BSOR oxydé (Mo^{VI})/BS, A : BSOR oxydé (Mo^{VI} mono-oxo) (d'après Garton *et al.*, 2000).

La caractérisation cinétique détaillée à l'état stationnaire du mécanisme de la BSOR a été entreprise avec l'enzyme de *R. sphaeorides* (Pollock et Barber, 1997 ; Pollock et Barber, 2001). Les données obtenues ont montré que le mécanisme cinétique de la BSOR est de type Ping-Pong, et présente une double inhibition compétitive par les substrats (Figure 14). A pH 8,0, les paramètres $K_{M\text{BSO}}$ et $K_{M\text{NADPH}}$ sont respectivement de 714 μM et 65 μM . L'utilisation du cofacteur (4R)-NADPD a permis de montrer que la BSOR utilise spécifiquement l'hydrogène 4R du noyau nicotinamide du cofacteur.

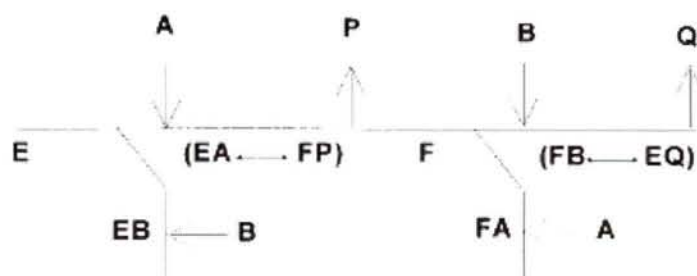


Figure 14 : Modèle cinétique du mécanisme de la BSOR de *R. sphaeorides*. E : BSOR réduite (Mo^{IV}), A : NADPH, P : NAD, F : BSOR oxydée (Mo^{VI}), B : BSO, Q : BS.

Ces travaux ont été complétés récemment par l'étude à l'état pré-stationnaire de l'interaction du NADPH avec la BSOR (Nelson et Rajagopalan, 2004). Les résultats cinétiques obtenus à pH 8,0 indiquent que 1) la vitesse de réduction de la BSOR par le NADPH est plus rapide que le k_{cat} et, 2) la réduction du centre molybdène de l'enzyme est concomitante à l'oxydation du cofacteur, excluant ainsi l'accumulation de l'intermédiaire Mo^{V} (Figure 15). La modélisation de la structure tridimensionnelle de la BSOR et la caractérisation de variants protéiques a permis d'identifier le résidu Arg137 comme intervenant dans la reconnaissance du cofacteur NADPH et suggèrent une interaction entre l'Arg137 et le groupement phosphate en 2' du ribose adjacent à l'adénine du cofacteur.

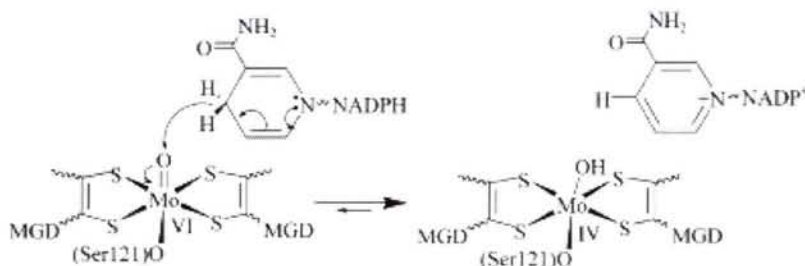


Figure 15 : Mécanisme proposé pour la réduction du centre Mo^{VI} de la BSOR de *R. sphaeorides* par le NADPH (d'après Nelson et Rajagopalan, 2004).

Le rôle de deux résidus conservés du site actif de la BSOR, le Trp90 (équivalent au Trp116 de la DMSOR) et la Ser121 (équivalent à la Ser147 de la DMSOR), a été étudié par la caractérisation de l'effet du remplacement de ces deux résidus sur les propriétés cinétiques et spectroscopiques de l'enzyme. Les résultats obtenus suggèrent que la Ser121 est indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme (Pollock et Barber, 2000), tout comme le Trp90, dont l'absence entraîne le piégeage de l'atome de molybdène à l'état Mo^{V} , catalytiquement non compétent, du fait de la perte de la liaison H supposée stabiliser le ligand mono-oxo dans la forme sauvage de l'enzyme, à l'état oxydé Mo^{VI} (Pollock *et al.*, 2003).

L'étude de la spécificité de substrat de la BSOR de *R. sphaeorides* a fait apparaître que l'enzyme est capable de réduire des substrats oxydés autres que la biotine sulfoxyde, comme le nicotinamide N-oxyde, la triméthylamine N-oxyde, le DMSO et la méthionine sulfoxyde (Pollock et Barber, 1997).

Très récemment, des travaux ont été réalisés sur l'activité MetSO réductase de la BSOR d'*E. coli*, appelée BisC chez cet organisme. Il a pu être montré *in vitro* que la BSOR d'*E. coli* possédait bien une activité MetSO réductase, le $K_{M\text{MetSO}}$ de BisC (17 μM) se révélant bien plus faible que le $K_{M\text{MetSO}}$ de la BSOR de *R. sphaeroides* (800 μM), mais également que cette activité MetSO réductase de BisC était conservée et fonctionnelle *in vivo*. Enfin, BisC présente une stéréosélectivité de substrat vis-à-vis de l'isomère *S* de la MetSO et ne peut réduire les MetSO au sein d'une protéine (Ezraty *et al.*, 2005b).

I.1.3.3 Diméthyle Sulfure Déshydrogénase

Récemment, une activité enzymatique diméthyle sulfure déshydrogénase (DMSDH) a été mise en évidence chez *Rhodobacter sulfidophilus*, permettant à ce micro-organisme photosynthétique d'utiliser le DMS comme donneur d'électrons et dont le produit est le DMSO. Cette activité enzymatique est périplasmique et est distincte de la DMSOR exprimée également par cette bactérie (Hanlon *et al.*, 1996). Le gène permettant d'exprimer cette activité a été cloné et l'enzyme correspondante a été purifiée. Elle se compose de trois sous-unités appelées DdhA, B et C, de 94, 38 et 32 kDa respectivement. DdhA appartient à la famille des DMSOR et possède un centre molybdène composé de deux cofacteurs MGD, DdhB contient quatre centres [Fe-S] et DdhC possède un hème de type b. Il a pu être montré que les électrons issus du DMS sont transférés de la DMSDH vers le centre réactionnel photochimique de la bactérie *via* le cytochrome *c2*.

I.2 La fonction acide sulfénique

Les thiols sont des fonctions particulièrement réactives vis-à-vis de composés oxydants, du fait notamment de la capacité du soufre à accepter des états d'oxydation élevés. Trois oxyacides du soufre sont possibles, l'acide sulfénique, R-SOH, l'acide sulfinique, R-SO₂H, et enfin l'acide sulfonique R-SO₃H.

I.2.1 Structure et réactivité

Deux structures tautomériques sont envisageables pour la fonction R-SOH (Figure 16).

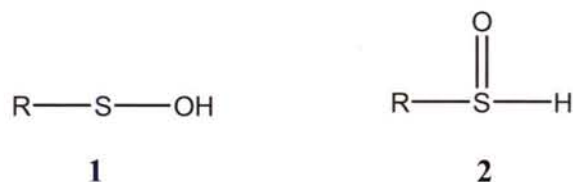


Figure 16 : Structures des deux tautomères possibles pour la fonction acide sulfénique.

L'analyse de l'acide méthane sulfénique (CH₃-SOH) obtenu par pyrolyse éclair sous vide a montré que le soufre de ce composé est divalent, validant la structure 1 (Fig 16) comme la représentation correcte d'un acide sulfénique (Hogg, 1990).

I.2.1.1 Réactivité de l'atome de soufre des acides sulféniques

Les acides sulféniques sont des composés généralement instables, cette instabilité provenant de leur très forte réactivité. En effet, la fonction acide sulfénique, au niveau de son soufre, peut exprimer à la fois un caractère nucléophile et un caractère électrophile, selon les conditions expérimentales. Cette réactivité atypique a permis de caractériser initialement des acides sulféniques en temps qu'intermédiaires réactionnels transitoires. Ainsi, l'implication des acides sulféniques en temps qu'intermédiaires lors de l'oxydation de thiols en disulfures ou en oxyacides a été prouvée par Davis et Billmers, 1981, en piégeant l'acide sulfénique formé lors de l'oxydation du t-butyle-SH, grâce à son caractère nucléophile qui peut s'exprimer vis-à-vis de la fonction alcyne du propylate de méthyle (Figure 17).

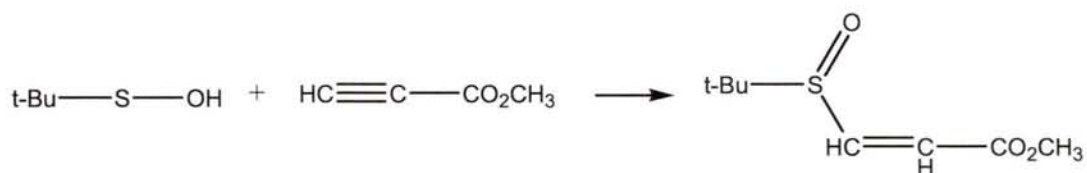


Figure 17 : Réaction de l'acide tert-butyl sulfénique avec le propylate de méthyle.

Cependant, même en absence de composés réactifs, la durée de vie des acides sulféniques est très limitée, du fait de la réaction de condensation entre deux acides sulféniques, formant un thiosulfinate (Davis *et al.*, 1986). Cette réaction procède *via* la formation d'un dimère non-covalent, stabilisé par l'établissement d'une liaison H

intermoléculaire, permettant de diminuer l'énergie d'activation requise et contribue ainsi directement à l'instabilité des acides sulféniques en solution. La présence du dimère non-covalent a été prouvée par spectroscopie IR (Figure 18).

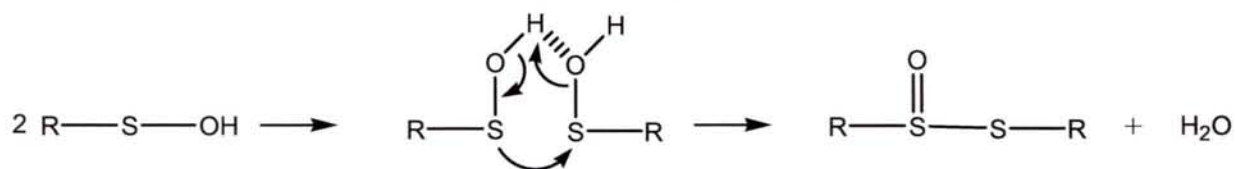


Figure 18 : Mécanisme de condensation de deux acides sulféniques en thiosulfinate.

Le fait que la formation d'un thiosulfinate nécessite l'attaque nucléophile d'un premier atome de soufre sur un second, qui lui est électrophile, illustre parfaitement la particularité qu'a le soufre des acides sulféniques d'être à la fois électrophile ou nucléophile selon les conditions utilisées.

I.2.1.2 Stabilisation des acides sulféniques

Comme suggéré dans le paragraphe précédent, la capacité des acides sulféniques à se condenser rapidement en thiosulfinate semble être directement gouvernée par la possibilité de former une liaison H intermoléculaire entre deux acides sulféniques et par le caractère nucléophile et électrophile de l'atome de soufre. Ainsi, la modulation de ces deux paramètres devrait raisonnablement permettre de créer des structures moléculaires capables de stabiliser une fonction acide sulfénique.

Ainsi, Bruice et Sayigh, 1959, ont conclu de leur travaux sur l'antraquinone-1-SOH que la possibilité de former une liaison H intramoléculaire entre la fonction acide sulfénique et la fonction carbonyle adjacente était un facteur important mais pas suffisant pour stabiliser l'acide sulfénique. De même, Davis *et al.*, 1986, ont examiné la stabilisation des acides sulféniques sur des squelettes aromatiques, par liaison H intramoléculaire et par effets électroniques induits par des substituants électronégatifs. Des exemples de telles structures sont représentés en Figure 19. Dans tous ces cas, l'acide sulfénique peut former une liaison H avec un atome d'oxygène ou d'azote adjacent. La solubilité de ces Ar-SOH hétérocycliques a permis la détermination des pKa de l'acide sulfénique par spectroscopie UV, qui se sont révélés être compris entre 4,8 et 6,3.

Un autre facteur important pour la stabilisation d'un acide sulfénique est l'ionisation de la fonction acide en sa base conjuguée, le sulfénate. Ainsi, la lumazine-SOH (C, Figure 19) est plus stable à pH alcalin qu'à pH acide, confirmant la plus grande stabilité de la forme sulfénate par rapport à la forme acide sulfénique.

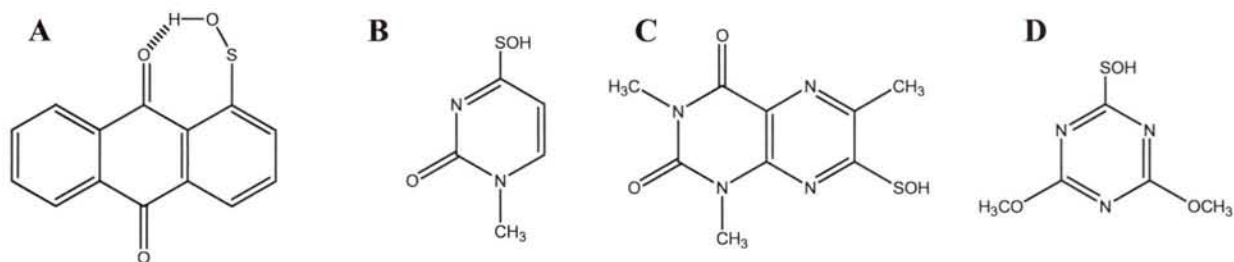


Figure 19 : Structure de différents acides sulféniques stabilisés. A : anthraquinone-1-SOH, B : 1-méthyleuracile-4-SOH, C : 1,3,6-triméthylelumazine-SOH, D : 3,5-triazine-2-SOH.

Toutefois, la possibilité que l'introduction d'une liaison H intramoléculaire ou d'effets électroniques puisse perturber les propriétés de l'acide sulfénique a amené l'équipe du Pr. Okazaki à développer une nouvelle stratégie de stabilisation. Cette stratégie repose sur l'utilisation de structures moléculaires appelés « bols réactionnels », qui confèrent un encombrement stérique autour de l'acide sulfénique empêchant ainsi la réaction de dimérisation, mais n'affectant pas la réactivité de cette fonction avec d'autres molécules de faibles tailles. L'encombrement stérique est assuré par deux unités terphenyls (Figure 20).

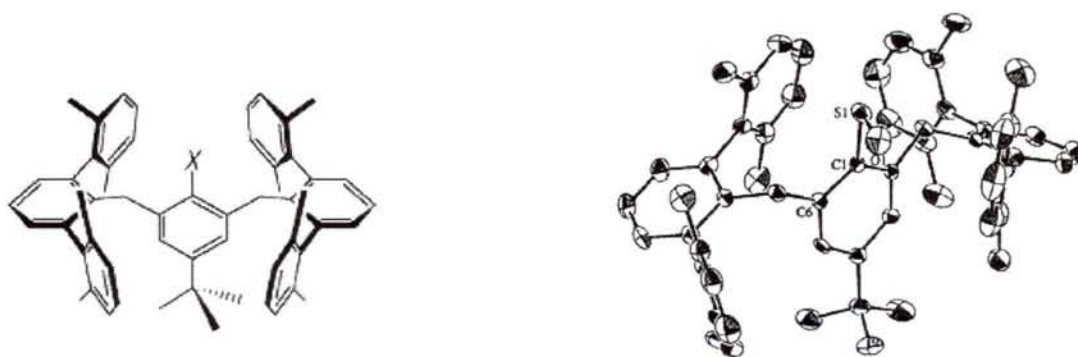


Figure 20 : A) Structure schématique du bol réactionnel (Bmt) permettant l'isolement d'une fonction acide sulfénique. X : S-OH. B) Structure cristallographique de l'acide sulfénique stabilisé au sein du bol réactionnel (d'après Goto *et al.*, 1997).

La structure tridimensionnelle d'un tel acide sulfénique (Bmt-SOH) a été résolue par cristallographie (Goto *et al.*, 1997) (Figure 20) et vient compléter les deux autres structures

3D d'acide sulfénique stable également disponibles (Ishii *et al.*, 1996 ; Saiki *et al.*, 1996). La longueur de la liaison S-O est de 1,62 Å dans ces deux structures et de 1,68 Å pour le Bmt-SOH, indiquant une liaison simple entre les deux atomes. La valeur de l'angle C-S-O de la fonction acide sulfénique dans ces trois structures est comprise entre 100° et 107°, indiquant une géométrie tétraédrique. Ainsi, il a été montré qu'une fonction acide sulfénique peut être synthétisée simplement par oxydation d'un thiol, à la condition qu'il se trouve dans un environnement adéquat, c'est-à-dire isolé d'autres fonctions réactives.

I.2.2 Acides sulféniques et protéines

Les premiers résultats expérimentaux suggérant la formation d'acides sulféniques stables au niveau de résidus Cys de protéines ont été présentés dès le début des années 60, suite à des travaux sur l'oxydation dans des conditions douces de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et de la papaine. Une première revue sur le sujet fut publiée en 1976 par Allison (Allison, 1976). Il a été montré que, de manière similaire aux acides sulféniques « organiques » en solution, l'atome de soufre de ces Cys-SOH stables présente à la fois un caractère nucléophile en réagissant avec des alcènes, comme l'acide 3-cyclohexene-1-carboxylique, et un caractère électrophile lui conférant une réactivité vis-à-vis de nucléophiles comme la benzylamine ou la dimédone (5,5-diméthyle-1,3-cyclohexanedione) (voir page 41).

La possibilité de générer de tels acides sulféniques stables au sein de quelques protéines, de structure tridimensionnelle connue, a permis de mettre en évidence deux facteurs supplémentaires contribuant à la stabilisation des acides sulféniques au sein d'une protéine, à savoir l'absence d'autres résidus Cys à proximité et un environnement protégé du solvant et constitué de résidus hydrophobes. Ce dernier élément est en parfait accord avec la stratégie de stabilisation employée lors de la synthèse de l'acide sulfénique stable Bmt-SOH.

En résumé, quatre critères structuraux sont probablement impliqués dans la stabilisation d'un acide sulfénique au sein d'une protéine : 1) l'accès limité au solvant et un microenvironnement apolaire, 2) l'absence de thiol à proximité, 3) l'établissement de liaison H et, 4) l'ionisation sous forme sulfénate.

Cependant, ces premières études faisaient alors référence à des acides sulféniques introduits chimiquement sur des résidus Cys de site actif enzymatique, et non à des acides sulféniques formés lors d'un processus de catalyse ou de régulation enzymatique.

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

Ce n'est que récemment que des preuves expérimentales ont pu être obtenues, montrant la présence d'acides sulféniques fonctionnels au sein de protéines natives. Ces acides sulféniques présents au sein des protéines peuvent être impliqués dans deux grands types de fonctions 1) la catalyse redox enzymatique ou, 2) la régulation redox, aussi bien d'enzymes que de protéines à activités diverses. Les exemples les plus significatifs et les mieux documentés sont présentés dans les paragraphes suivants.

I.2.2.1 Acide sulfénique et catalyse

I.2.2.1.1 Réductases à FAD : NADH Peroxydase, NADH Oxydase

Ces deux enzymes font partie de la grande famille des disulfure réductases à flavine, elle-même divisée en trois classes majeures, représentées par 1) la Glutathion Réductase, 2) la Thiorédoxine Réductase et, 3) la NADH Peroxydase. Les membres de cette dernière classe diffèrent du reste de la famille par l'absence du centre redox disulfure et par son remplacement par un centre à une seule cystéine. Cette cystéine va passer au cours du cycle catalytique d'un état réduit à un état oxydé sous forme d'acide sulfénique.

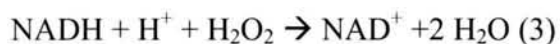
I.2.2.1.1.1 NADH Peroxydase (Npx)

Historiquement, cette protéine a été la première enzyme décrite formant un acide sulfénique essentiel à sa fonction. C'est l'exemple le mieux caractérisé d'acide sulfénique au sein d'une protéine.

Comme souvent chez les bactéries lactiques anaérobies, les streptocoques ne possèdent ni de cytochromes, ni de protéines à hème (comme les catalases ou les peroxydases) impliquées dans le métabolisme oxydatif. Certaines de ces bactéries, comme *Enterococcus faecalis*, se sont dotées au cours de l'évolution de flavo-protéines atypiques, capables de catalyser des réactions d'oxydo-réduction leur permettant d'assurer leur croissance en conditions aérobies.

Ainsi, chez *E. faecalis*, la décomposition du peroxyde d'hydrogène est catalysée par une NADH Peroxydase (Npx) (réaction 3), une enzyme à FAD ayant la même fonction que celle normalement assurée par les catalases ou peroxydases à hème (Claiborne *et al.*, 1992 ; Hoskins *et al.*, 1962). Cette peroxydase contribue ainsi à la défense contre le stress oxydant

médié par le peroxyde d'hydrogène, tout en participant à la régénération du NAD^+ requis par la glycolyse.



La présence d'un acide sulfénique porté par la Cys42 dans la forme oxydée native de la Npx, initialement proposée en 1989 par Poole et Claiborne (Poole et Claiborne, 1989a), a pu être confirmée par la résolution de la structure tridimensionnelle à 2,8 Å de la Npx sous la forme acide sulfénique (Yeh *et al.*, 1996).

La Npx est une protéine homotétramérique (Poole et Claiborne, 1989). Chaque monomère (46 kDa) est formé de quatre domaines : un domaine de fixation du FAD, un domaine de fixation du NAD, un domaine central et un domaine d'interface (Figure 21). Plusieurs structures cristallographiques de la Npx ont été obtenues. Dans la première structure de Npx résolue (Stehle *et al.*, 1990 ; Stehle *et al.*, 1991), la Cys42 était présente sous forme suroxydée en acide sulfonique ($-\text{SO}_3\text{H}$). La structure du complexe Npx/NADH a également été résolue (Stehle *et al.*, 1993), toujours avec la Cys42 sous forme d'acide sulfonique. Cette structure a permis de mettre en évidence l'organisation du site actif et la conformation du NADH nécessaire pour permettre la catalyse redox impliquant le FAD et l'acide sulfénique porté par la Cys42. Ainsi, le noyau nicotinamide du NADH vient se placer parallèlement à la face *re* du noyau isoalloxazine du FAD, stabilisé par « stacking » *via* des interactions π - π . La position C4 du NADH, donneur d'hydrure, se trouve à 3,1 Å de la position N5 du FAD, accepteur transitoire des électrons. La Cys42 est située quant à elle sur la face *si* de la flavine, du côté opposé au NADH, l'atome de soufre du résidu se trouvant à 3,5 Å de la position C4a du FAD (Figure 21). Les données structurales décrivent donc un site actif de la Npx dans lequel la flavine se retrouve prise en sandwich entre le NADH réducteur et le centre redox Cys-SOH/Cys-SH et y jouant un rôle central dans le transfert directionnel d'équivalent réducteurs du NADH vers l'acide sulfénique.

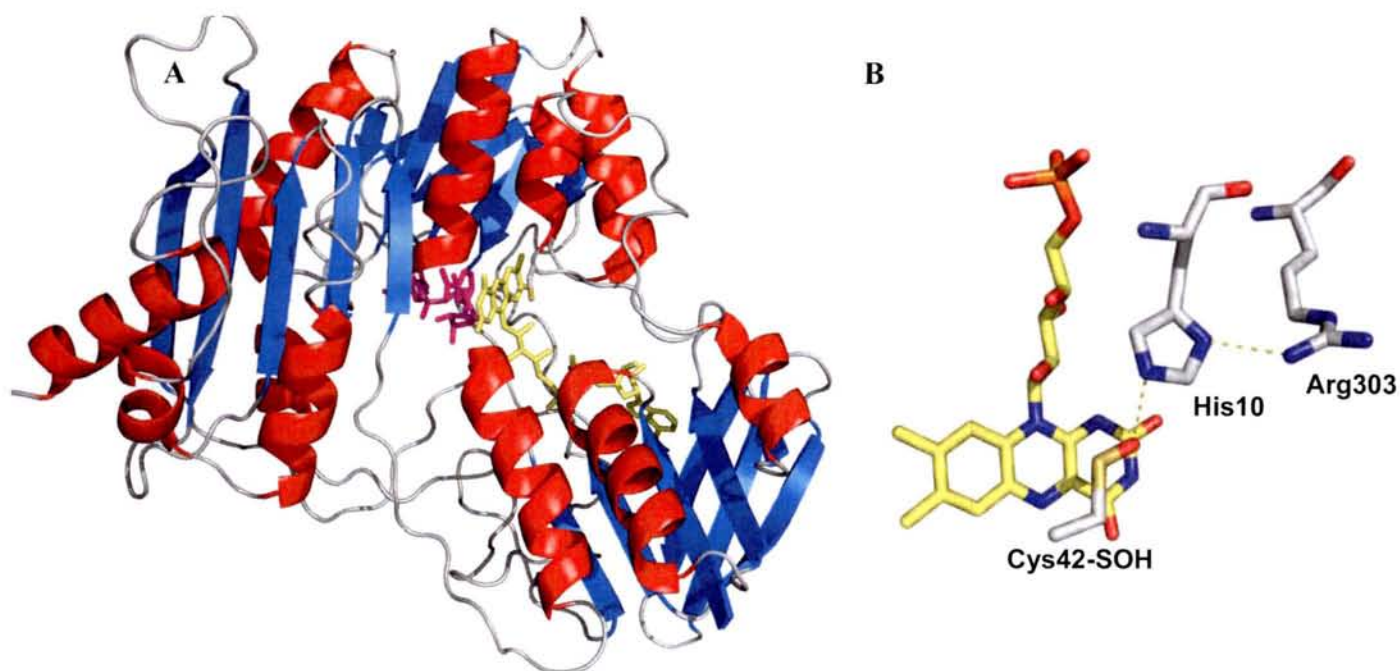


Figure 21 : Structure tridimensionnelle du monomère de la Npx de *E. faecalis* et de son site actif. A) Architecture du complexe Npx/FAD/NADH. Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β en bleu, le NAD en violet et le FAD en jaune (d'après Stehle *et al.*, 1993). B) Structure du site actif de la Npx. La flavine est représentée en jaune. Les résidus Cys42-SOH, His10 et Arg303 sont reportés sur la figure.

La présence du cofacteur flavine et l'utilisation de ses propriétés spectroscopiques constituent un outil extrêmement puissant pour étudier le mécanisme catalytique de la Npx. Cette approche a en particulier permis de mettre en évidence la présence du deuxième centre redox Cys-SOH, en plus de la flavine. La caractérisation spectroscopique de ces intermédiaires redox a permis d'entreprendre l'étude cinétique détaillée du mécanisme de Npx, notamment à l'état pré-stationnaire.

Le mécanisme cinétique de la Npx de type sauvage est de type Ping-Pong et implique un cycle catalytique redox entre l'état réduit [EH_2 (FAD, Cys-SH)] et l'état oxydé [E (FAD, Cys-SOH)]. Il peut donc être décrit comme la succession de deux demi-réactions, l'une oxydante, faisant passer la Npx de sa forme EH_2 à sa forme E en présence d' H_2O_2 ; l'autre réductrice, régénérant la forme E en EH_2 en présence de NADH (Figure 22B).

L'étape d'oxydation repose sur l'attaque de la Cys42 sur H_2O_2 . Cette étape est rapide et aboutit à la formation de l'acide sulfénique sur la Cys (forme [E (FAD, Cys-SOH)]). L'étape réductrice peut être divisée en deux sous-étapes avec: 1) la formation d'un complexe Npx/NADH, caractérisé par un transfert de charge NADH/FAD. Cette réaction bimoléculaire

est rapide et, 2) le transfert d'électrons du NADH vers l'acide sulfénique, sans accumulation d'un intermédiaire FAD réduit. Ce transfert d'électrons est lent et correspond à l'étape limitante du mécanisme, $k_{cat} = 23 \text{ s}^{-1}$. L'utilisation de NADH deutéré a confirmé que l'étape limitante est liée au transfert d'hydrure stéréosélectif de l'hydrogène 4S du NADH.

Le mécanisme de l'étape d'oxydation de Npx implique l'attaque nucléophile de la Cys42 sur H_2O_2 pour former l'acide sulfénique. Il est donc indispensable que la Cys soit déprotonée pour exprimer sa nucléophilie. Dans ce contexte, le transfert de charge mis en évidence entre la forme thiolate de ce résidu et le FAD a permis de montrer que le pKa de la Cys42 est inférieur ou égal à 4,5 dans la Npx de type sauvage (Poole et Claiborne, 1986). L'environnement protéique autour de la Cys42 permet donc son activation *via* l'abaissement de son pKa.

L'examen des premières structures cristallographiques de Npx disponibles a mis en évidence la présence du résidu His10 à proximité de la Cys42. L'implication de His10 dans la diminution du pKa de Cys42 a été exclue par la mesure de ce pKa dans le variant H10Q, et reste inférieur ou égal à 4,5. Cependant, les données cristallographiques et biochimiques obtenues sur les variants protéiques H10Q et H10A ont permis d'attribuer deux rôles à His10, au niveau de la stabilisation: 1) du groupement acide sulfénique dans le site actif de Npx, le remplacement H10Q rendant l'acide sulfénique cinquante fois plus sensible à la suroxydation par H_2O_2 et, 2) de l'état de transition de la demi-réaction d'oxydation, probablement en donnant une liaison H à l'un des deux oxygènes de H_2O_2 afin d'y stabiliser la charge négative (Figure 22A) (Crane *et al.*, 1996). En effet, la vitesse de cette étape est diminuée de 150 fois pour le variant H10Q par rapport à l'enzyme de type sauvage.

Par ailleurs, l'apparition d'une bande d'absorbance due à un transfert de charge entre l'acide sulfénique, vraisemblablement sous forme sulfénate (S-O^-), et le FAD est observée sur les variants H10Q et H10A (Crane *et al.*, 1996). Cette bande est présente sur le spectre de la Npx de type sauvage, mais d'amplitude très faible (Poole et Claiborne, 1989b). Il est intéressant de noter que la variation du pH de 5,4 à 7,1 ne provoque pas de variation de l'intensité de ce transfert de charge, suggérant donc que le pKa de l'acide sulfénique est inférieur ou égal à 4,5.

prononcé pour le sulfénate (-S-O⁻) stabilisé au sein de la Npx et en conséquence une localisation de la charge négative plutôt sur l'atome de soufre (-S⁻=O).

I.2.2.1.1.2 NADH Oxydase (Nox)

Comme la Npx, la NADH oxydase est exprimée par des bactéries ne produisant pas de protéines à hème. La Nox catalyse la réduction à quatre électrons de l'oxygène moléculaire en eau, en utilisant le NADH comme source d'équivalents réducteurs (Réaction 4).



L'étude de souches délétées du gène codant la Nox a montré que cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme aérobie de ces bactéries, en régénérant le stock de NAD⁺ nécessaire pour la glycolyse. De plus, Nox est également impliquée dans la résistance de la cellule face au stress oxydant induit par l'oxygène (Higuchi, 1992 ; Higuchi *et al.*, 1999).

Structuralement, Nox est homologue à Npx, les deux protéines d'*E. faecalis* partageant 44% d'identité de séquence. La Nox d'*E. faecalis* est un dimère formé de deux sous-unités identiques de 50 kDa chacune. De manière similaire à la Npx, chaque monomère de Nox contient les deux centres redox FAD et Cys42, ce résidu passant de l'état réduit (-SH) à l'état oxydé (-SOH) au cours du mécanisme catalytique.

Plusieurs caractéristiques différencient cependant Nox et Npx, provenant du fait qu'à la différence de la Npx qui catalyse une réduction à deux électrons, Nox doit assurer le transfert de quatre électrons lors de son cycle catalytique. Ainsi, il a été montré par titration à l'équilibre que le potentiel redox de la flavine présente dans le site actif de Nox lui permet d'être réduite par le NADH, contrastant particulièrement avec le comportement redox de Npx, où la réduction du FAD n'est pas permise. Cependant, même en présence d'un excès de réducteur, le centre Cys-SOH de l'une des deux sous-unités du dimère de Nox reste sous forme oxydé, le second étant normalement réduit. Cette asymétrie du site actif de Nox de type sauvage a conduit à proposer un modèle de site actif asymétrique favorisant le dimère EH₄ ([FADH₂, Cys-SH, NAD⁺]) / EH₂ ([FADH₂, Cys-SOH, NAD⁺]) (Mallett *et al.*, 1999).

Afin de confirmer cette hypothèse, le mutant C42S a été caractérisé. Comme attendu, l'absence du centre Cys-SOH entraîne la disparition de l'asymétrie observée dans l'enzyme de type sauvage. De plus, l'absence de la Cys42 entraîne une modification de la réaction

catalysée par l'enzyme, qui se transforme en une réduction à deux électrons de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène (Réaction 5) (Mallett et Claiborne, 1998).



Ce résultat démontre clairement que la Cys42 joue le rôle essentiel de centre peroxydasique dans la Nox. La caractérisation cinétique de la demi-réaction d'oxydation du mutant C42S par O_2 a mis en évidence un processus à trois phases. Seule la première de ces trois phases présente une dépendance à $[\text{O}_2]$. L'intermédiaire formé à l'issue de cette première phase possède un spectre d'absorption caractéristique de la formation d'un adduit FAD-C4a-hydroperoxyde (FADH-OOH), comme décrit chez les monooxygénases à flavine. La seconde et la troisième phase correspondent au relargage de 0,5 équivalent d' H_2O_2 par FAD. Ce relargage biphasique d' H_2O_2 provient de la réactivité asymétrique des deux sous-unités du dimère de Nox avec O_2 . La sous-unité catalytiquement compétente pour l'attaque sur O_2 (correspondant probablement à un site actif proche de la forme EH_4 du type sauvage) réagit la première. La seconde sous-unité acquiert ensuite cette compétence catalytique *via* un changement conformationnel, cinétiquement limitant ($k = k_{\text{cat}} = 2 \text{ s}^{-1}$) (Figure 23B).

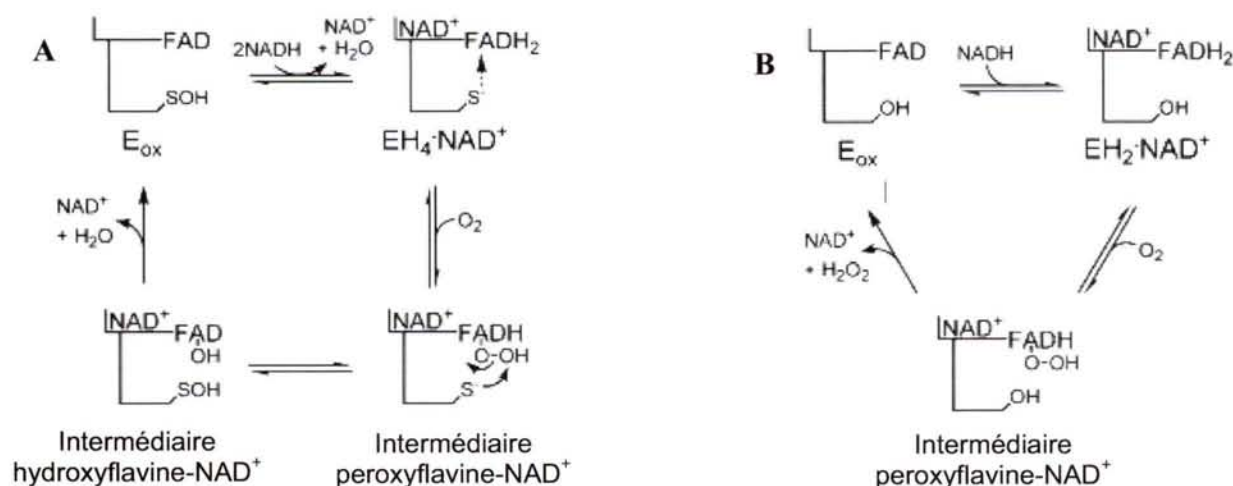


Figure 23 : Mécanisme catalytique de la Nox de type sauvage (A) et du variant C42S (B). (d'après Argyrou et Blanchard, 2004).

Sur la base des résultats obtenus avec le variant C42S, un mécanisme pour la Nox de type sauvage a été proposé, composé d'une demi-réaction d'oxydation, durant laquelle l'enzyme passe de l'état réduit EH_4 ([FADH₂, Cys-H, NAD⁺]) à l'état oxydé E ([FAD, Cys-SOH]), et d'une demi-réaction de réduction, régénérant la forme EH_4 à l'aide de NADH

(Figure 23A). La demi-réaction d'oxydation doit impliquer une étape d'activation d'O₂ puis une étape peroxydase. La demi-réaction d'oxydation du variant C42S est un bon modèle de l'étape d'activation d'O₂, impliquant l'activation de l'oxygène triplet vers le peroxyde singlet grâce à la formation de l'adduit C4a-hydroperoxyde sur la flavine. L'étape peroxydase repose ensuite sur l'attaque nucléophile du thiolate de la Cys42 sur cet intermédiaire FADH-OOH, qui génère l'acide sulfénique sur la Cys42 et un intermédiaire C4a-hydroxyflavine (FAD-OH). Cet intermédiaire doit ensuite se décomposer pour libérer H₂O et le FAD oxydé. Ainsi, l'incapacité du variant C42S à assurer l'étape peroxydase explique l'altération du mécanisme observé chez ce variant.

1.2.2.1.2 Formylglycine-Generating Enzyme

Les sulfatases sont des enzymes eucaryotes essentielles à la dégradation des esters de sulfates tels que les glycosaminoglycanes, les sulfolipides et les sulfates de stéroïdes. Le résidu catalytique clé de ces enzymes est une formylglycine (FGly), trouvée uniquement au sein du site actif des sulfatases. Le résidu FGly provient d'une modification post-traductionnelle générée à partir d'un résidu Cys de la sulfatase par l'action d'une enzyme appelée FGly Generating Enzyme (FGE) (Figure 24).

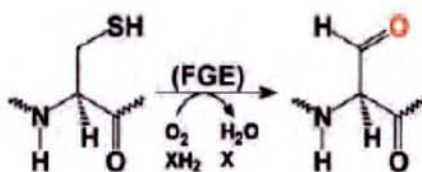


Figure 24 : Réaction catalysée par la FGE. L'enzyme catalyse l'oxydation d'un résidu Cys des sulfatases eucaryotes en FGly.

La FGE est localisée dans le réticulum endoplasmique et modifie la forme dépliée des sulfatases nouvellement synthétisées.

La détermination très récente de la structure cristallographique de la FGE dans différents états redox a permis d'identifier le site actif de l'enzyme et de proposer un mécanisme pour l'oxydation d'une Cys en FGly (Dierks *et al.*, 2005). FGE est une protéine monomérique adoptant une structure nouvelle, présentant peu d'éléments de structure secondaire (Figure 25 A).

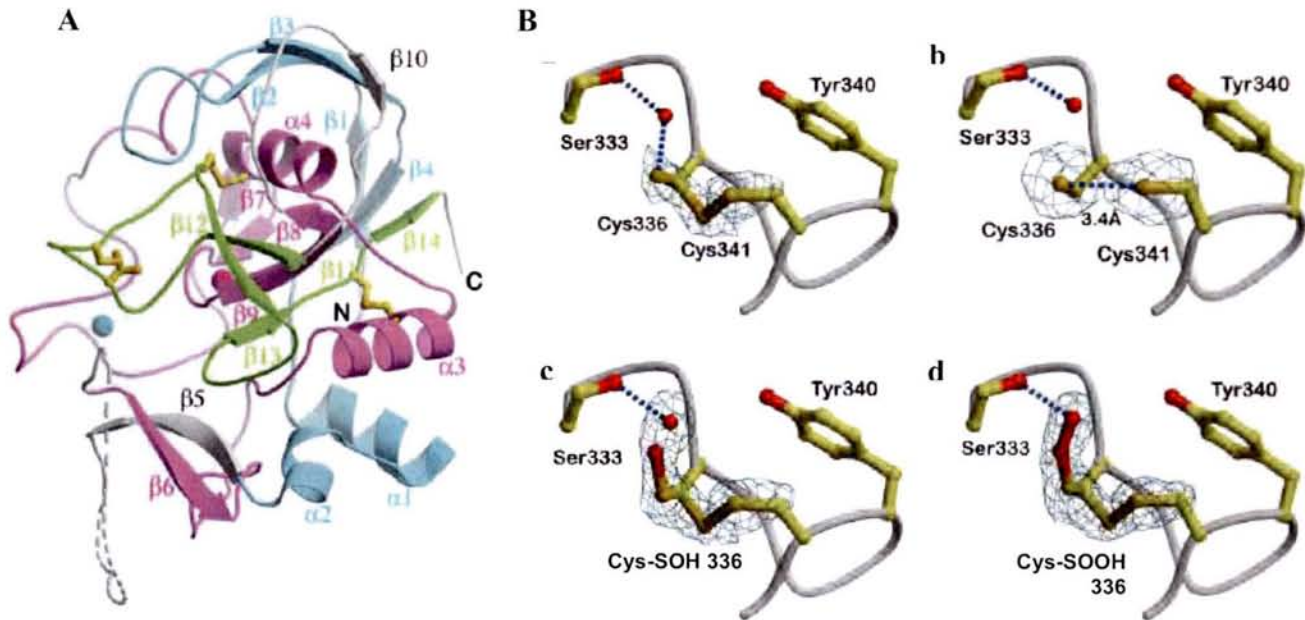


Figure 25 : Structure tridimensionnelle de la FGE et détails des différentes formes redox des Cys336 et 341 du site actif de l'enzyme. A) Architecture générale de FGE. Les six Cys de la protéine sont représentées en mode ball an stick. Quatre de ces Cys forment deux ponts disulfures. Les boules cyan et violette représentent deux ions Ca^{2+} . B) Plasticité structurale des Cys336 et 341 ; a) contribution de la forme réduite et de la forme oxydée disulfure ; b) forme réduite ; c) et d) deux modèles d'oxydation de la Cys336, compatibles avec la densité électronique observée : c) Cys-SOH et H_2O ou d) Cys-S-O-OH (d'après Dierks *et al.*, 2005).

Les six structures obtenues mettent en évidence la présence de deux Cys très sensibles à l'oxydation, en position 336 et 341. En plus de la résolution de la structure réduite de FGE, des cristaux de plus en plus âgés révèlent la formation sur la Cys336 d'une densité électronique attribuable à un acide sulfénique ou à un groupement hydroperoxyde Cys-S-OOH (Figure 25 B). La formation d'un pont disulfure entre les Cys336 et 341 a également été caractérisée structurellement.

La caractérisation dans le site actif de FGE d'un acide sulfénique et/ou d'un hydroperoxyde Cys-S-OOH, intermédiaires possibles, a conduit à la proposition d'un mécanisme de formation de FGly.

Ce mécanisme repose sur l'oxydation de la Cys à modifier (sur la sulfatase) en Cys-SOH, suivie d'une β -élimination de la fonction $-\text{OH}$ de cet acide sulfénique. Cette élimination nécessiterait une déprotonation du C_β de la Cys. Le thioaldéhyde formé est instable et subirait une hydrolyse spontanée en FGly et H_2S .

Le modèle propose qu'en absence de substrat, FGE se trouve sous forme oxydée, avec un pont disulfure intramoléculaire reliant les Cys336 et 341. La fixation du substrat, qui est une sulfatase dépliée, entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la Cys341 de FGE et la Cys substrat. La structure d'un tel intermédiaire a été obtenue très récemment (Roeser *et al.*, 2006). La Cys336 libre est alors oxydée par une molécule d'oxygène moléculaire, formant un adduit hydroperoxyde Cys-S-OOH. Ce peroxyde serait réduit en acide sulfénique Cys-SOH, nécessitant l'intervention d'un réducteur, avant que son groupement hydroxyle soit transféré sur la Cys de la sulfatase. Ce transfert aboutit à la formation d'un acide sulfénique sur la sulfatase et à la régénération du pont disulfure Cys336 Cys341 de FGE.

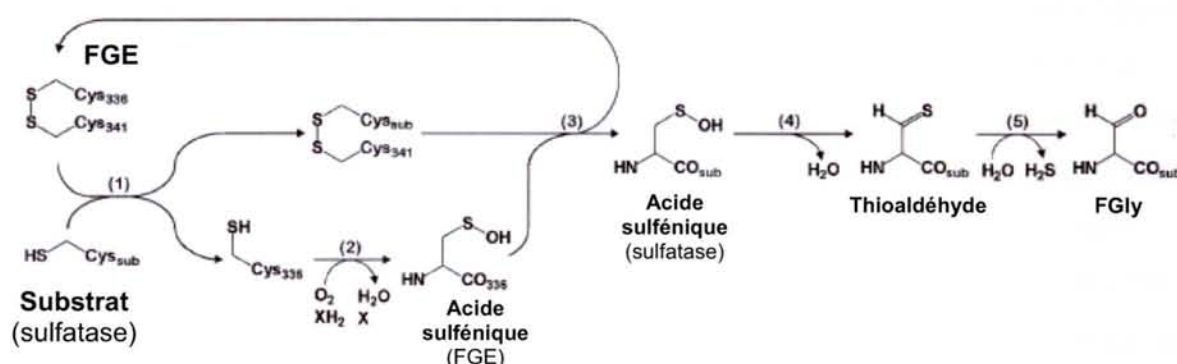
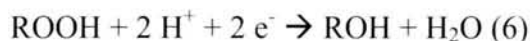


Figure 26 : Mécanisme catalytique proposé pour la FGE. (d'après Dierks *et al.*, 2005).

Des éléments structuraux et biochimiques suggèrent que la base impliquée dans la β -élimination de l'hydroxyle de l'acide sulfénique serait la Ser333. Ce résidu déprotoné viendrait arracher un proton sur le C_{β} de la Cys-SOH. Le thioaldéhyde formé est instable et subirait une hydrolyse spontanée en FGly et H_2S (Figure 26).

1.2.2.1.3 Peroxydases à Cys (Prx)

Bien que les enzymes impliquées dans la réduction des peroxydes, les catalases et peroxydases à hème, soient connues et étudiées depuis de nombreuses années, une nouvelle famille de peroxydases a été identifiée plus récemment. Il s'agit de peroxydases à Cys, dont le mécanisme repose sur une chimie similaire à celle utilisée par la Npx, faisant intervenir un acide sulfénique. Cette nouvelle famille de peroxydases, communément appelées peroxyrédoxines (Prx), est présente dans les trois règnes du vivant. Les Prx bactériennes et eucaryotes réduisent généralement une vaste gamme de peroxydes, incluant H_2O_2 , les hydroperoxydes organiques et le peroxydinitrite, selon la réaction 6 :



Ces enzymes sont fortement exprimées dans les cellules. Elles font partie des dix protéines les plus abondantes chez *E. coli* et représentent entre 0,1 et 0,8 % des protéines totales chez les cellules eucaryotes. Les Prx bactériennes jouent un rôle essentiel dans la défense cellulaire contre le stress oxydant induit par les peroxydes, en luttant contre leur accumulation dans la cellule. Chez les eucaryotes, les Prx remplissent une fonction supplémentaire, en tant que régulateurs de la voie de signalisation cellulaire médiée par H_2O_2 et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la différenciation ou la prolifération, et dans des pathologies neurodégénératives ou le cancer. Cet aspect sera développé dans le chapitre suivant.

Les Prx ne contiennent ni métal ni cofacteur redox autre que leur centre Cys. Les Prx peuvent être structurellement et fonctionnellement divisées en trois classes 1) les Prx typiques à deux Cys, 2) les Prx atypiques à deux Cys et, 3) les Prx à une Cys.

Toutes ces Prx catalysent la même réaction de réduction des peroxydes. Le mécanisme de cette réduction est composé de deux étapes. La première de ces étapes est commune aux trois classes de Prx et repose sur l'attaque nucléophile de la Cys sur le peroxyde, libérant l'alcool correspondant et formant un acide sulfénique sur cette Cys, dite peroxydasique (Figure 27).

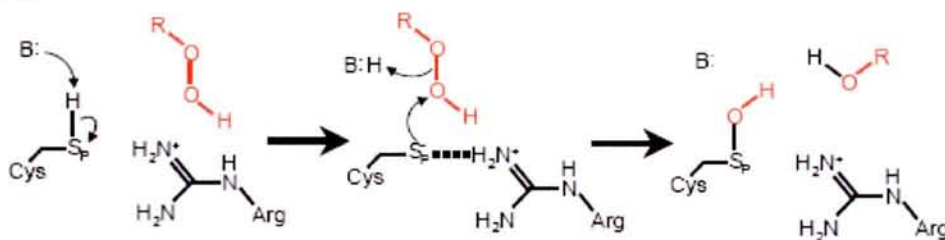


Figure 27 : Mécanisme de l'étape peroxydasique catalysée par les Prx. Une catalyse acido/basique est indispensable pour déprotoner la Cys puis protoner l'acide sulfénique et ainsi faciliter le départ de RO^- sous forme ROH .

La deuxième étape de régénération de la Cys peroxydasique, va différer selon la classe de Prx considérée.

Chez les Prx à deux Cys, un pont disulfure est formé entre la Cys peroxydasique et la deuxième Cys, appelée Cys de recyclage. Pour les Prx typiques, organisées en homodimère tête-bêche, la Cys de recyclage est située sur l'autre sous-unité. Pour les Prx atypiques, le mécanisme est identique, à la différence que la Cys de recyclage est située sur le même monomère (Figure 28). Le pont disulfure intra ou intermoléculaire est ensuite réduit par une

des nombreuses disulfure oxidoréductases spécifiques du type cellulaire considéré. On peut citer par exemple la Trx, la tryparédoxine, AhpF ou AhpD.

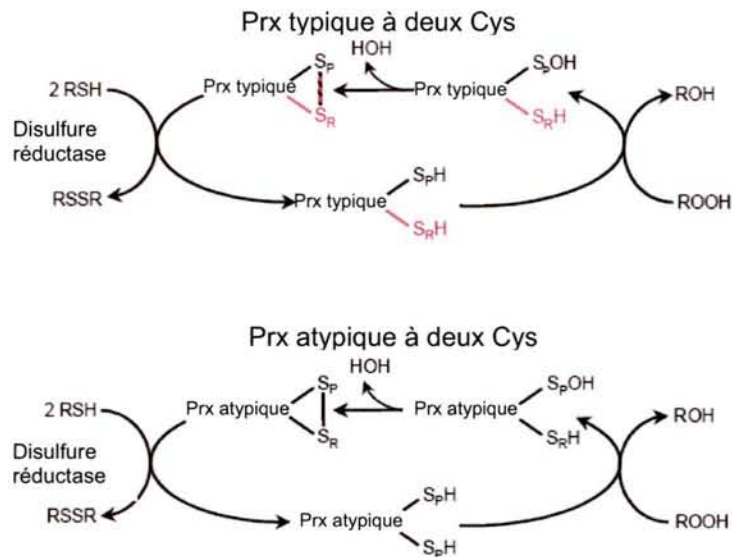


Figure 28 : Mécanisme catalytique des Prx typique et atypique à deux Cys (d'après Wood *et al.*, 2003c).

Chez les Prx à une Cys, la formation de pont disulfure étant impossible, l'acide sulfénique doit probablement être réduit par un réducteur à thiol de faible poids moléculaire. Cependant ce donneur d'électrons n'a pas encore été clairement identifié, bien que plusieurs molécules comme le glutathion, l'acide lipoïque ou la cyclophiline aient été proposées (Figure 29).

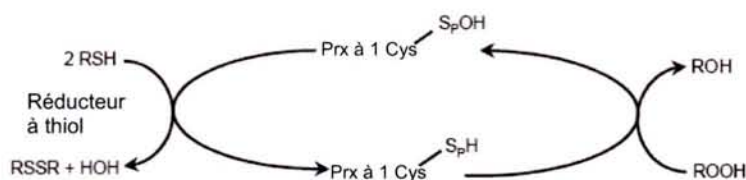


Figure 29 : Mécanisme catalytique des Prx à une Cys (d'après Wood *et al.*, 2003c).

Depuis 1998, les structures cristallographiques d'une douzaine de Prx ont été résolues. Elles sont très similaires, formant toutes un repliement classique de type Trx, complété par l'insertion de quelques éléments de structures secondaires additionnels. La différence structurale la plus frappante entre les représentants des trois classes de Prx provient de leur état d'oligomérisation. Les Prx atypiques à deux Cys sont monomériques alors que les Prx typiques à deux Cys et les Prx à une Cys forment des homodimères antiparallèles (α_2). Ces dimères ont la capacité de s'assembler pour former un édifice décamerique torique de type (α_2)₅ (Figure 30). Des analyses par ultracentrifugation analytique ont permis de montrer que la

variation de l'état oligomérique de ces Prx est liée au cycle catalytique, la forme réduite de la protéine adoptant une structure décamerique et la forme oxydée tendant à se dissocier en structure dimérique (Parsonage *et al.*, 2005 ; Wood *et al.*, 2002).

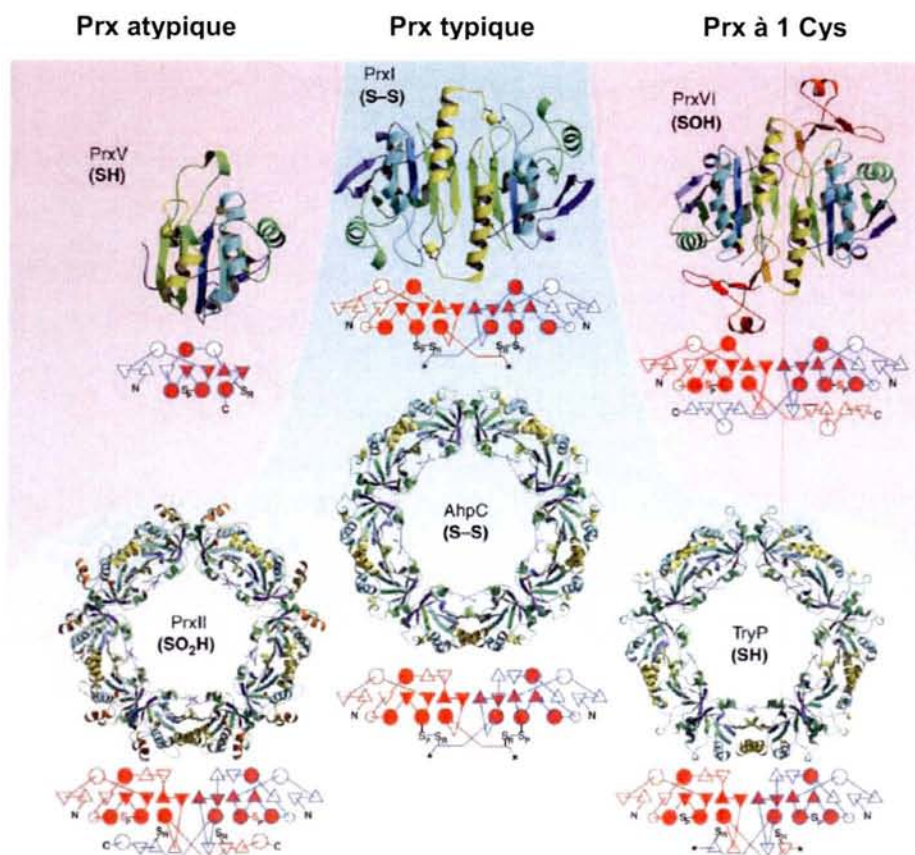


Figure 30 : Structure tridimensionnelle et organisation oligomérique des différentes classes de Prx (d'après Wood *et al.*, 2003c).

La structure du site actif des Prx est fortement conservée au sein des trois classes. Dans la forme réduite des Prx à deux Cys, la Cys peroxydasique est située dans le premier tour d'une hélice α , au fond d'une poche. Trois résidus conservés se trouvent dans l'environnement immédiat de cette Cys : Pro44, Thr48 et Arg127 (numérotation PrxII) (Figure 31 A). Sur cette base structurale, il a été proposé que le noyau pyrrolidine de Pro44 ait pour rôle de limiter l'accès de la Cys peroxydasique à la fois au solvant et au peroxyde puis de protéger l'acide sulfénique de la suroxydation par le substrat. Thr48 et Arg127 quant à eux, forment des liaisons H avec le soufre de la Cys peroxydasique. Ces deux résidus sont essentiels à la catalyse, leur remplacement entraînant une perte de l'activité peroxydase. Il a été proposé que Thr48 soit impliquée dans l'orientation du thiol de la Cys pour faciliter sa déprotonation par une base non identifiée et que la charge positive portée par Arg127

participe à la stabilisation du thiolate (Figure 27 et 31 A). Ainsi, le pKa de la Cys peroxydasique, qui n'a pas été déterminé, serait abaissé par rapport au pKa d'un thiol libre.

Par ailleurs, l'examen des structures de Prx à deux Cys a également révélé que les deux Cys peroxydasique et de recyclage sont distantes de plus de 10 Å. Cette observation suggère fortement la nécessité d'un changement conformationnel afin de rapprocher ces deux résidus pour permettre la formation du pont disulfure. La comparaison des structures de Prx réduites et oxydées met clairement en évidence cette réorganisation structurale, caractérisée par le remarquable dépliement des structures secondaires portant les deux Cys, en particulier du premier tour de l'hélice portant la Cys peroxydasique (Figure 31 B) (Wood *et al.*, 2003c). De plus, ce dépliement local est également impliqué dans la déstabilisation et la dissociation de la structure décamerique de ces Prx.

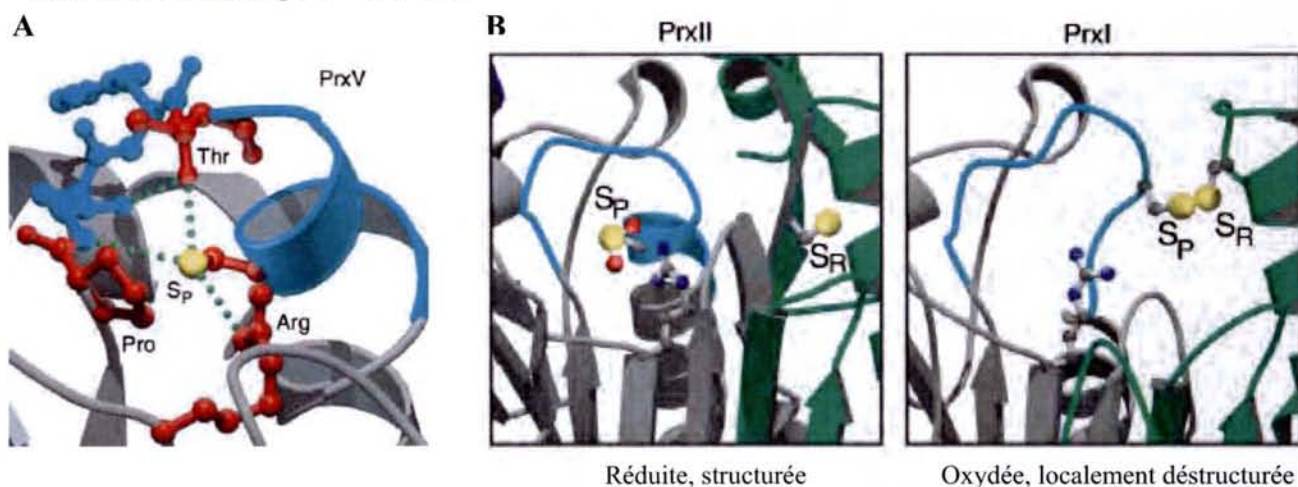


Figure 31 : Structures du site actif des Prx à deux Cys. A) Environnement de la Cys peroxydasique (Sp). B) Réorganisation structurale permettant la formation du pont disulfure (d'après Wood *et al.*, 2003c).

La résolution de la structure cristallographique de la forme oxydée d'une Prx à une Cys (Prx VI humaine) a confirmé l'oxydation de la Cys peroxydasique en acide sulfénique et mis en évidence sa stabilisation dans le site actif (Choi *et al.*, 1998). Deux interactions participent à cette stabilisation et impliquent les résidus His39 et Arg132, correspondant aux Thr44 et Arg127 des Prx à deux Cys (Figure 32). Les chaînes latérales de ces deux résidus sont bien positionnées pour former des liaisons H avec la fonction acide sulfénique, qui devrait probablement se trouver sous forme sulfénate, du fait de cet environnement électrostatique positif. Il a logiquement été proposé qu'un tel environnement puisse également stabiliser la forme thiolate de la Cys peroxydasique, de manière similaire à ce qui est observé pour la Npx

ou la Nox. Enfin, l'accessibilité de la Cys peroxydasique dans le site actif des Prx à une Cys est bien moindre que dans les Prx à deux Cys, empêchant la caractérisation chimique de l'acide sulfénique, et participe donc également à la stabilisation de l'acide sulfénique.

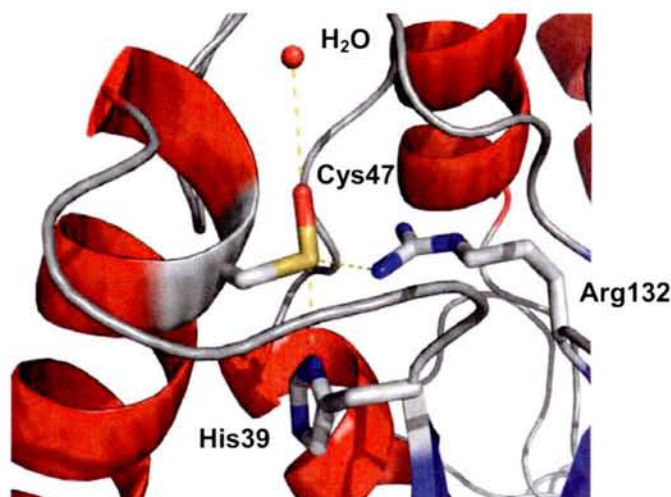


Figure 32 : Structure du site actif de la Prx VI humaine à une Cys et stabilisation de l'acide sulfénique (d'après Choi *et al.*, 1998).

Le modèle de Prx à deux Cys le mieux caractérisé biochimiquement et enzymatiquement est l'alkylhydroperoxyde réductase AhpC de *Salmonella typhimurium*. En particulier, l'intervention d'un intermédiaire acide sulfénique dans le mécanisme des Prx à deux Cys a été prouvée en générant un variant de cette Prx sans Cys de recyclage et donc incapable de former le pont disulfure. La réactivité de l'acide sulfénique a été mise à profit pour caractériser sa présence. La réactivité de l'atome de soufre de la fonction acide sulfénique a ainsi été décrite vis-à-vis 1) de composés nucléophiles tels que l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) (Ellis et Poole, 1997b) ou la 5,5-diméthyle-1,3-cyclohexanedione (dimédone) (Ellis et Poole, 1997a) et, 2) d'un composé électrophile, le 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). L'adduit formé entre l'acide sulfénique et la dimédone est uniquement caractérisable par spectrométrie de masse, n'étant pas chromophorique, à la différence de l'adduit formé avec le NBD-Cl, caractérisable par spectroscopie d'absorption et spectrométrie de masse (Figure 33).

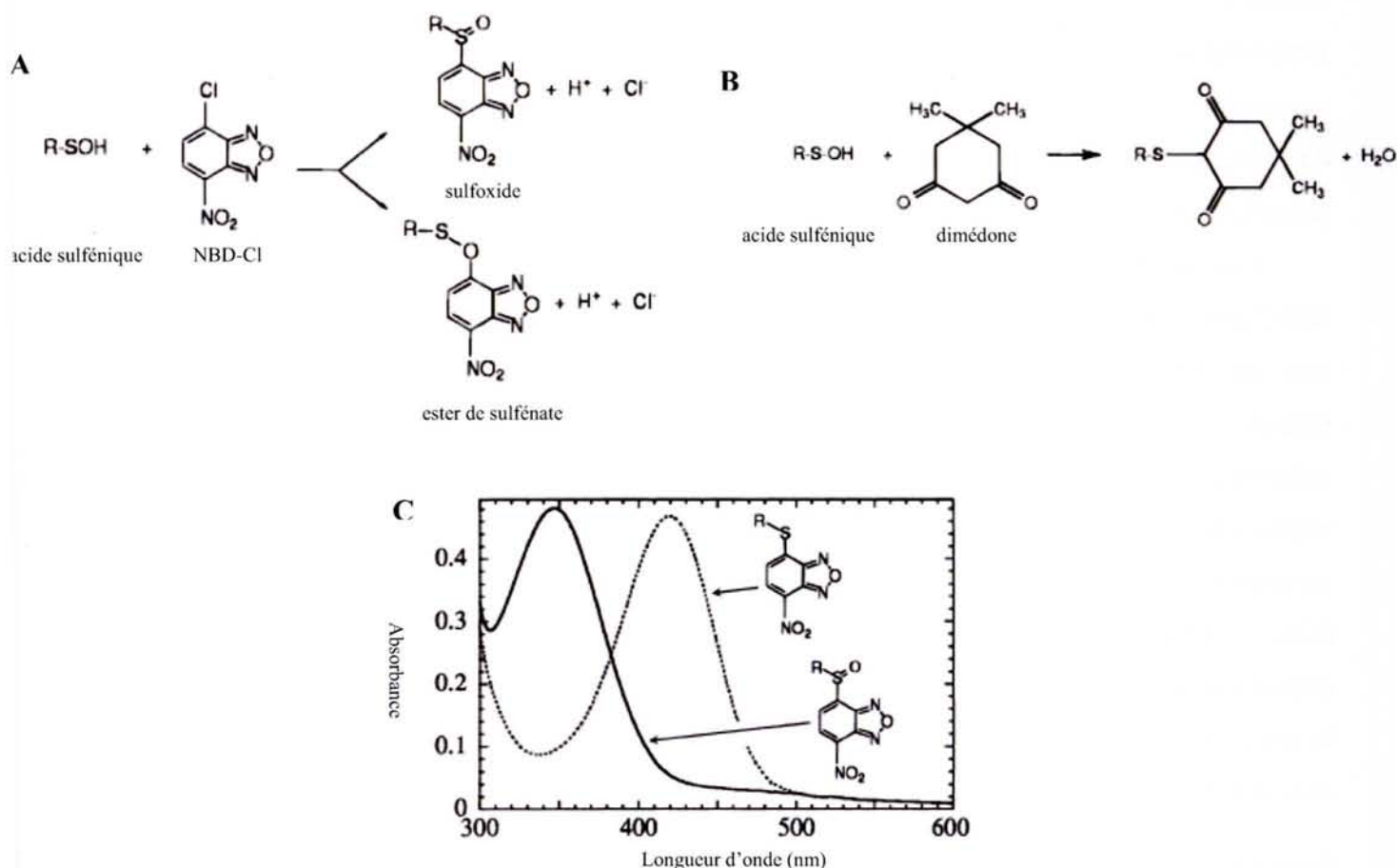


Figure 33 : Réaction entre un acide sulfénique et le NBD-Cl (A) ou la dimédone (B) et spectres d'absorbance des adduits formés en présence de NBD-Cl + R-SOH et NBD-Cl + R-SH (C) (d'après Ellis et Poole, 1997a).

1.2.2.2 Acide sulfénique et régulation redox enzymatique

1.2.2.2.1 Peroxyrédoxine eucaryote/Sulfirédoxine

Comme indiqué précédemment, les Prx à deux Cys assurent chez les eucaryotes, en plus de leur rôle anti-oxydant, une fonction de régulateurs de la voie de signalisation cellulaire médiée par H_2O_2 . En effet, bien que H_2O_2 soit une source de stress oxydant, il agit également en tant que messenger secondaire dans la transduction de signaux cellulaires. Il a été montré *in vivo*, dans des conditions de signalisation par les peroxydes, que les Prx I et II humaines sont inactivées par suroxydation de la Cys peroxydasique en acide sulfénique, $Cys-SO_2H$ (Rabilloud *et al.*, 2002).

Un modèle de régulation a été proposé, dans lequel les Prx jouent le rôle de modulateur de la réponse cellulaire suite à l'augmentation rapide de la concentration de peroxydes intracellulaires. En conditions normales, les Prx à deux Cys exprimées en grande quantité maintiennent une concentration intracellulaire très faible en peroxyde, empêchant tout

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

déclenchement de message de signalisation. L'augmentation de la concentration intracellulaire en peroxyde peut cependant produire suffisamment de peroxyde pour inactiver rapidement les Prx et conduire à un excès transitoire d' H_2O_2 , qui pourra alors jouer son rôle de messager cellulaire, en interagissant avec différentes protéines, comme par exemple les phosphatases qui sont sensibles aux peroxydes (Wood *et al.*, 2003b), voir paragraphe I.2.2.2.2.

Contrairement à leurs homologues eucaryotes, les Prx bactériennes à deux Cys, comme AhpC, sont bien moins sensibles à l'inactivation par les peroxydes, nécessitant la présence de cent fois plus de peroxydes pour observer une inactivation similaire. La comparaison des séquences et des structures cristallographiques de Prx eucaryotes et bactériennes sous formes réduites et oxydées a permis de mettre en évidence les facteurs structuraux et moléculaires responsables de la sensibilité aux peroxydes. Deux éléments caractéristiques sont présents uniquement dans les Prx sensibles : 1) insertion d'un motif GGLG et, 2) insertion d'une hélice supplémentaire contenant un motif YF. Dans la forme réduite des Prx eucaryotes, ces deux éléments structuraux viennent se placer au dessus de la Cys peroxydasique et rigidifient le site actif, rendant ainsi plus difficile les changements conformationnels requis pour former le pont disulfure (Figure 34A).

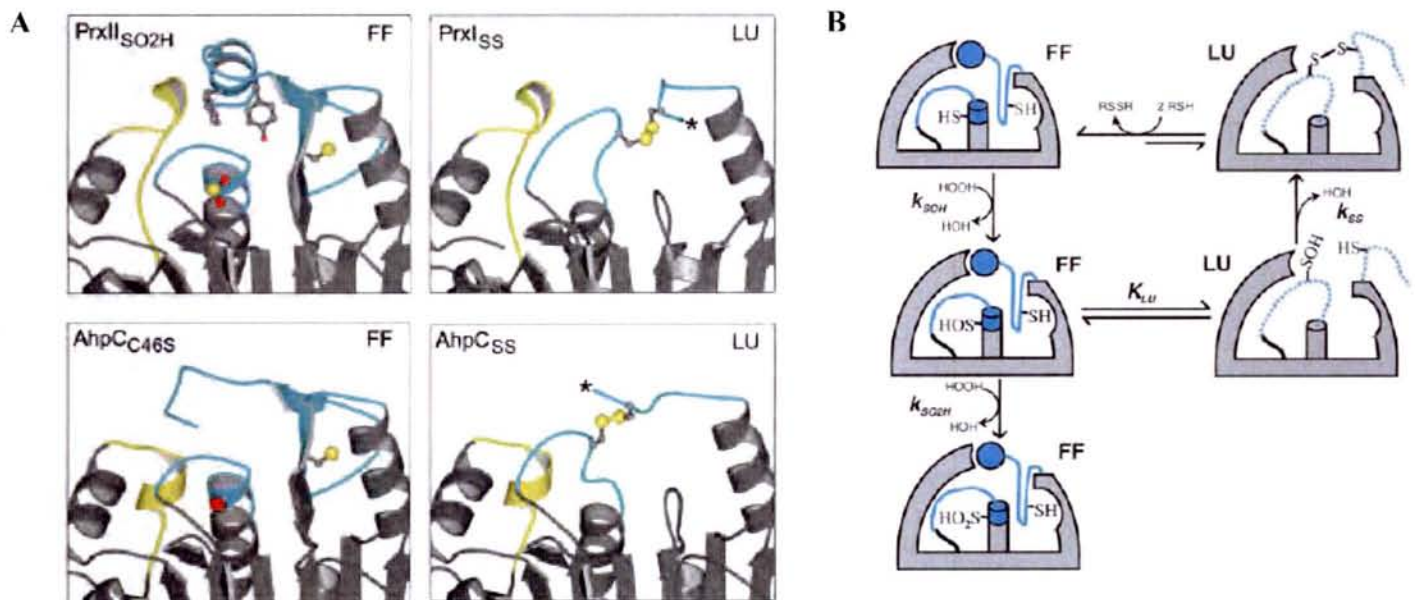


Figure 34 : Différences structurales entre sites actifs des Prx eucaryotes et bactériennes (A) et modèle du mécanisme des Prx eucaryotes rationalisant leur sensibilité à la suroxydation (B). A) Les deux cadres supérieurs représentent deux Prx humaines sous forme réduite, "structurée" (FF, fully folded), à gauche et sous forme oxydée, "localement déstructurée" (LU, locally unfolded), à droite. Les deux cadres inférieurs représentent AhpC sous forme réduite, "structurée", à gauche et sous forme oxydée, "localement déstructurée", à droite. Les régions colorées en bleu subissent un changement de conformation lors de la formation du pont disulfure. B) Mécanisme catalytique des Prx eucaryotes intégrant

explicitement les étapes de changement conformationnel entre forme structurée et localement déstructurée (d'après Wood *et al.*, 2003b).

Il a été proposé que cette stabilisation du site actif sous forme "structurée" ralentisse les dépliements locaux nécessaires à la formation du pont disulfure et entraîne l'exposition transitoire de l'intermédiaire acide sulfénique. Cette accumulation de l'acide sulfénique rend alors possible son oxydation par les peroxydes en acide sulfinique. En comparaison, dans les Prx bactériennes, les régions à proximité de la Cys sont bien plus flexibles (agitation thermique plus élevée de ces régions dans les structures cristallographiques), facilitant probablement les dépliements locaux nécessaires à la formation du pont disulfure (Figure 34B). Ainsi, il est clair que la sensibilité des Prx eucaryotes vis-à-vis de la suroxydation n'est pas une limitation due au mécanisme des Prx à deux Cys, mais bien une caractéristique acquise au cours de leur évolution.

Il a été montré récemment qu'une nouvelle classe d'enzyme est capable de réduire les Prx suroxydées à l'état d'acide sulfinique et ainsi de compléter le cycle de régulation par les Prx de la signalisation par H₂O₂. Cette protéine a été appelée sulfirédoxine (Srx) et nécessite la présence d'ATP. Un mécanisme a été récemment proposé par l'équipe de Tolédano (Biteau *et al.*, 2003), qui a été repris par l'équipe de Rhee. Ce mécanisme est basé sur l'activation de l'acide sulfinique par phosphorylation, étape catalysée par Srx (Figure 35) (Jeong *et al.*, 2006).

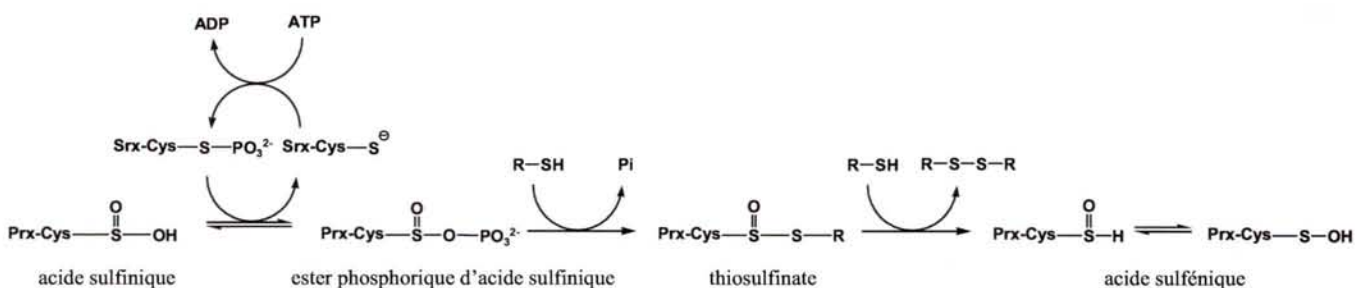


Figure 35 : Mécanisme catalytique de Srx proposé par Jeong *et al.*, 2006. L'acide sulfinique est d'abord activé par phosphorylation puis réduit en acide sulfénique par l'intervention de deux thiols, *via* un intermédiaire thiosulfinate.

I.2.2.2.2 Tyr Phosphatase

Comme mentionné précédemment, H₂O₂ peut être utilisé en tant que messager cellulaire secondaire. Les protéines Tyr phosphatases (PTP) sont l'une des familles de protéines

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

modifiées par cet oxydant. A titre d'exemple, l'équilibre redox cellulaire joue un rôle important dans les mécanismes régulant la fonction des facteurs de croissance. Les voies de transduction du signal dépendantes de la phosphorylation des Tyr ainsi que de H_2O_2 sont impliquées directement dans cette fonction cellulaire. Ainsi, l'incubation de lymphocytes T en présence d' H_2O_2 entraîne un taux de phosphorylation élevé des kinases de la famille Src (Nakamura *et al.*, 1994), cette réponse étant attribuée à l'oxydation et à l'inhibition réversible des PTP. La régulation redox des PTP est médiée par une boucle, la P-loop, contenant la séquence CX_5R portant la Cys catalytique nucléophile. L'environnement électrostatique de cette Cys favorise sa stabilisation sous forme thiolate, se traduisant par un pK_a abaissé (5,6-6,3) et la rend plus nucléophile et donc également plus sensible à l'oxydation. L'inactivation réversible des PTP implique l'oxydation transitoire de la Cys catalytique sous forme d'acide sulfénique. Cet intermédiaire Cys-SOH a été caractérisé à la fois biochimiquement, notamment en utilisant le NBD-Cl (Denu et Tanner, 1998), et structuralement ; la résolution de la structure tridimensionnelle ayant été récemment obtenue par radiocristallographie (van Montfort *et al.*, 2003). Afin d'éviter l'éventuelle suroxydation de l'acide sulfénique, deux stratégies ont été adoptées par les PTP pour convertir la Cys-SOH en une fonction plus stable. La première, mise en évidence chez la phosphatase PTP1B, repose sur la formation d'un cycle à cinq atomes *via* la formation d'une liaison sulfénylamide (-N-S-, ou sulfénamide) entre l'atome de soufre de la Cys215 catalytique et un groupement NH amide de la Ser216 adjacente (Salmeen *et al.*, 2003 ; van Montfort *et al.*, 2003) (Figure 36). C'est la première fois qu'une telle modification est observée dans une protéine.

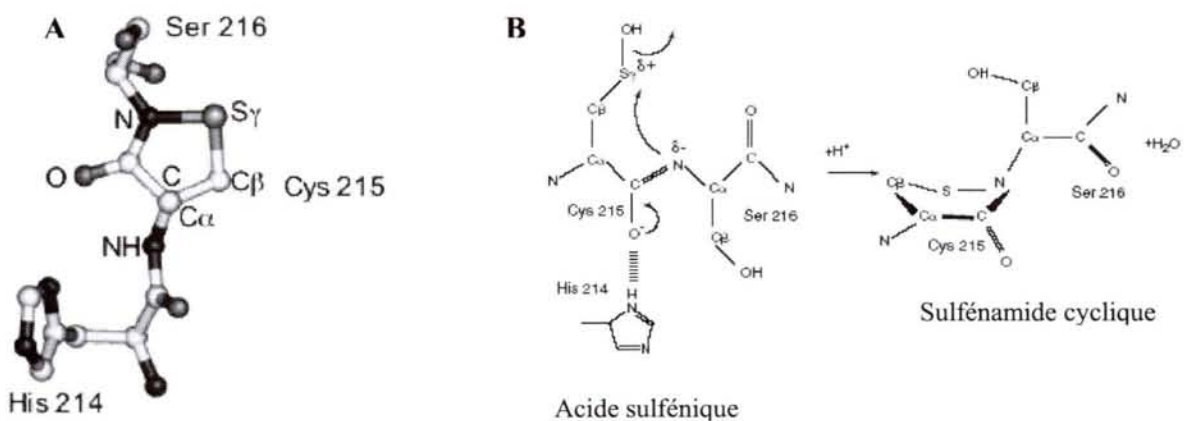


Figure 36 : Structure tridimensionnelle et mécanisme de formation du groupement sulfénamide dans le site actif de PTP 1B. A) Structure détaillée du cycle sulfénamide. B) Mécanisme proposé de formation du sulfénamide cyclique à partir de la Cys215 oxydée en acide sulfénique (d'après Salmeen et Barford, 2005).

La seconde, mise en évidence chez la phosphatase Cdc25B, repose plus classiquement sur la formation d'un pont disulfure intramoléculaire, avec une seconde Cys à proximité de la Cys-SOH (Buhrman *et al.*, 2005 ; Sohn et Rudolph, 2003). La régulation des PTP est permise par la réduction de ces deux formes oxydées, sulfénamide et disulfure, par différents thiols (Trx pour Cdc25B, GSH pour PTP1B). Cependant, ces deux mécanismes de protection de la Cys-SOH n'empêchent pas totalement la possibilité d'une suroxydation irréversible de l'acide sulfénique. En effet, des structures tridimensionnelles de PTP1B et Cdc25B présentant une Cys catalytique sous forme acide sulfinique et sulfonique ont été obtenues.

I.2.2.2.3 Nitrile hydratase

Les nitriles hydratases (NHases) sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydratation de la fonction nitrile en amine correspondante (Réaction 7).



Les NHases sont notamment utilisées pour la production industrielle d'acrylamide ou de nicotinamide et dans le traitement de déchets chimiques ou de dégradation d'herbicides (Kobayashi et Shimizu, 1998).

Les NHases sont des métalloenzymes hétérotétramériques de type $(\alpha\beta)_2$ (Figure 37A) et peuvent être divisées en deux types, contenant soit un centre Fe^{III} non hémique, soit un centre Co^{III} non corrinoïde. Certaines NHases à Fe ont la propriété d'être photoactivables, c'est-à-dire d'être inactives dans l'obscurité et activées par la lumière. Le mécanisme de photoactivation repose sur la fixation d'une molécule de monoxyde d'azote (NO) sur le centre à Fe dans la forme inactive, la photodissociation du NO convertissant l'enzyme sous forme active. La détermination par radio cristallographie de la structure tridimensionnelle à haute résolution de la forme inactive de la NHase de *Rhodococcus* a permis d'identifier les ligands de l'atome de Fe (trois atomes de soufres des chaînes latérales des Cys109, 112 et 114 et deux atomes d'azotes de la chaîne principale de Ser113 et de Cys114) ainsi que le mode de fixation de la molécule de NO (Nagashima *et al.*, 1998). Par ailleurs cette structure, complétée par des résultats de spectrométrie de masse (Tsujimura *et al.*, 1997), a dévoilé de manière inattendue la modification oxydative des Cys112 et Cys114, respectivement sous forme d'acide sulfinique et d'acide sulfénique (Figure 37B).

forme déprotonée, sulfinate et sulfénate. La détermination de l'état de protonation de ces groupements a été réalisée par spectroscopie Raman de résonance et a confirmé cette hypothèse (Noguchi *et al.*, 2003).

Sur la base des structures tridimensionnelles du site actif des NHases, deux mécanismes d'hydratation des nitriles ont été proposés (Figure 38) (Huang *et al.*, 1997).

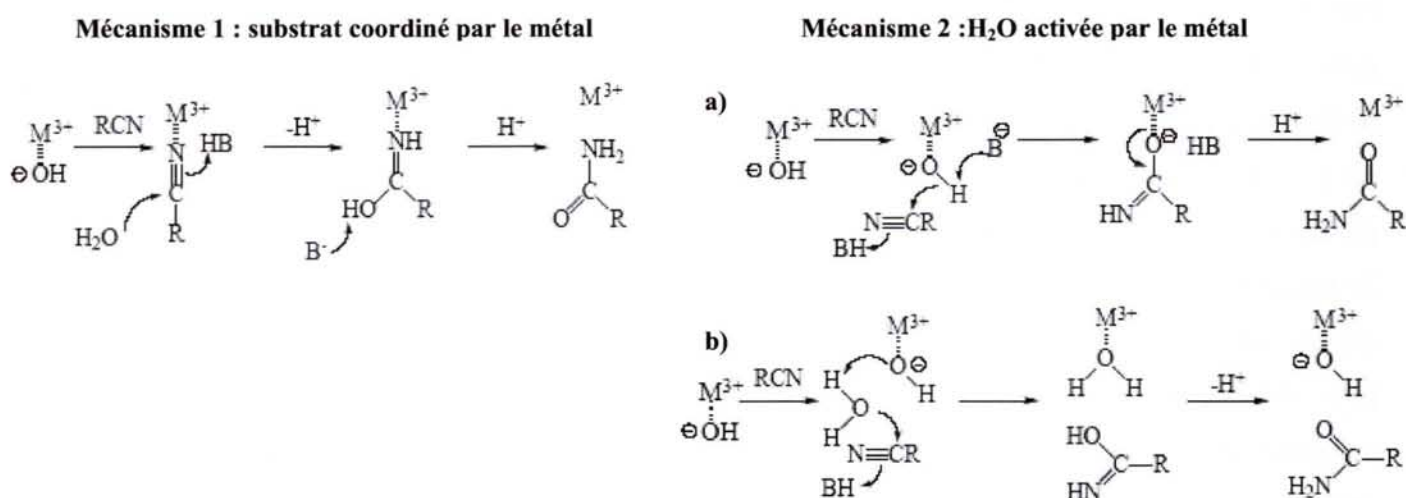


Figure 38 : Proposition de mécanismes d'hydratation des nitriles catalysés par la NHase. Voir ci-dessous pour plus de détails (d'après Huang *et al.*, 1997).

1) le substrat nitrile vient coordonner le métal, ce dernier agit en tant qu'acide de Lewis pour activer la fonction nitrile et faciliter l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur l'atome de carbone de la fonction nitrile ou, 2) une molécule d'eau sous forme protonée ou déprotonée vient coordonner le métal, et attaque directement le carbone de la fonction nitrile (a) ou, alternativement, active une deuxième molécule d'eau, agissant à son tour comme nucléophile (b). Dans le cadre du premier mécanisme, il a été proposé que la molécule d'eau soit activée par les fonctions Cys-SO₂⁻ et Cys-SO⁻, jouant alors un rôle de catalyseur basique. Dans le cadre du deuxième mécanisme, les fonctions sulfinate et sulfénate pourraient être impliquées dans le positionnement et l'activation de la molécule d'eau nucléophile.

I.2.2.2.4 Protéine S100A8 murine

Les protéines S100 sont de petites protéines (10 kDa) régulatrices fixant le calcium et intervenant notamment dans la régulation des kinases, la suppression de la progression

tumorale, l'embryogenèse ou encore la migration cellulaire. Ces protéines forment des homodimères non covalents.

La protéine S100A8 (A8) est une protéine cytoplasmique très abondante dans les neutrophiles, qui est excrétée par les macrophages en réponse à un stimulus inflammatoire. A8 est un puissant chimioattractant pour les neutrophiles et les monocytes. L'acide hypochloreux (HOCl) étant un oxydant majeur produit par la myeloperoxydase lors de l'activation des neutrophiles et des macrophages, l'oxydation de A8 est fortement probable et potentiellement délétère pour sa fonction physiologique. Ainsi, l'oxydation médiée par Cu^{2+} de l'unique Cys de A8 (Cys41) entraîne la formation d'un homodimère lié covalent par un pont disulfure et la perte de l'activité biologique de la protéine. La caractérisation des produits de l'oxydation de A8 par HOCl a permis de mettre en évidence de manière inattendue la formation de liaisons sulfinamides, $-\text{SO}-\text{NH}-$, correspondant à un sulfénamide oxydé, entre la Cys41 et des résidus Lys. La caractérisation biochimique transitoire d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys41 suggère fortement que la formation de ce sulfinamide procède *via* l'oxydation initiale de la Cys sous forme Cys-SOH puis par l'attaque nucléophile de l'amine d'un résidu Lys sur l'acide sulfénique (Figure 39) (Raftery *et al.*, 2001).

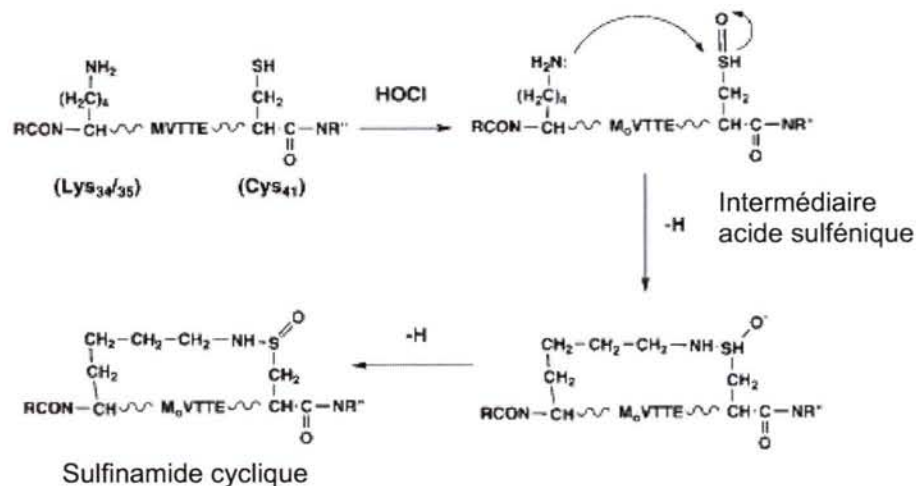


Figure 39 : Mécanisme de formation du groupement sulfinamide au sein de la protéine S100A8 (d'après Raftery *et al.*, 2001).

L'oxydation de A8 sous forme de sulfinamide entraîne un état monomérique de la protéine, mais pas la perte de la fonction chemoattractante de la protéine. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que les différentes modifications redox de A8 représentent un mécanisme de régulation contrôlant le recrutement des leucocytes provoqué par A8.

I.2.2.2.5 Albumines Sériques Humaine et Bovine

L'albumine sérique humaine (HSA) est la protéine plasmatique la plus abondante, présente à une concentration d'environ 0,6 mM. La HSA est impliquée notamment dans la maintenance de la pression osmotique ainsi que dans le transport de plusieurs composés (acides gras, hormones). Il a été proposé que l'albumine puisse jouer un rôle antioxydant, du fait de sa réactivité avec différentes espèces oxydantes. Cette réactivité est permise par la présence de la Cys34, seul thiol libre de la HSA et représentant à lui seul près de 80 % des thiols plasmatiques.

La réaction entre HSA et différents composés tels que NO, le peroxydant ou H₂O₂, entraîne l'oxydation de la Cys34 sous forme d'acide sulfénique. La formation de Cys-SOH dans la HSA a été caractérisée biochimiquement grâce à sa réactivité vis-à-vis de réactifs tels que le NBD-Cl, la dimédone ou l'arsenite (Carballal *et al.*, 2003 ; DeMaster *et al.*, 1995 ; Kratochwil *et al.*, 1998). Cet acide sulfénique peut ensuite réagir avec des thiols de faibles poids moléculaires, tels que le GSH, pour former un pont disulfure mixte HSA-S-S-R, représentant jusqu'à 25 % de la HSA circulante.

La stabilisation de la Cys34-SOH a été attribuée à l'absence d'autres Cys à proximité de la position 34 et à des facteurs stériques empêchant la formation de ponts disulfure intermoléculaires. En effet, l'examen de la structure tridimensionnelle de la HSA montre que la Cys34 est située dans une crevasse hydrophobe, dont l'accès au solvant semble être limité par la chaîne latérale du résidu Tyr84, qui contribue également à l'hydrophobie du microenvironnement de la Cys34 (Figure 40).

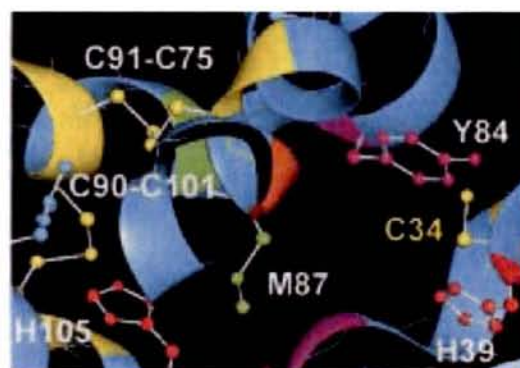


Figure 40 : Représentation de l'environnement de la Cys34 au sein de la structure de l'albumine sérique humaine. Les résidus Tyr84 et His39 sont supposés être impliqués dans la stabilisation de l'acide sulfénique formé sur la Cys34 (d'après Kratochwil *et al.*, 1998).

Du fait de la stabilisation de la forme thiolate de la Cys34 ($pK_a = 5-7$), il a été proposé que la forme oxydée stabilisée au sein de HSA soit plutôt la forme déprotonée Cys-SO⁻, le résidu His39 étant bien positionné pour assurer la stabilisation de ce sulfénate.

La réactivité redox de HSA a pris une nouvelle importance assez récemment par la mise en évidence de son implication dans l'activation réductrice de composés iodés analogues de l'anticancéreux cisplatine ($cis[Pt^{(IV)}Cl_2(NH_3)_2]$), de type $[Pt(en)(OH)_2I_2]$. L'intérêt porté à cette réaction repose sur l'observation que les composés anticancéreux comme le cisplatine sont activés par réduction dans le plasma sanguin. Un mécanisme réactionnel a été proposé (Figure 42) qui repose sur l'attaque nucléophile du thiolate de la Cys34 sur l'un des ligands iodo, formant un intermédiaire Cys-SI. Cet intermédiaire serait ensuite hydrolysé en Cys-SOH (Kratochwil *et al.*, 1998).

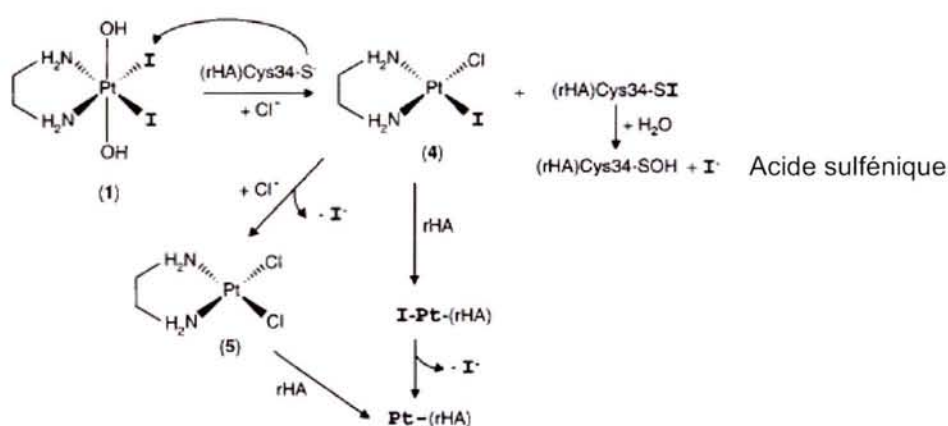


Figure 41 : Mécanisme de réduction de composés du type $[Pt(en)(OH)_2I_2]$ par l'albumine sérique humaine et formation concomitante d'un acide sulfénique sur la Cys34 (d'après Kratochwil *et al.*, 1998).

Il a été montré très récemment que l'oxydation de la BSA, l'homologue bovin de la HSA, par le nitroxyl (NOH) entraîne la formation d'un cycle intramoléculaire, *via* la création d'une liaison sulfinamide, de manière analogue à l'observation faite sur la protéine S100A8 (Shen et English, 2005). Bien que ne faisant à priori pas intervenir d'intermédiaire acide sulfénique, mais plutôt de type N-hydroxysulfénamide, il s'agit d'un nouvel exemple de mécanisme de formation de sulfinamide au sein d'une protéine.

1.2.2.3 Régulation redox de facteurs de transcription

Comme décrit précédemment, le concept émergent de régulation redox est renforcé par de nombreuses preuves expérimentales indiquant que l'état redox cellulaire influence et

régule différents aspects de la fonction cellulaire. Ainsi, le mécanisme d'activation de plusieurs régulateurs transcriptionnels repose sur l'oxydation de résidus Cys au sein de ces protéines.

I.2.2.3.1 Facteurs bactériens (OxyR/OhrR)

OxyR est fréquemment cité comme l'exemple caractéristique de la régulation redox d'un facteur de transcription. En réponse à H₂O₂, OxyR active l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la défense cellulaire antioxydante. Cependant, la nature exacte des événements redox contrôlant son activité est devenue le centre de récentes controverses.

La formation d'un acide sulfénique stable a initialement été proposée comme étant l'origine moléculaire de l'activation de OxyR (Storz *et al.*, 1990). Il fut ensuite proposé que cet acide sulfénique était un intermédiaire réagissant avec une seconde Cys pour former un pont disulfure, identifié par spectrométrie de masse et par radiocristallographie (Choi *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 1998). Ce modèle a été remis en question récemment par la mise en évidence de multiples formes oxydées, -SNO (nitroso), -SOH, -S-SG (glutathionylée) d'OxyR ayant une capacité activatrice (Kim *et al.*, 2002). Il semble tout de même clair que la formation d'un acide sulfénique soit impliquée au moins en partie dans l'activation d'OxyR.

L'étude du répresseur OhrR a permis de conforter l'implication d'un acide sulfénique fonctionnel dans un régulateur transcriptionnel. Sous forme réduite, OhrR vient se fixer sur la région promotrice du gène codant la peroxydase Ohr, empêchant ainsi son expression (Fuangthong *et al.*, 2001 ; Hong *et al.*, 2005). L'ajout de peroxyde entraîne la dissociation de ce répresseur et induit l'expression de l'enzyme. Chez *Bacillus subtilis*, l'oxydation en acide sulfénique du seul résidu Cys de la protéine OhrR a été montrée grâce à sa réactivité avec le NBD-Cl (Fuangthong et Helmann, 2002). Il est probable que cette oxydation réversible soit le déclencheur de la dissociation du répresseur. Chez *Xanthomonas campestris*, la présence d'un deuxième résidu Cys permet la formation d'un pont disulfure à partir de l'intermédiaire Cys-SOH (Panmanee *et al.*, 2006).

I.2.2.3.2 Facteurs eucaryotes (Yap1)

Bien que basée sur des résultats expérimentaux indirects, l'implication d'acides sulféniques fonctionnels a été proposée en tant qu'intermédiaires clés de la régulation redox

Introduction : Sulfoxydes et acides sulféniques

de facteurs de transcription tels que Fos et Jun, la protéine E2 du papillomavirus bovin ou encore la sous-unité NF- κ B p50. Il reste encore à mettre en évidence biochimiquement ou structuralement la formation de ces acides sulféniques.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Yap1 est un facteur de transcription contrôlant l'activation de gènes codant des enzymes impliquées contre le stress oxydant. L'activation de Yap1 repose indirectement sur la formation d'un acide sulfénique. En effet, la peroxydase à Cys Gpx3 joue en plus de son rôle dans la défense antioxydante, le rôle de senseur de stress oxydant et d'activateur de Yap1. De la même manière que pour les Prx, en présence de peroxyde, un acide sulfénique est formé dans le site actif de Gpx3, une deuxième Cys pouvant ensuite venir former un pont disulfure. Cependant, cet intermédiaire Cys-SOH a probablement une durée de vie suffisante pour conduire à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire avec une Cys de Yap1. Le complexe Gpx3-Yap1 ainsi formé subit alors un échange de pont disulfure *via* l'attaque d'une deuxième Cys de Yap1 (Delaunay *et al.*, 2002). Le facteur de transcription est alors oxydé sous forme de pont disulfure. Cette oxydation est supposée modifier la conformation du signal d'export nucléaire de Yap1 et déclencher son adressage au noyau, où il pourra jouer son rôle de facteur de transcription.

PARTIE II : OXYDATION DES METHIONINES ET CONSEQUENCES POUR LA FONCTION DES PROTEINES

Le stress oxydant auquel peut être soumise toute cellule peut être défini comme une situation de déséquilibre entre la production de composés oxydants et leur élimination par les systèmes de défense antioxydants. Un stress oxydant peut donc être provoqué soit par une augmentation de la production d'oxydants, soit par la diminution de l'efficacité des systèmes antioxydants.

Helmut Sies introduisit ce terme de stress oxydant en 1985 et le définit comme une perturbation de la « balance » entre prooxydant et antioxydant en faveur des premiers, conduisant à des dommages potentiels pour la cellule.

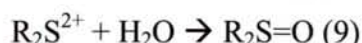
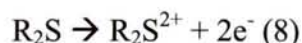
Les composés oxydants biologiques sont majoritairement des Formes Activées de l'Oxygène (FAO). Ces FAO sont produites en faibles quantités par les organismes aérobies,

leur production pouvant être augmentée en réponse à diverses stimulations exogènes (rayonnement UV, solvant, hyperoxie, réponse immunitaire).

Les FAO sont principalement des produits de la réduction de O₂ et incluent des composés radicalaires, tels que l'anion superoxyde O₂^{•-} et le radical hydroxyle HO[•], ainsi que des composés non radicalaires, tels que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et l'acide hypochloreux HOCl.

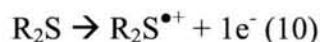
II.1 Oxydation de la Met par les FAO

Deux voies majeures d'oxydation de la Met peuvent être différenciées, les processus d'oxydation à un électron d'une part, et les processus à deux électrons d'autre part. Formellement, l'oxydation à deux électrons d'un sulfure forme un di-cation (Réaction 8). En milieu aqueux, ce di-cation est transformé en sulfoxyde correspondant (Réaction 9).



Plusieurs oxydants à deux électrons sont capables d'oxyder ainsi directement la Met (HOCl, H₂O₂, ROOH, ONOOH).

L'oxydation à un électron d'un sulfure forme un radical cation (Réaction 10). C'est une espèce chimique extrêmement instable, qui peut se convertir en une série d'intermédiaires et de produits.



L'oxydation à un électron de ce radical cation conduit au dication vu précédemment. Dans les paragraphes suivants, les mécanismes d'oxydation à un ou deux électrons de la Met en MetSO par les FAO formées en conditions de stress oxydant seront décrits brièvement. L'oxydation de la Met en sulfone ne sera pas traitée. Cette oxydation est possible mais nécessite des conditions drastiques (Pour revue, voir Schoneich, 2005).

II.1.1 Radical hydroxyle

Introduction : Oxydation des Méthionines

Une caractéristique importante des réactions entre radical hydroxyle (HO^\bullet) et sulfure réside dans le fait qu'il s'agit d'oxydations à un électron.

La première étape de la réaction entre HO^\bullet et un sulfure est son addition sur l'atome de soufre, formant transitoirement un radical hydroxysulfuranyl (Réaction 11).



Ce radical hydroxysulfuranyl est plutôt instable, à moins d'être stabilisé par des liaisons H. Sa réactivité au sein d'un peptide ou d'une protéine est particulièrement complexe, impliquant en particulier la déshydratation du radical hydroxysulfuranyl et la formation d'intermédiaires radical cations à liaison à trois électrons de type $\text{S}:\text{N}$ ou $\text{S}:\text{O}$ (deux électrons dans une orbitale σ liante, un électron dans une orbitale σ^* antiliante). Au sein d'une protéine, de tels intermédiaires peuvent évoluer vers différentes modifications, notamment le "clivage" de la chaîne principale.

Un sulfoxyde n'est formé qu'en présence d' O_2 , de multiples mécanismes réactionnels étant envisageables. Il a été montré qu'au sein d'un peptide, l'intermédiaire radical cation de type $\text{S}:\text{N}$ peut réagir avec O_2 pour former un azasulfonium, hydrolysable en sulfoxyde (Miller *et al.*, 1998).

Le radical hydroxysulfuranyl peut aussi réagir directement avec O_2 pour former un intermédiaire radical peroxy (Schoneich et Bobrowski, 1994). Ce radical peroxy peut ensuite réagir *via* une oxydation à deux électrons pour former un sulfoxyde. Il est intéressant de noter que dans ce cas, l'oxygène du sulfoxyde ne provient pas du peroxyde, indiquant l'implication d'une molécule d'eau.

II.1.2 Peroxyde d'hydrogène

La réaction de H_2O_2 avec la Met est un processus d'oxydation à deux électrons, résultant en un transfert formel d'oxygène (Réaction 12).



Ce mécanisme est considéré comme une réaction SN_2 accompagnée de la rupture hétérolytique de la liaison O-O. Des calculs récents portant sur l'étude théorique de l'oxydation du DMS par H_2O_2 en présence de molécules d'eau ont conduit à proposer un

mécanisme impliquant plusieurs molécules d'eau dans la stabilisation de l'état de transition de la réaction (Chu et Trout, 2004). La réaction se produit *via* l'allongement de la liaison O-O de H₂O₂ et la réduction de la distance S-O, entraînant la rupture de la liaison O-O et la formation de la liaison S-O. Une distribution de charge est observée entre les deux oxygènes de H₂O₂ lors de cette réaction. Deux à trois molécules d'eau stabilisent cette séparation de charge présente au niveau de l'état de transition, *via* des interactions spécifiques incluant une polarisation locale et l'établissement de liaisons H (Figure 42). Le transfert d'hydrogène encore porté par l'oxygène du sulfoxyde vers l'hydroxyle issu de H₂O₂ se produit après l'état de transition.

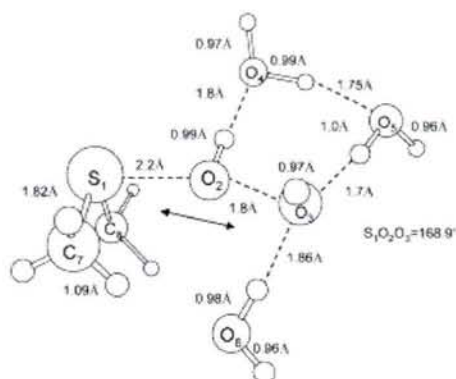


Figure 42 : Représentation de l'état de transition de la réaction d'oxydation du DMS par H₂O₂. Dans ce modèle, trois molécules d'eau stabilisent la distribution de charge induite par la séparation entre les deux oxygènes de H₂O₂ (O₂ et O₃) (d'après Chu et Trout, 2004).

Ce modèle est en accord avec l'observation expérimentale de la non-variation de la vitesse de cette oxydation en fonction du pH, aucun proton supplémentaire n'étant nécessaire dans le modèle. Enfin, ce modèle est conforté par la mise en évidence d'une bonne corrélation entre les vitesses d'oxydation par H₂O₂ des quatre Met d'une protéine modèle (le "granulocyte colony-stimulating factor") et la présence de molécule d'eau à proximité immédiate des soufres de ces Met (Chu *et al.*, 2004).

Par ailleurs, un rôle catalytique potentiellement important a été attribué au dioxyde de carbone. En effet, la perhydratation réversible du CO₂ par H₂O₂ génère des ions peroxomonocarbonates, HCO₄⁻, capables d'oxyder la Met 100 fois plus rapidement que H₂O₂.

II.1.3 Peroxynitrite

Introduction : Oxydation des Méthionines

Le peroxydinitrite, ONOO^- , et l'acide peroxydinitreux, ONOOH , oxydent la Met en MetSO. Cette oxydation se déroule selon un mécanisme complexe, aboutissant majoritairement à l'oxydation à deux électrons de la Met en MetSO.

Récemment, il a été proposé un mécanisme réactionnel, initié par l'attaque nucléophile du soufre de la Met sur l'azote électrophile de l'acide peroxydinitreux. Cet adduit intermédiaire perdrait un groupement hydroxyle avant l'addition d'une molécule d'eau, libérant la MetSO et le nitrite (Perrin et Koppenol, 2000) (Figure 43).

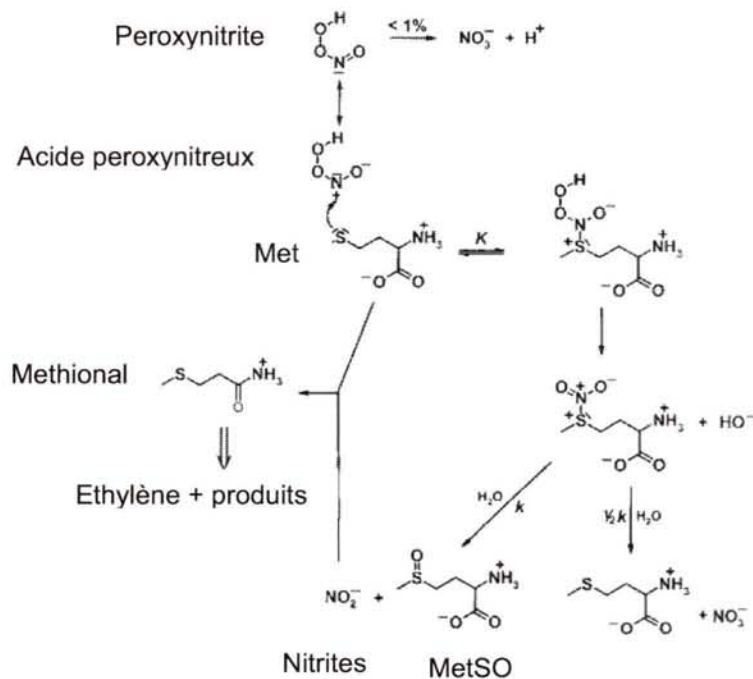


Figure 43 : Mécanisme d'oxydation de la Met par le peroxydinitrite (d'après Perrin et Koppenol, 2000).

Cette étude suggère que les nitrites formés lors de cette réaction oxydent la Met *via* un processus à un électron et entraînent la formation de produits de dégradation comme l'éthylène ou le méthional. L'apparition de ces produits avait conduit antérieurement à la proposition d'un mécanisme complexe d'oxydation à un électron de la Met par le peroxydinitrite (Pryor *et al.*, 1994).

II.2 Conséquences de l'oxydation des Met

Il est bien établi que l'oxydation des chaînes latérales de résidus au sein d'une protéine peut entraîner des changements de conformation ou un dépliement de la protéine, et avoir des

conséquences importantes sur sa fonction biologique. Ces observations s'appliquent au cas de la Met, dont la chaîne latérale est particulièrement hydrophobe. Ainsi, les Met peuvent être présentes au sein de régions hydrophobes des protéines et leur oxydation en sulfoxydes, fonction polaire et hydrophile, crée une perturbation déstabilisatrice tendant à modifier la structure de la protéine afin d'amener ces sulfoxydes dans un environnement plus polaire.

L'oxydation des Met en MetSO peut être considérée comme une modification post-traductionnelle non enzymatique des protéines. Cette modification est impliquée notamment dans la modulation, voire même la perte de l'activité des protéines. Récemment, il a été proposé que l'oxydation des Met en MetSO puisse aussi jouer un rôle dans le mécanisme de maladies neurodégénératives. Par ailleurs de par leur sensibilité à l'oxydation, les Met peuvent agir en temps que pièges à FAO. Enfin, il a été montré que l'oxydation des Met fait partie des signaux d'adressage des protéines suroxydées vers les voies de dégradation.

II.2.1 Implication dans la lutte contre les FAO

La grande sensibilité des Met à l'oxydation et la constatation que dans certains cas leur conversion en MetSO au sein d'une protéine n'entraîne aucune perturbation de sa fonction a conduit à proposer que les Met puissent servir de pièges à FAO et ainsi protéger d'autres résidus de la protéine essentiels à son activité. C'est par exemple le cas de la glutamine synthétase, ou de l' α 2-macroglobuline.

II.2.2 Modulation de la fonction des protéines

En fonction de leur localisation, l'oxydation de résidus Met peut entraîner une modification structurale d'un site actif ou d'un site de fixation d'un ligand et ainsi moduler la fonction de la protéine oxydée.

Devant le nombre très élevé d'études portant sur les conséquences de l'oxydation des Met, seuls les exemples les mieux documentés seront présentés dans la suite de ce paragraphe. Les exemples de modulation de l'activité de protéines et de peptides par oxydation de résidus Met cités dans le Tableau 1 ne seront pas développés.

| Protéine ou peptide | Référence |
|--|-------------------------------|
| Protéine ribosomale L12 | Caldwell <i>et al.</i> , 1978 |
| Lysozyme | Jori <i>et al.</i> , 1968 |
| Pepsine | Kido et Kassell, 1975 |
| Ribonucléase | Neumann <i>et al.</i> , 1962 |
| α -Chymotrypsine | Schachter et Dixon, 1962 |
| Cardiotoxine du venin de serpent | Carlsson et Louw, 1978 |
| Hormone parathyroïde | Frelinger et Zull, 1986 |
| Calcitonine | Tobler <i>et al.</i> , 1983 |
| Lipoxygénase | Rapoport <i>et al.</i> , 1984 |
| Inhibiteur de l'activateur du plasminogène | Lawrence et Loskutoff, 1986 |
| Thrombomoduline | Glaser <i>et al.</i> , 1992 |
| High Mobility Group Protein HMG-D | Dow <i>et al.</i> , 1997 |
| A-1 apolipoprotéine | Sigalov et Stern, 1998 |
| Fibronectine | Miles et Smith, 1993 |

Tableau 1 : Exemples de protéines et peptides dont les activités biologiques sont affectées par l'oxydation des Met (d'après Brot et Weissbach, 2000).

II.2.2.1 Inhibiteurs de protéases

L' α 1-antitrypsine fait partie de la famille des serpins, protéines inhibitrices de protéases. L'oxydation des Met351 et Met358 est responsable de la diminution de l'activité inhibitrice de la protéine vis-à-vis de sa cible, l'élastase, conduisant à une dérégulation de l'activité de la protéase. Cette dérégulation est impliquée dans des phénomènes inflammatoires comme l'emphysème pulmonaire (Taggart *et al.*, 2000).

D'autres serpins, comme l' α 2-antiplasmine ou l'antithrombine III, présentent la même sensibilité à l'oxydation, formant des MetSO et diminuant l'affinité des inhibiteurs vis-à-vis de leurs cibles.

II.2.2.2 Calmoduline

La calmoduline est une protéine fonctionnant comme un senseur clé du signal calcium et module le métabolisme cellulaire au travers de son association réversible avec plus de 50 cibles protéiques différentes, dont les pompes et canaux à calcium. La sensibilité de la calmoduline vis-à-vis des FAO fournit un moyen efficace pour diminuer le métabolisme cellulaire lors de conditions de stress oxydant. Cette sensibilité se traduit par l'oxydation de plusieurs des 9 Met de la protéine en MetSO (Pour revue, voir Bigelow et Squier, 2005).

En effet, à l'état normal, non oxydée, la calmoduline se lie avec le domaine inhibiteur de la pompe Ca-ATPase, induisant la levée de l'inhibition de l'enzyme. Après oxydation des Met144 ou 145, la calmoduline oxydée se fixe toujours sur l'ATPase mais y stabilise alors la forme inhibée de la pompe membranaire.

La reconnaissance des cibles est réalisée *via* des interactions hydrophobes, établies au niveau de chacun des deux domaines globulaires de la calmoduline, reliés entre eux par la région centrale. Les implications structurales de l'oxydation des Met144 et 145 pour la protéine libre ou associée à un peptide correspondant au site de fixation sur l'ATPase ont été caractérisées récemment par dichroïsme circulaire et surtout par RMN (Anbanandam *et al.*, 2005). Il a ainsi pu être clairement établi que l'oxydation en MetSO des Met144 et 145, situées dans l'hélice H du domaine C terminal de la calmoduline, agit comme un interrupteur induisant le passage de la calmoduline dans une conformation incapable d'activer la Ca-ATPase. Ces changements structuraux sont caractérisés par 1) la déstabilisation et le raccourcissement d'une hélice, 2) une restructuration du domaine globulaire C-terminal et de la région centrale, et 3) la perte de nombreux contacts entre la calmoduline et sa cible, empêchant la stabilisation de cette région et donc l'activation de l'ATPase.

La propension des MetSO à déstabiliser une hélice α , au contraire des Met, a conduit à proposer que cette oxydation joue un rôle général d'interrupteur conformationnel redox, permettant de moduler l'activité de protéines régulatrices. Un tel mécanisme serait impliqué dans l'inactivation de la protéase du VIH-2 (Davis *et al.*, 2000), de la chaperone sHsp (Harndahl *et al.*, 2001), de la thrombomoduline (Wood *et al.*, 2003a) et de la protéine régulatrice phospholamban (Bigelow et Squier, 2005).

II.2.2.3 Canaux ioniques

Les canaux ioniques participent à de très nombreux processus allant de l'excitation et la signalisation cellulaire jusqu'à l'excrétion d'hormones. Plusieurs types de canaux à potassium sont sensibles à l'oxydation, provoquant une modification de leurs propriétés.

Ainsi, il a été montré que l'oxydation du résidu Met3 du canal voltage-dépendant *Shaker C/B* de la drosophile entraîne une augmentation du temps de non-activabilité de la protéine (Ciorba *et al.*, 1997). Cette oxydation peut être médiée par NO (Ciorba *et al.*, 1999).

Les canaux Ca^{2+} -dépendant sont également soumis à une régulation redox complexe. En particulier, il a été montré récemment que l'oxydation des résidus Met536, 712 et 739 facilite l'ouverture du canal, de sorte que, même en absence de calcium, le canal peut s'ouvrir. Ce mécanisme pourrait servir de défense en cas de stress oxydant, en favorisant un état inactif de la cellule *via* l'efflux de potassium (Santarelli *et al.*, 2006).

II.2.2.4 Ffh

Chez les bactéries et les eucaryotes, l'adressage des protéines peut se faire *via* le système dépendant de SRP (Signal Recognition Particle). Chez les bactéries, le complexe SRP est constitué de la protéine Ffh, liée à l'ARN 4,5S. Ffh possède un domaine riche en Met, le domaine M, qui est à la fois le site d'interaction avec l'ARN 4,5S et avec la séquence signal hydrophobe de la protéine à exporter. Il a pu être montré *in vitro* que l'oxydation de Ffh est caractérisée par la formation de MetSO au sein du domaine M. Cette oxydation entraîne une perte de la capacité de Ffh à interagir avec l'ARN 4,5S et à former le complexe SRP. Il a également été démontré *in vivo* que l'oxydation de Ffh a pour conséquence d'entraver l'adressage des protéines par la voie SRP (Ezraty *et al.*, 2004).

II.2.3 Implication dans les maladies neurodégénératives

L'agrégation de l' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques du cerveau est une étape cruciale observée lors de la maladie de Parkinson. Le stress oxydant fait partie des facteurs favorisant le développement de la pathologie (Beal, 2003 ; Dawson et Dawson, 2003). *In vitro*, l'oxydation douce de l' α -synucléine convertit sélectivement les quatre résidus Met de la protéine en MetSO. Cette oxydation entraîne l'inhibition de la fibrillation de la protéine. Cette inhibition est due à la stabilisation d'oligomères solubles de l' α -synucléine (Uversky *et al.*, 2002). Cependant, la présence de métaux durant l'oxydation peut complètement contrebalancer cette inhibition et entraîner la fibrillation de la protéine (Yamin *et al.*, 2003). Les oligomères agrégés d' α -synucléine pouvant être cytotoxiques, ces résultats indiquent qu'à la fois le stress oxydant et la présence de métaux joueraient un rôle important dans l'agrégation de l' α -synucléine et dans la maladie de Parkinson (Pour revue, voir Glaser *et al.*, 2005).

La pathologie de la maladie d'Alzheimer est associée à la formation et au dépôt de peptides amyloïdes dans le cerveau. La toxicité observée du peptide serait due à sa capacité à produire des FAO radicalaires, une réaction qui serait médiée par l'oxydation du résidu Met35 par un atome de Cu lié au peptide (Schoneich, 2002 ; Varadarajan *et al.*, 1999). De façon similaire à l' α -synucléine, l'oxydation en MetSO de la Met35 du peptide amyloïde inhibe sa fibrillation et augmente sa solubilité (Hou *et al.*, 2002). Le peptide oxydé est toujours capable de catalyser la formation de FAO, pouvant alors conduire à d'autres modifications du peptide et à sa fibrillation (Schoneich *et al.*, 2003).

Enfin, la conversion de la forme normale de la protéine prion (PrPc) en sa forme pathogénique (PrPsc) implique probablement des changements de conformation associés à des modifications post-traductionnelles (Jackson *et al.*, 1999). Le PrPc peut fixer un atome de cuivre et possède un résidu Met129 exposé au solvant. Il a été montré que cette Met peut être oxydée en MetSO en présence de cuivre (Wong *et al.*, 1999). Un mécanisme de génération de radicaux similaire à ceux décrits précédemment a été proposé, conduisant à une oxydation accrue de PrPc et à son agrégation, ce processus étant toxique pour les cellules neuronales.

II.2.4 Adressage vers les voies de dégradation

Les protéines dont le degré d'oxydation est trop important pour être réparé sont dégradées par la cellule. Dans les cellules eucaryotes, les protéines oxydées sont dégradées dans le cytoplasme et le noyau par le système protéasomique (Shringarpure *et al.*, 2001), alors que dans la matrice mitochondriale cette dégradation est assurée en partie par la protéase Lon (Bota et Davies, 2002). Le protéasome 20S est le cœur catalytique du protéasome 26S qui est impliqué dans la dégradation des protéines ubiquitinilées. Les protéines oxydées sont dégradées indépendamment par le protéasome 20S, à partir d'une reconnaissance spécifique des zones hydrophobes exposées par ces protéines (Davies, 2001). En effet, comme décrit précédemment, l'oxydation des Met en MetSO peut conduire à des changements de conformation entraînant une exposition de zones hydrophobes normalement enfouies au sein de la protéine et ainsi leur reconnaissance par le protéasome.

PARTIE III : LES METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASES

L'oxydation de la fonction thioether de la Met conduit à la formation des deux stéréoisomères *R* et *S* sur le soufre de la fonction sulfoxyde. La famille des Msr catalyse la réduction stéréospécifique des MetSO libres ou incluses au sein d'une protéine. Les Msr de classe A (MsrA) réduisent l'isomère *S* de la fonction sulfoxyde et les Msr de classe B (MsrB) l'isomère *R*.

La première mise en évidence d'une activité Msr a été rapportée en 1979 par l'équipe de Brot et Weissbach (Ejiri *et al.*, 1979).

III.1 Rôle physiologique des Msr, un système de réparation aux multiples implications

III.1.1 Rôle dans la lutte contre le stress oxydant

L'importance physiologique de la MsrA dans la résistance au stress oxydant a été particulièrement documentée au cours des dix dernières années.

Ainsi, la première mise en évidence de la fonction de MsrA *in vivo* a été obtenue à partir de l'étude d'une souche d'*E. coli* n'exprimant plus l'enzyme (Moskovitz *et al.*, 1995). Cette souche présente une plus grande sensibilité à H₂O₂ lors de culture sur milieu solide. Cette étude a ensuite été complétée, étendant la sensibilité accrue de la souche *msrA* aux FAO et FAA en général (St John *et al.*, 2001).

Le même phénotype a été observé chez les microorganismes étudiés par délétion ou inactivation du gène *msrA* (Alamuri et Maier, 2004 ; Douglas *et al.*, 2004 ; Moskovitz *et al.*, 1997 ; Singh et Moskovitz, 2003 ; Vattanaviboon *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus chez les organismes eucaryotes supérieurs sont en accord avec les observations précédentes. D'une part, des souris n'exprimant pas de MsrA ont une espérance de vie plus courte et sont plus sensibles à des conditions hyperoxiques que les animaux témoins et développent un défaut neurologique caractérisé par un trouble de la marche (Moskovitz *et al.*, 2001). D'autre part, la surexpression de MsrA dans des lymphocytes T humains augmente la résistance des cellules au stress oxydant induit par H₂O₂ (Moskovitz *et al.*, 1998). De manière similaire, des cellules PC12 humaines surexprimant MsrA sont moins sensibles au stress oxydant généré par des conditions d'hypoxie/réoxygénation (Yermolaieva *et al.*, 2004). Depuis quelques années, les activités Msr, au niveau de deux organes particuliers, la peau et l'œil ont été particulièrement étudiés. Ainsi, il a été montré que la surexpression de MsrA dans des fibroblastes humains confère à ces cellules une résistance accrue au stress oxydant induit par H₂O₂ mais pas par les UVA (Picot *et al.*, 2005). Le rôle antioxydant de MsrA a été mis en évidence dans les cellules épithéliales de la lentille humaine, la surexpression de MsrA entraînant une protection des cellules contre le stress oxydant généré par H₂O₂, la réduction de l'expression de MsrA par l'utilisation de petits ARN interférant rendant les cellules plus sensibles à ce stress (Kantorow *et al.*, 2004). Des travaux sur le même type cellulaire ont montré que MsrB joue un rôle équivalent à celui de MsrA, la réduction de l'expression du gène *msrB* par l'utilisation de petits ARN interférant conduisant

à une diminution de la viabilité des cellules et de leur résistance au stress oxydant (Marchetti *et al.*, 2005). La réduction de l'expression de MsrA par l'utilisation de petits ARN interférant dans les cellules pigmentées épithéliales de la rétine chez l'homme et le singe conduit au même type d'observations (Lee *et al.*, 2006 ; Sreekumar *et al.*, 2005).

Enfin, la surexpression de MsrA dans les cellules nerveuses de la drosophile entraîne non seulement une résistance accrue au stress oxydant généré par le paraquat (viologen), mais également une augmentation de 70 à 80 % de la longévité des animaux ainsi qu'une activité reproductrice prolongée (Ruan *et al.*, 2002). (Pour revue, voir Moskovitz, 2005 ; Stadtman *et al.*, 2005 ; Weissbach *et al.*, 2005).

III.1.2 Rôle dans la réparation des protéines et la régulation de leurs fonctions

Comme présenté au chapitre II.2.2, l'oxydation des Met en MetSO peut entraîner la modulation de l'activité biologique d'une protéine. La possibilité de réduire ces MetSO grâce aux MsrA et MsrB a conduit à proposer que ce mécanisme d'oxydation/réduction puisse constituer dans une certaine mesure une voie de régulation, comparable au mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation.

Plusieurs études *in vitro* ont permis de mettre en évidence la réparation par MsrA et/ou MsrB de protéines inactivées par l'oxydation de Met. Ainsi, toutes les protéines citées au chapitre II.2.2 (Tableau 1 non inclus) sont des protéines dont l'activité est restaurée par le système Msr.

Les exemples les mieux caractérisés sont sans doute ceux de la calmoduline et de Ffh.

III.1.2.1 Calmoduline

La réparation par MsrA et MsrB de la calmoduline oxydée a été étudiée en détail *in vitro*, notamment grâce à l'utilisation de plusieurs techniques de spectrométrie de masse. Cet outil a permis de suivre spécifiquement la réduction par MsrA de chacune des neuf MetSO présentes dans la calmoduline oxydée. L'utilisation seule de MsrA ne permet pas la réparation complète des isomères *R* et *S* des MetSO initialement présente sur la calmoduline, mais permet tout de même la réactivation de la fonction activatrice de la calmoduline vis-à-vis de la Ca-ATPase (Sun *et al.*, 1999). De manière équivalente, MsrB seule ne peut réduire les deux

isomères des MetSO de la calmoduline oxydée. En revanche, l'utilisation combinée de MsrA et MsrB conduit à la réduction complète de la calmoduline (Grimaud *et al.*, 2001).

Cet exemple de la calmoduline illustre bien l'implication du cycle « oxydation des Met en MetSO par les FAO / réduction des MetSO en Met par les Msr » dans des mécanismes cellulaires redox de régulation. Ce cycle redox subit par la calmoduline intervient dans la régulation du métabolisme cellulaire, l'accumulation de calmoduline oxydée lors d'un stress oxydant sévère entraînant une répression du métabolisme de la cellule afin de diminuer la génération de FAO.

III.1.2.2 Ffh

Une étude similaire a été conduite sur la protéine Ffh (Ezraty *et al.*, 2004) et a permis de mettre en évidence la réduction par MsrA et MsrB des MetSO présentes sur Ffh suite à son oxydation par H₂O₂. Cette réparation permet à Ffh de retrouver sa propriété à se lier à l'ARN 4,5S, indispensable à la reconnaissance de la séquence signal portée sur les protéines à adresser à la membrane. De plus, l'étude d'une souche d'*E. coli* dont les gènes *msrA* et *msrB* ont été inactivés a révélé que l'absence de MsrA et MsrB induit l'accumulation de Ffh sous forme oxydée, conduisant à l'altération de l'adressage des protéines dépendant de SRP.

Ainsi, le cas de Ffh représente un exemple très clair du rôle crucial de réparation joué par les Msr, indispensable pour assurer dans ce cas la fonctionnalité du complexe Ffh/ARN 4,5S et l'adressage des protéines à la membrane.

III.1.3 Rôle dans le vieillissement cellulaire

Le vieillissement cellulaire est caractérisé par l'accumulation de protéines oxydées dans les cellules. Initialement, la cause de cette accumulation a été attribuée à une baisse de l'activité du protéasome (Friguet *et al.*, 2000) et de la protéase mitochondriale Lon (Bakala *et al.*, 2003) au cours de la vie d'une cellule. La possibilité que des systèmes de réparation des protéines oxydées, comme les Msr, puissent également être impliqués dans la diminution de l'activité de réparation des protéines liée à l'âge a été récemment envisagée.

En plus des études précédemment citées (chapitre III.1.1) mettant en évidence l'influence de MsrA sur la longévité de différents organismes génétiquement modifiés, il a été montré chez le rat une diminution significative de l'activité Msr au niveau du foie, du rein et du cerveau durant le vieillissement cellulaire (Petropoulos *et al.*, 2001). La diminution de

l'activité Msr a également été observée dans des fibroblastes humains au cours de leur vieillissement, corrélée avec la diminution de l'expression des gènes codant la MsrA et une MsrB (Picot *et al.*, 2004).

Ces données indiquent que les capacités de réparation du système Msr sont diminuées lors du vieillissement, contribuant probablement à l'accumulation des protéines oxydées.

(Pour revue, voir Friguet, 2006 ; Petropoulos et Friguet, 2005 ; Stadtman *et al.*, 2005).

III.1.4 Rôle dans la virulence de bactéries pathogènes

Ces dernières années ont vu l'émergence inattendue des MsrA en tant que facteur de virulence nécessaire à plusieurs microorganismes pathogènes.

Erwinia chrysanthemi est une bactérie pathogène des plantes, ne présentant pas de spécificité d'hôtes. L'inactivation du gène *msrA* empêche la bactérie d'infecter la plante, tout en augmentant sa sensibilité vis-à-vis d'agents oxydants (Hassouni *et al.*, 1999). Ainsi, ces résultats suggèrent que la réduction de la virulence observée est due à la diminution de la survie du pathogène dans la plante, cette dernière se protégeant par une production augmentée de FAO.

Staphylococcus aureus est une des causes majeures d'infections nosocomiales. L'inactivation de l'opéron contenant les gènes *msrA* et *msrB* cause une atténuation de la virulence de la bactérie (Singh et Moskovitz, 2003). Cet opéron est également induit par une série d'antibiotiques ciblant la paroi bactérienne (Singh *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent un lien entre les activités MsrA/MsrB et la biochimie de la paroi cellulaire. Les mécanismes sous-jacents à ces observations ne sont pas encore connus.

N. gonorrhoeae se développe dans le tractus urogénital humain et est responsable de la blennorragie (Shafer et Rest, 1989). *N. meningitidis* réside naturellement dans le nasopharynx mais peut entraîner des méningites en cas de déprime immunitaire (Suker et Feavers, 2001). L'espèce *Neisseria* présente la particularité de posséder une protéine multidomaine appelée PilB, comprenant un domaine MsrA et un domaine MsrB qui sont précédés d'un domaine N-terminal présentant une signature CXXC de type Trx. Chez *N. gonorrhoeae*, la protéine entière à trois domaines est décrite être localisée sur la membrane externe. L'existence d'un site de réinitiation interne de la traduction permettant l'expression dans le cytoplasme des

Introduction : Méthionine Sulfoxyde Réductases

deux domaines MsrA et MsrB fusionnés a été postulée (Skaar *et al.*, 2002). Plusieurs études semblaient attribuer un rôle à PilB dans la piliation de la bactérie et sa capacité d'adhérence, donc en partie à sa virulence (Taha *et al.*, 1988 ; Wizemann *et al.*, 1996). Ces résultats ont été infirmés par de nouveaux travaux, montrant que PilB n'est impliquée ni dans la piliation ni dans la capacité d'adhérence de la cellule. Cependant, cette étude a montré que la forme de PilB adressée à la membrane confère à la bactérie une protection contre le stress oxydant (Skaar *et al.*, 2002). A ce jour, aucune donnée expérimentale n'a démontré que les MsrA et MsrB sont impliquées dans la virulence des *Neisseria*.

Mycobacterium smegmatis est utilisé comme un modèle pour identifier les gènes requis pour la survie d'une bactérie dans une cellule hôte. Un mutant *msrA* a été construit et sa survie dans les macrophages a été étudiée. L'absence d'activité MsrA a entraîné une réduction sévère de la survie de la bactérie (Douglas *et al.*, 2004).

Mycoplasma genitalium est l'un des microorganismes possédant un génome de très faible taille. Il est très surprenant de remarquer qu'il lui manque les gènes codant pour plusieurs systèmes antioxydants comme la SOD, ou la catalase mais qu'il possède un gène *msrA*. Une souche n'exprimant plus MsrA ne survit plus dans le poumon d'hamster et présente une adhérence réduite aux érythrocytes et une sensibilité accrue à H₂O₂ (Dhandayuthapani *et al.*, 2001).

III.2 Distribution tissulaire et localisation subcellulaire chez les mammifères

III.2.1 MsrA

Chez l'homme, les niveaux les plus élevés d'ARN *msrA* sont trouvés dans le foie, les reins, le coeur et le cerveau (Kuschel *et al.*, 1999). Chez le rat, la présence de MsrA a été mise en évidence par histochimie en particulier dans la medulla des reins, le cervelet, la rétine et les macrophages péritonéaux (Moskovitz *et al.*, 1996). Les données obtenues par immunolocalisation et par fusion avec la GFP montrent que la MsrA, codée par un unique gène, est présente dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau. La présence d'un peptide signal en N-terminal de l'enzyme permet son adressage à la mitochondrie (Hansel *et al.*, 2002 ; Kim et Gladyshev, 2005 ; Vouquier *et al.*, 2003).

III.2.2 MsrB

Au moins trois gènes *msrb* sont présents dans les cellules de mammifères, *msrB1*, *msrB2* et *msrB3*. MsrB1 (SelR ou SelX) est une séléno-enzyme dont le gène est transcrit préférentiellement dans le foie, le pancréas, les leucocytes, l'estomac et les intestins (Lescure *et al.*, 1999). Le gène *msrB2* est principalement transcrit dans le cœur, les muscles squelettiques, le rein et le foie (Jung *et al.*, 2002). Le schéma de transcription du gène codant MsrB3 est similaire, les ARNm étant également localisés dans les muscles lisses (Hansel *et al.*, 2003). Des données récentes montrent que deux ARNm sont produits à partir du gène *msrB3*, permettant l'expression de formes de l'enzyme adressées soit à la mitochondrie, soit au réticulum endoplasmique. MsrB2 est localisée au niveau mitochondrial, alors que la sélénoprotéine MsrB1 est localisée dans le noyau et le cytoplasme (Kim et Gladyshev, 2004). (Pour revue, voir Hansel *et al.*, 2005).

III.3 Organisation génomique des Msr

Des gènes orthologues de *msrA* et *msrB* ont été identifiés dans la plupart des génomes séquencés disponibles. En effet, ces deux gènes sont parmi les gènes les plus retrouvés chez les bactéries, les archae et les eucaryotes, suggérant une origine très ancienne et une fonction très importante pour la vie cellulaire. Les quelques organismes ne possédant ni *msrA* ni *msrB* sont tous des archae ou des bactéries hyperthermophiles ou parasites obligatoires (Kryukov *et al.*, 2002).

Chez les bactéries, plusieurs types d'organisation de ces deux gènes ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Chez de nombreuses bactéries, comme dans le cas d'*E. coli*, les gènes *msrA* et *msrB* forment deux unités transcriptionnelles distinctes. *Bacillus subtilis* est un exemple d'organisation en opéron des gènes *msrA* et *msrB*. Dans quelques rares cas, comme chez *Neisseria*, les deux gènes sont fusionnés (Voir chapitre III.1.4). Enfin, le nombre de copies de ces gènes peut varier au sein de ces organismes, d'un gène unique à près de 3 *msrA* et 3 *msrB* chez *Rhizobium meliloti* voir même 5 *msrA* et 9 *msrB* chez *Arabidopsis* (Pour revue, voir Ezraty *et al.*, 2005a).

III.4 Propriétés biochimiques, structurales et enzymatiques des Msr

III.4.1 Mécanisme catalytique

Toutes les MsrA et MsrB dont les propriétés biochimiques ont été caractérisées présentent un même mécanisme catalytique.

Les Msr sont des enzymes à Cys essentielle ne possédant aucun cofacteur redox. Le mécanisme catalytique des Msr repose sur la chimie de l'acide sulfénique et se déroule en trois étapes (Boschi-Muller *et al.*, 2000). Le mécanisme nécessite la présence d'un réducteur, qui *in vivo* est la Trx.

Lors de la première étape aussi appelée étape réductase, la Cys catalytique de la Msr réduite (Msr_{red}) réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat conduisant à un état de transition/intermédiaire de type sulfurane. Le réarrangement de ce sulfurane doit générer l'intermédiaire acide sulfénique et libère une mole de Met par mole d'enzyme. Lors de la deuxième étape, une deuxième Cys, appelée Cys de recyclage, vient attaquer l'acide sulfénique pour former un pont disulfure et libérer une mole d'eau par mole d'enzyme. Enfin, lors de la troisième étape, le pont disulfure de la Msr oxydée (Msr_{ox}) est réduit par la Trx, régénérant la Msr_{red} et libérant la Trx oxydée sous forme pont disulfure (Figure 44).

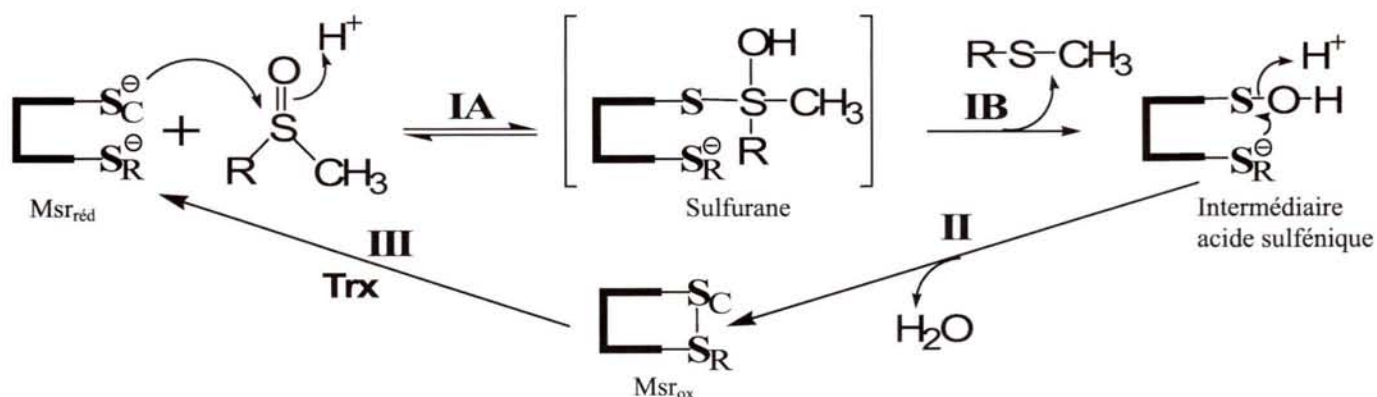
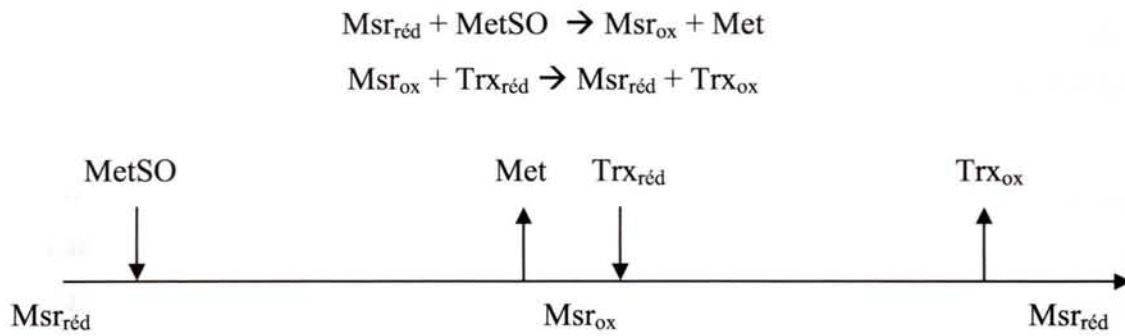


Figure 44 : Mécanisme catalytique des Msr à deux Cys. La formation du complexe Msr_{red} /substrat n'est pas explicitée. L'étape MetSO réductase peut être divisée en deux sous-étapes. Le substrat sulfoxyde est attaqué par la Cys catalytique (S_C) lors de l'étape IA, conduisant à l'intermédiaire/état de transition sulfurane. Ce sulfurane doit se réarranger dans l'étape IB pour aboutir à l'intermédiaire acide sulfénique. L'attaque de la Cys de recyclage (S_R) sur cet intermédiaire permet de former un pont disulfure intramoléculaire et de libérer l'acide sulfénique sous forme d'une molécule d'eau, lors de l'étape II. Enfin, le pont disulfure est réduit par la Trx au cours de l'étape III (d'après Olry *et al.*, 2002).

La caractérisation de l'intermédiaire acide sulfénique a été faite à partir de variants protéiques en substituant la Cys de recyclage par une Ser, permettant ainsi l'accumulation de l'intermédiaire Cys-SOH. Ce dernier a été mis en évidence directement par spectrométrie de masse et indirectement *via* la formation d'adduits avec la dimédone et le TNB⁻ (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002).

Le mécanisme cinétique des Msr est de type ping-pong, en présence de réducteur comme la Trx ou le DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2004). Ce mécanisme est assimilable à deux demi-réactions et peut être décrit par le schéma suivant :



III.4.2 Sous-classes de Msr

L'alignement des structures primaires des MsrA et MsrB caractérisées biochimiquement montre que la Cys catalytique est strictement conservée au sein de ces enzymes alors que la Cys de recyclage n'est pas toujours présente, suggérant des mécanismes de régénération différents. Ainsi, des sous-classes peuvent être définies au sein des MsrA et MsrB en fonction de la position et du nombre des Cys de recyclage.

III.4.2.1 MsrA

Chez MsrA, la Cys catalytique est localisée à la position 51 dans la séquence de l'enzyme d'*E. coli*, au sein du motif conservé G₅₀CFW₅₃. La numérotation des résidus des MsrA est basée sur la séquence référence de la MsrA d'*E. coli*. Au moins quatre sous-classes peuvent être définies, en fonction de la position et du nombre de Cys de recyclage (Figure 45) (Kauffmann *et al.*, 2005).

Introduction : Méthionine Sulfoxyde Réductases

- La première sous-classe est représentée par le domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis*. La Cys de recyclage est située en position 198 et le pont disulfure 51-198 est formé au cours du mécanisme de l'enzyme. La Cys198 se situe au sein du motif conservé G₁₉₆YCH₁₉₉. Dans certaines séquences, un résidu supplémentaire est inséré avant la Cys198, pour donner un motif GxxCH ; c'est notamment le cas de la MsrA de *M. tuberculosis*.

- La deuxième sous-classe est représentée par la MsrA de *B. subtilis*, où la Cys de recyclage est située en position 54, au sein de la séquence GC₅₁FWC₅₄. Dans ce cas, c'est un pont disulfure 51-54 qui est formé.

- La troisième sous-classe est représentée par la MsrA d'*E. coli*, qui possède deux Cys de recyclage en position 198 et 206. Dans ce cas, il y a formation de deux ponts disulfures consécutifs. Le pont 51-198 est formé initialement, comme dans la sous-classe de type *Neisseria*, suivi du pont 198-206. C'est ce pont 198-206 qui est préférentiellement réduit par la Trx.

- Une quatrième sous-classe, non encore caractérisée biochimiquement est représentée par la MsrA de *R. capsulatus*. Cette MsrA putative a la particularité de ne posséder que la Cys51 catalytique. Si cette MsrA est active, un nouveau mécanisme de régénération serait impliqué dans la réduction directe de l'intermédiaire acide sulfénique.

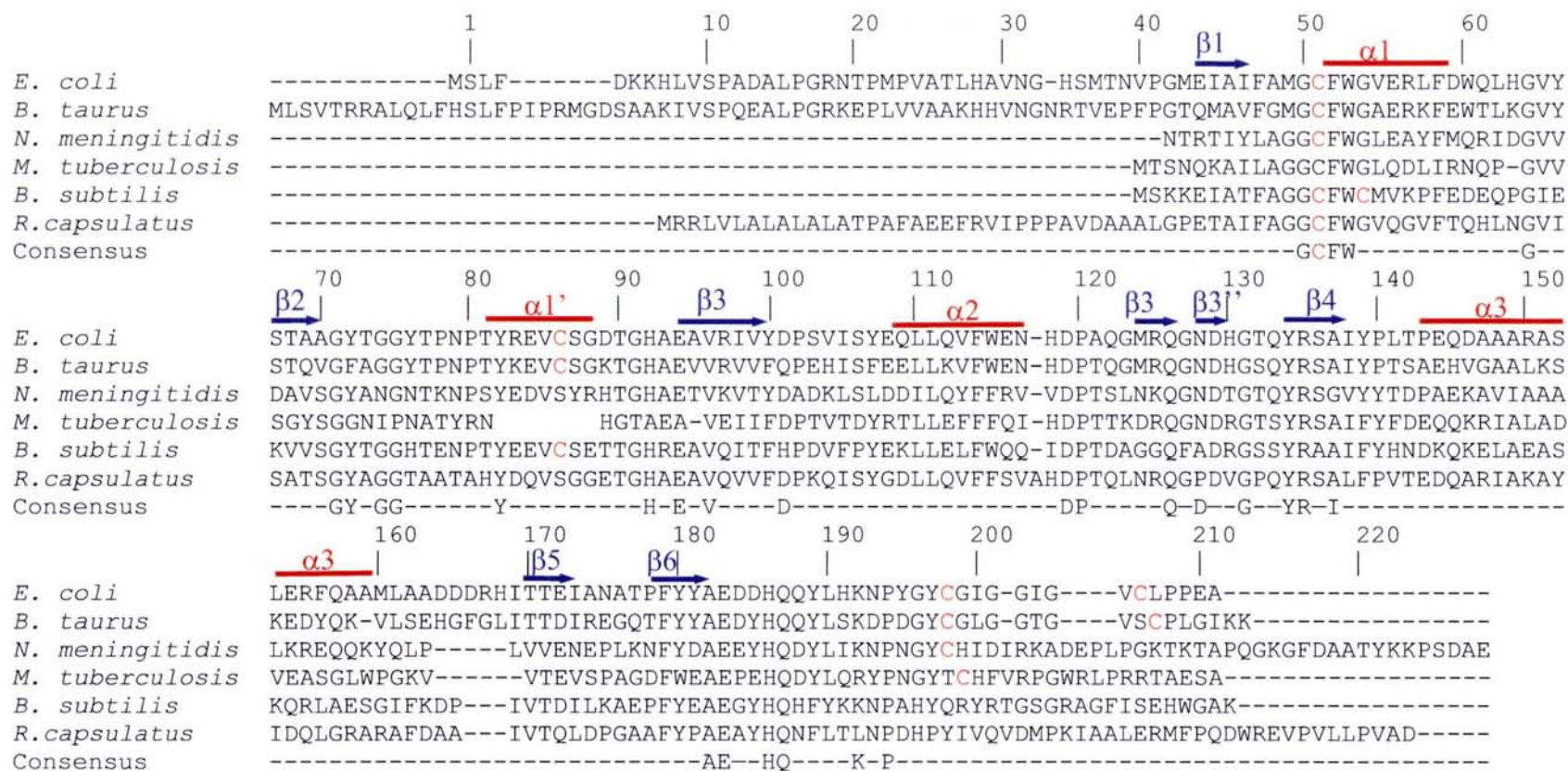


Figure 45 : Alignement des séquences des MsrA d'*E. coli*, *B. taurus*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*, *B. subtilis* et *R. capsulatus*. Ces enzymes sont représentatives d'une des quatre sous-classes de MsrA, qui diffèrent par la position et le nombre des résidus Cys impliqués dans le mécanisme de recyclage (*E. coli* et *B. taurus*: Cys51/Cys198/Cys206, *N. meningitidis* : Cys51/Cys198; *B. subtilis* : Cys51/Cys54; *R. capsulatus* : Cys51). La numérotation utilisée est basée sur celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme d'*E. coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000): les hélices- α sont indiquées par des traits rouges, les brins- β par des flèches bleues. Les résidus Cys sont indiqués en couleur rouge. La séquence consensus présente des résidus conservés à plus de 90 % dans les séquences de MsrA putatives extraites des banques génomiques (génomés entièrement séquencés).

III.4.2.2 MsrB

Chez MsrB, la Cys catalytique est localisée en C-terminal de la protéine, à la position 117 dans la séquence de l'enzyme d'*E. coli*, au sein du motif conservé Y₁₁₆CI/VN₁₁₈. La numérotation des résidus des MsrB est basée sur la séquence référence de la MsrB d'*E. coli*. Au moins quatre sous-classes peuvent être définies, en fonction de la position et du nombre de Cys de recyclage, qui peut être localisée en position 31 (Neiers *et al.*, 2004) ou 63 (Figure 46).

- La première sous-classe, rassemblant près de 60 % des MsrB putatives, est représentée par le domaine MsrB de la protéine PilB de *N. meningitidis*. La Cys de recyclage est située en position 63. C'est donc un pont disulfure 63-117 qui est formé puis réduit par la Trx.

- La deuxième sous-classe est représentée par la MsrB de *Xanthomonas campestris*, qui possède une Cys de recyclage en position 31. Dans ce cas, le pont 31-117 est formé puis réduit par la Trx.

- La troisième sous-classe est représentée par la MsrB de *R. capsulatus* qui, comme la MsrA putative du même organisme, ne possède pas de Cys de recyclage. De manière similaire à la MsrA, cette observation suggère un mécanisme de réduction atypique, directement sur l'intermédiaire acide sulfénique.

- La quatrième sous-classe est représentée par la Sel-MsrB humaine où la Cys₁₁₇ catalytique est remplacée par une sélénocys. La Cys de recyclage est présente en position 63 et forme un pont séléno-sulfure, réductible par la Trx.

Indépendamment de ces trois classes, plusieurs MsrB possèdent également deux motifs C₄₅XXC₄₈ et C₉₄XXC₉₇ permettant la fixation d'un cation métallique Zn²⁺. C'est notamment le cas pour les MsrB d'*E. coli* (Olry *et al.*, 2005), de *X. campestris* ou de *R. capsulatus*.

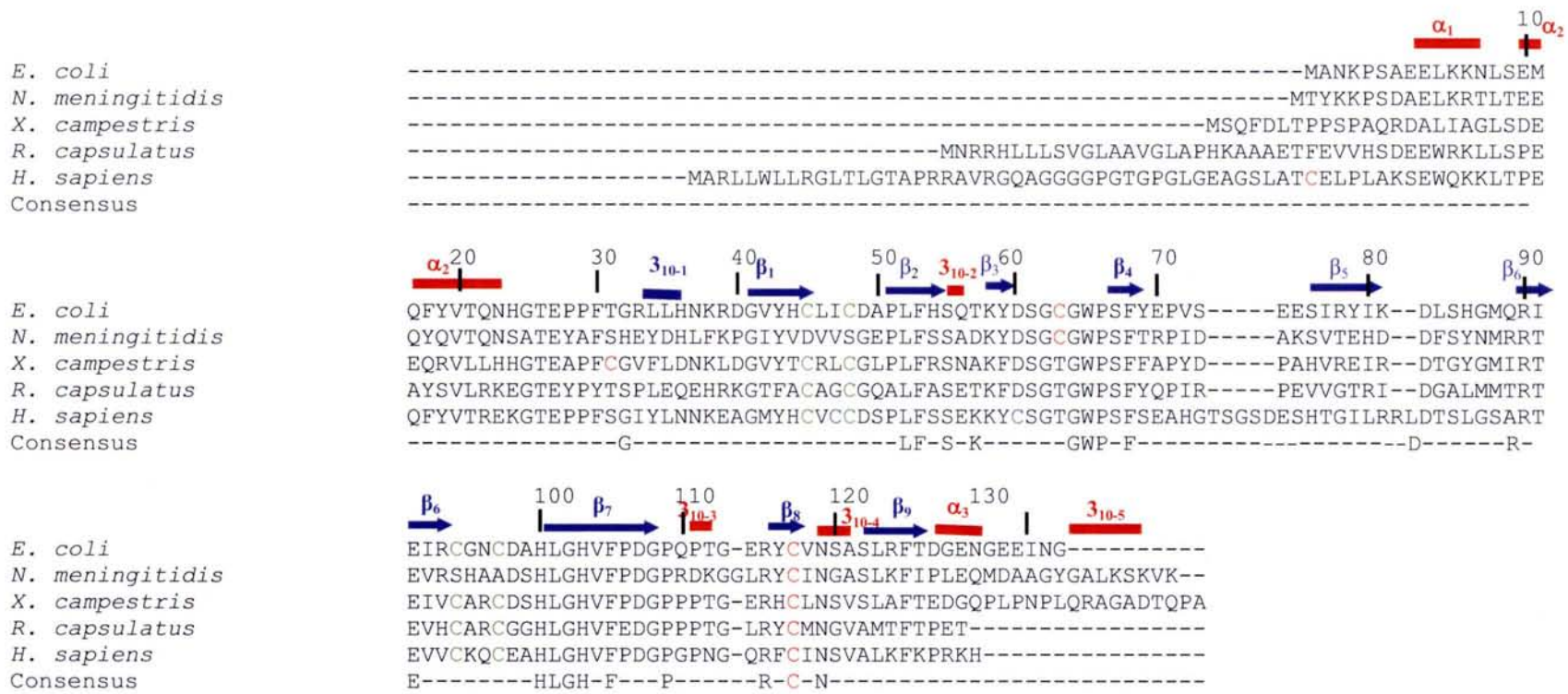


Figure 46 : Alignement des séquences des MsrB de *E. coli*, *N. meningitidis*, *X. campestris*, *R. capsulatus* et *H. sapiens*. Les MsrB peuvent être divisées en quatre classes selon le nombre et la position de Cys impliquées dans le mécanisme de recyclage : 1 Cys63 (cas de *N. meningitidis* et *E. coli*) ou 1 Cys60 (cas de *H. sapiens*), aucune Cys (cas de *R. capsulatus*), 1 Cys31 (cas de *X. campestris*). La protéine humaine SELX est un cas particulier où la Cys catalytique est remplacée par un résidu sélénocys (U). Parmi les MsrB, certaines possèdent 4 Cys supplémentaires, impliquées dans la fixation d'un métal (cas de *E. coli*, *R. capsulatus* et *H. sapiens*). La numérotation utilisée est celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.*, 2002) : les hélices- α sont indiquées par des traits rouges, les brins- β par des flèches bleues. Les résidus Cys impliqués dans la chélation d'un ion métallique sont indiqués en vert, les Cys impliquées dans le mécanisme catalytique sont indiquées en rouge, les autres Cys sont indiquées en bleu. La séquence consensus présente les résidus conservés à plus de 90 % dans les séquences de MsrB putatives extraites des banques génomiques (génomés entièrement séquencés)

III.4.3 Structure tridimensionnelle

Bien que partageant un mécanisme catalytique similaire, les MsrA et MsrB ne présentent aucune identité ni même homologie de séquence. Leurs structures tridimensionnelles se sont également révélées être différentes. Les MsrA et MsrB sont de petites protéines monomériques, de 170 à 211 résidus pour les MsrA et d'environ 146 résidus pour les MsrB.

III.4.3.1 MsrA

Jusqu'à présent, trois structures de MsrA ont été résolues par radiocristallographie. Il s'agit des MsrA d'*E.coli* (Tete-Favier *et al.*, 2000), de *Bos taurus* (Lowther *et al.*, 2000) et de *Mycobacterium tuberculosis* (Taylor *et al.*, 2003). La structure de la MsrA d'*E. chrysanthemii* a été obtenue par RMN, mais n'a pas été déposée dans la PDB (Beraud *et al.*, 2001 ; Beraud *et al.*, 2002).

Ces quatre structures adoptent toutes un même repliement unique, ne partageant aucune similarité avec les repliements déjà répertoriés dans les banques de données structurales. Cette structure est composée d'une partie centrale de 140 acide aminés, résidus 42 à 192 chez *E. coli*, entourée de ses extrémités N- et C-terminales, très peu structurées.

La partie centrale adopte un repliement mixte α/β , constituée d'un feuillet β antiparallèle à 5 brins, flanqué de 4 hélices α et d'un petit feuillet β antiparallèle à 2 brins surplombant le site actif. L'extrémité N-terminale ne présente aucun élément de structure secondaire, mais son positionnement est fortement stabilisé par l'établissement de nombreuses liaisons H et contacts de Van der Waals avec la partie centrale. Cette constatation est renforcée par le fait que les structures de cette extrémité sont remarquablement bien superposables. Cette extrémité est de longueur variable selon les organismes, allant d'une quarantaine de résidus chez *E. coli*, jusqu'à moins de cinq chez *B. subtilis* ou *N. meningitidis*. Jusqu'à présent, aucun rôle n'a été attribué à cette extrémité, sa présence ne semblant pas indispensable à l'activité de la MsrA d'*E. coli* (Boschi-Muller *et al.*, 2001). L'extrémité C-terminale ne présente pas non plus d'éléments de structure secondaire et à la différence de la partie N-terminale, sa conformation varie légèrement selon les structures considérées. Cette extrémité C-terminale contient les Cys de recyclage en position 198 et 206 (Figure 47A).

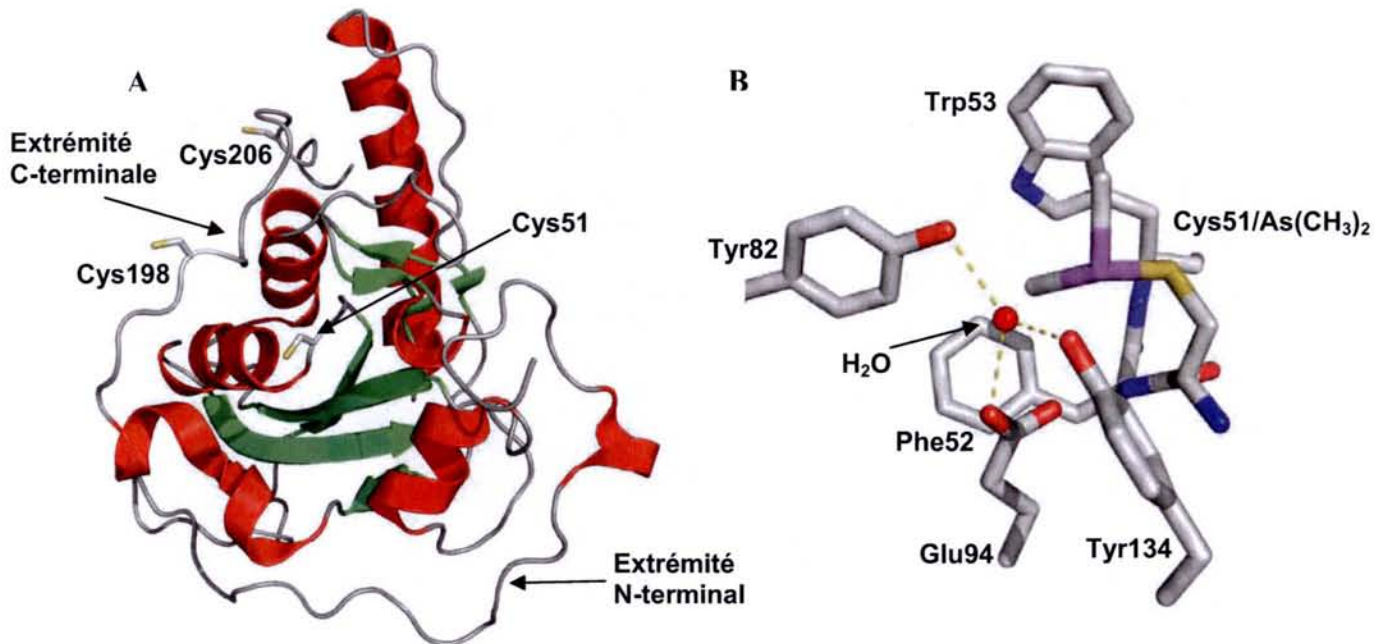


Figure 47 : Représentation de la structure du monomère de la MsrA d'*E.coli* et du site actif de l'enzyme. A) Architecture globale de la MsrA. Les trois cystéines (51, 198 et 206) impliquées dans le mécanisme sont représentées. Les structures secondaires en hélices α sont représentées en rouge et celles en brins β sont représentées en vert. B) Structure du site actif représentant les chaînes latérales des résidus conservés Phe52, Trp53, Tyr82, Glu94 et Tyr134. L'adduit diméthylarsenate ($\text{As}(\text{CH}_3)_2$) présent sur la Cys51 est représenté (d'après Tete-Favier *et al.*, 2000).

Le site actif des MsrA est organisé autour de la Cys51 catalytique, située à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 1$. Les acides aminés à proximité immédiate sont strictement conservés et forment un large bassin, ouvert et accessible au solvant. Une forte proportion de chaînes latérales aromatiques (Tyr52, Trp53, Tyr82, Tyr134, Tyr197) forme ce site actif, lui conférant un caractère partiellement hydrophobe. De manière remarquable, dans chacune des trois structures cristallographiques disponibles, le site actif est toujours occupé par un ligand, mimant soit un intermédiaire réactionnel, soit le complexe MsrA / MetSO. Ces observations suggèrent un mode de reconnaissance et de fixation de la MetSO dans le site actif de MsrA et permettent la localisation d'acides aminés bien positionnés pour intervenir dans la catalyse du mécanisme réactionnel. Ainsi, dans la structure de *M. tuberculosis*, le site actif est occupé par un résidu Met d'un monomère adjacent (Figure 48A). De façon similaire, dans la structure de *B. taurus*, une molécule de DTT est liée à la Cys catalytique (Figure 48B). Enfin, la structure de la MsrA d'*E. coli* a été obtenue avec des cristaux préparés en tampon cacodylate ($\text{AsO}_2(\text{CH}_3)_2$) et DTT, conduisant à la formation d'un adduit diméthyle arsenate sur la Cys catalytique (Figure 47B).

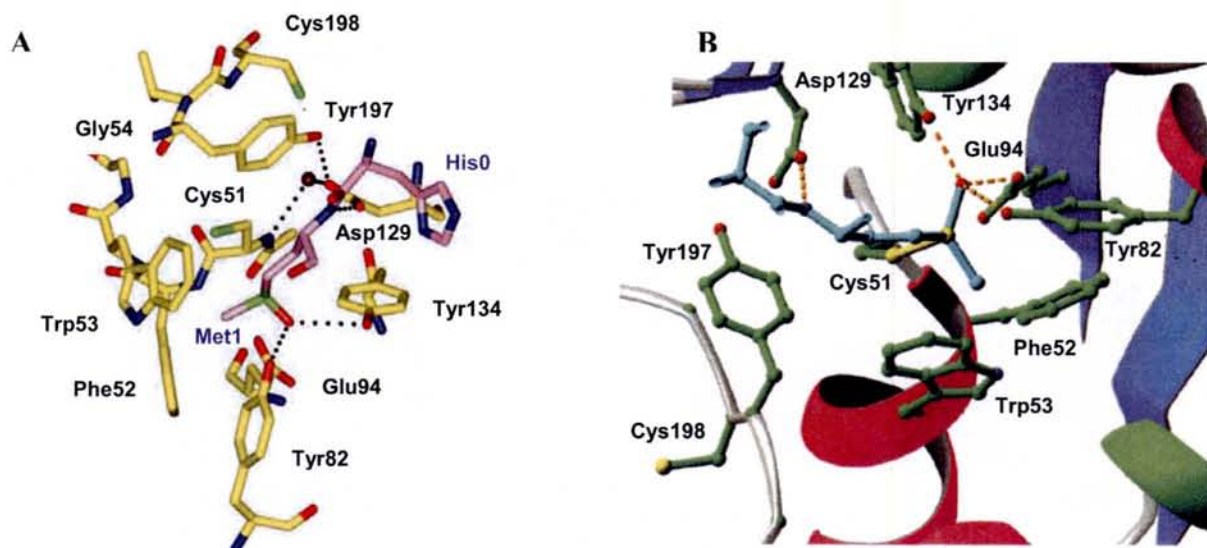


Figure 48 : Représentation de la structure du site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* et de *B. taurus*. A) Site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* dans lequel a été modélisé une MetSO à partir d'une Met initialement présente. Le dipeptide MetSO-His est représenté en violet, les acides aminés du site actif en jaune (d'après Taylor *et al.*, 2003). B) Site actif de la MsrA de *B. taurus* dans lequel a été modélisé un sulfoxyde à partir d'une molécule de DTT initialement présente (d'après Lowther *et al.*, 2000).

L'inspection de ces trois structures suggère que : a) le groupement méthyle de la MetSO est stabilisé au sein d'une poche hydrophobe constituée par les résidus Phe52 et Trp53, le noyau indole de ce dernier établissant lui-même une liaison H avec le noyau imidazole du résidu His186 et une interaction hydrophobe de type « stacking » avec le noyau phénol du résidu Tyr189, b) la chaîne latérale du résidu Asp129 peut établir une liaison H avec le groupement NH de la chaîne principale du substrat et une seconde liaison H avec la fonction hydroxyle du résidu Tyr197, c) Tyr197 peut aussi interagir avec la chaîne principale du substrat *via* une interaction π - π entre son noyau aromatique et la liaison peptidique entre la MetSO et le résidu la précédant du côté N-terminal et, d) les résidus Tyr82, Glu94 et Tyr134 interagissent fortement *via* des liaisons H avec une molécule d'eau, présente dans chaque structure. L'oxygène de cette molécule d'eau est bien positionnée pour mimer l'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat et, e) la distance entre les thiols de la Cys51 catalytique et de la Cys198, mais aussi entre les Cys198 et 206 pour les MsrA de la sous-classe d'*E. coli*, est trop grande pour permettre la formation d'un pont disulfure. Cette constatation couplée aux résultats enzymatiques suggère fortement l'implication d'une réorganisation conformationnelle locale lors du mécanisme catalytique pour permettre la formation du (ou des) pont disulfure après ou de façon concomitante avec la formation de l'intermédiaire acide sulfénique.

III.4.3.2 MsrB

Jusqu'à présent, une seule structure cristallographique de MsrB a été résolue et déposée à la PDB. Il s'agit de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.*, 2002). La structure de la MsrB de *B. subtilis* obtenue par RMN est également disponible mais pas encore publiée. La structure de la MsrB de *N. meningitidis* a été résolue à Nancy, mais pas encore publiée (Kauffmann *et al.*, données non publiées).

Les MsrB présentent une structure complètement différente de celle des MsrA, caractérisée par un repliement essentiellement de type β . Le cœur de l'enzyme est composé de deux feuillets β antiparallèles se faisant face pour former une structure proche du tonneau β , et flanquée de trois hélices α et cinq hélice 3_{10} (Figure 49). Contrairement aux MsrA, les MsrB possèdent des homologues structuraux, les protéines Mss4 et TCTP, présentant une homologie structurale au niveau de la région putative de fixation de métaux.

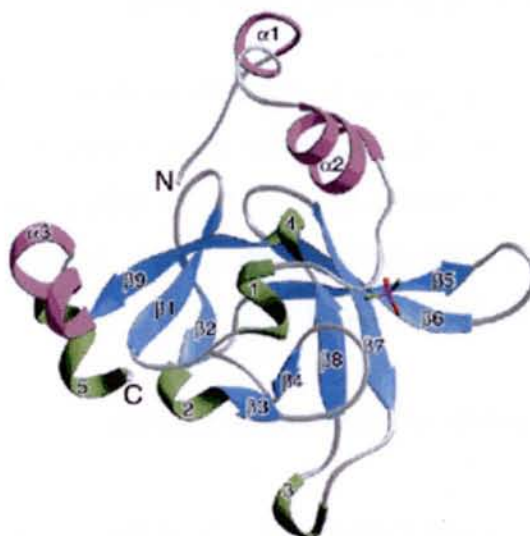


Figure 49 : Représentation de la structure de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les structures secondaires en hélices α sont représentées en vert, celles en feuillet β sont en bleu et celles en hélices 3_{10} sont en violet. La molécule de cacodylate ($\text{AsO}_2(\text{CH}_3)_2$) stabilisée dans le site actif est représentée en mode ball and stick (d'après Lowther *et al.*, 2002).

Comme pour MsrA, le site actif de MsrB est organisé autour de la Cys117 catalytique. Cette Cys est localisée dans le brin β 8. L'architecture du site actif des MsrA et MsrB ne présente aucune similarité. Ainsi, les acides aminés à proximité de la Cys catalytique ont un caractère nettement moins aromatique que dans la MsrA. Ces résidus sont conservés au sein des MsrB (Trp65, His100, His103, Arg115, Asn120). Le site actif de la MsrB de *N.*

gonorrhoeae est occupé par une molécule de cacodylate, utilisée lors de la cristallisation. Ce ligand pourrait être un mime du substrat complexé à l'enzyme.

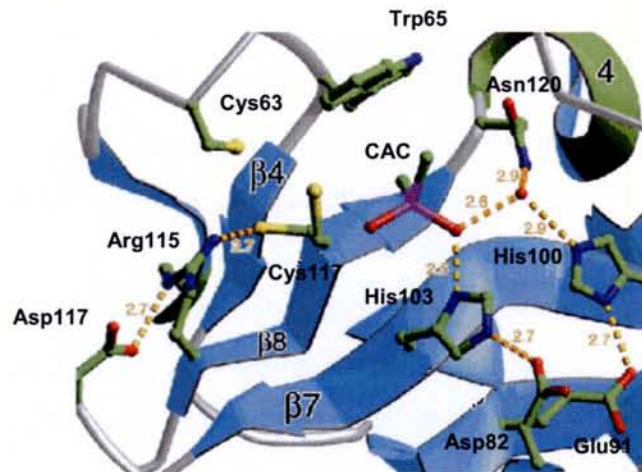


Figure 50 : Représentation de la structure du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. La molécule de cacodylate (CAC) stabilisée dans le site actif est représentée ainsi que les chaînes latérales des résidus conservés du site actif. Les interactions possibles par liaison H sont schématisées en pointillés jaunes (d'après Lowther *et al.*, 2002).

L'inspection du site actif suggère que a) le noyau imidazole de His103 forme une liaison H avec l'atome d'oxygène du sulfoxyde, b) l'un des groupements méthyles du cacodylate, mimant le méthyle de la MetSO, est stabilisé dans une poche hydrophobe formée par le résidu Trp65 et, c) un réseau d'interactions électrostatiques entre Asp107, Arg115 et Cys117 stabilise la cystéine catalytique sous forme thiolate (Figure 50).

III.4.4 Stéréosélectivité et spécificité de substrat

La stéréosélectivité des MsrA pour l'isomère *S* de la MetSO et des MsrB pour l'isomère *R* a été démontrée initialement par l'utilisation de ces deux stéréoisomères de la MetSO (Moskovitz *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002) puis à l'aide de la calmoduline oxydée sur ses méthionines (Grimaud *et al.*, 2001).

La détermination des structures tridimensionnelles de ces enzymes a permis de mettre en évidence les facteurs structuraux responsables de leur stéréosélectivité (Figure 51) (Lowther *et al.*, 2002).

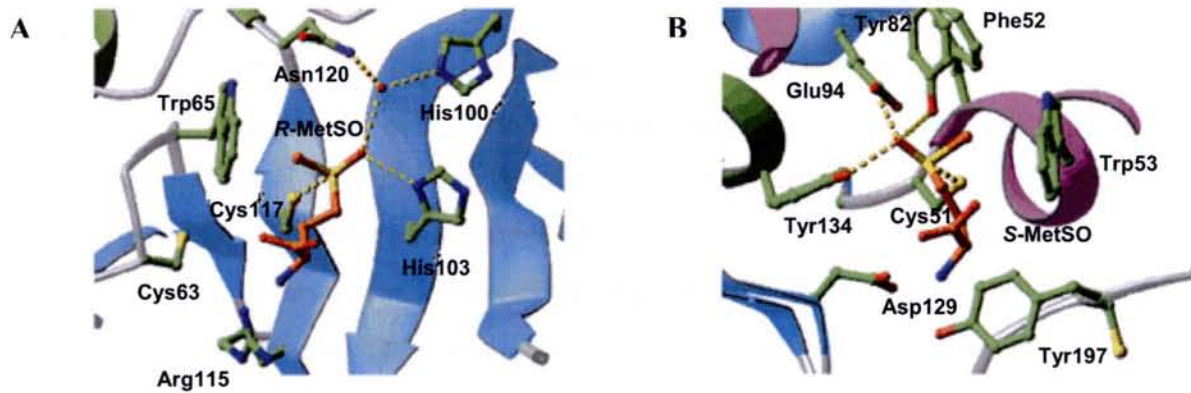


Figure 51 : Comparaison des structures des sites actifs de la MsrB de *N. gonorrhoeae* et de la MsrA d'*E. coli*. A) L'isomère R de la MetSO a été modélisé dans le site actif de MsrB. B) L'isomère S est représenté dans le site actif de MsrA. Cette représentation met en évidence la stéréospécificité de chacun des deux sites actifs, pour l'un des deux stéréoisomères de la fonction sulfoxyde (d'après Lowther *et al.*, 2002).

L'étude de la spécificité de substrat de la MsrA et de la MsrB de *N. meningitidis* (Olry *et al.*, 2002), basée sur des cinétiques réalisées à l'état stationnaire, a conduit aux conclusions suivantes : a) la présence de la fonction sulfoxyde est un pré-requis à la fixation du substrat par la MsrA, b) la poche de reconnaissance hydrophobe accomode mal des groupements plus encombrants qu'un méthyle, c) la présence de deux groupements méthylène entre le C α et le soufre du sulfoxyde est requis pour une efficacité optimale de la réduction du sulfoxyde, d) la configuration du C α n'a pas d'influence sur la reconnaissance du substrat et, e) une MetSO dont les extrémités N et C-terminales sont protégées sous forme de liaisons amides semble mieux reconnue qu'une MetSO libre.

OBJECTIFS

Les travaux réalisés sur les Msr par notre équipe, avant que je ne débute mon projet de thèse, avaient démontré un mécanisme original de réduction des MetSO et permis sa caractérisation cinétique à l'état stationnaire. Ce mécanisme à trois étapes implique la chimie de l'acide sulfénique. Dans une première étape de réduction de la MetSO, un intermédiaire acide sulfénique est formé sur la cystéine catalytique avec le relargage de la Met. Puis, la cystéine est régénérée *via* la formation d'un pont disulfure intramoléculaire qui est ensuite réduit par la Trx.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait comme objectif majeur de caractériser les résidus du site actif impliqués dans la catalyse de l'étape réductase du domaine MsrA de *N. meningitidis*. Ceci impliquait comme préalable de pouvoir accéder à la cinétique de cette étape. Parallèlement, j'ai initié des études en vue de caractériser les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la spécificité structurale de la MsrA vis-à-vis du substrat MetSO et de la Trx.

Les résultats sont présentés en trois parties :

La première partie, sous forme d'une publication et d'un article de revue complétés par des résultats non publiés, est consacrée à la caractérisation cinétique des trois étapes du mécanisme de la MsrA et à l'identification de l'étape cinétiquement limitante.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'étape de réduction de la MetSO. Les travaux relatifs à l'activation de la Cys catalytique et à la caractérisation des acides aminés impliqués dans la catalyse de l'étape réductase sont présentés sous forme d'un manuscrit, et complétés par des travaux en vue d'identifier la provenance de l'oxygène de l'intermédiaire acide sulfénique.

La troisième partie concerne l'étape de recyclage de la MsrA_{ox} par la Trx. Les travaux présentés dans la première partie des Résultats avaient en effet mis en évidence une reconnaissance spécifique entre Msr_{ox} et Trx_{réd}. Ceci posait la question des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre la MsrA et la Trx, qui est une protéine ubiquitaire. Un préalable à une étude structurale d'un complexe covalent

MsrA/Trx impliquait de déterminer la nature du pont disulfure intermoléculaire formé entre les deux partenaires. Ce travail a été entrepris en collaboration avec l'équipe du Dr. A. Van Dorsselaar à Strasbourg. Ces travaux sont également présentés sous forme d'un manuscrit où sont également inclus les travaux faits sur la MsrB de *N. meningitidis* par A. Olry.

Trois articles sont joints en annexe. Le premier est issu de notre collaboration avec l'équipe du Dr. M. Ruiz Lopez. Il concerne la caractérisation par une approche de chimie théorique d'un modèle d'étude de l'étape réductase, à savoir la réduction du DMSO par le méthane thiol. Les deux autres publications ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. M. T. Cung et concernent l'étude structurale et dynamique par RMN de la MsrA d' *E. coli* sous forme réduite et oxydée.

Les résultats de ces publications, complétés par les études structurales par diffraction des RX des différents intermédiaires réactionnels obtenus en collaboration avec l'équipe Biocristallographie du Dr. A. Aubry et les études relatives à l'identification des résidus impliqués dans la reconnaissance et la fixation de la MetSO, travaux actuellement poursuivis par Adeline Gand au Laboratoire, sont discutés en relation avec le mécanisme des MsrA dans la partie Discussion/Perspectives.

Résultats

Partie I : Caractérisation cinétique des trois étapes du mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis*.

Au moment où cette étude a été initiée, aucune information n'était disponible quant à la vitesse de chacune des trois étapes du mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis*. J'ai mis au point deux techniques de cinétique rapide, par mélange rapide résolu en temps ("quenched-flow") et par spectrofluorimétrie en flux interrompu ("stopped-flow" en mode fluorescence), qui ont été utilisées afin d'accéder spécifiquement à la vitesse de chacune des étapes du mécanisme. Cette étude a été réalisée en utilisant deux substrats sulfoxydes, la MetSO et l'AcMetSONHMe, qui mime une MetSO incluse dans une protéine.

I.1 Techniques de cinétiques rapides

Le k_{cat} des MsrA étant de l'ordre de 3 s^{-1} (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002), la mise en évidence de l'étape cinétiquement limitante, et d'éventuelle(s) étape(s) plus rapide(s) précédant cette étape limitante, nécessitait la mise au point de techniques de cinétique rapide afin d'atteindre des constantes de vitesses supérieures ou égales au k_{cat} .

I.1.1 Mélange rapide résolu en temps ("Quenched-flow")

La technique de quenched-flow a été utilisée pour atteindre spécifiquement la vitesse de l'étape de réduction du substrat et de l'étape suivante de formation du pont disulfure. La réduction du substrat sulfoxyde lors de la première étape conduit à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique et à la libération concomitante d'une mole de Met par mole de MsrA. Aussi, la vitesse de cette étape peut être mesurée en suivant la libération de Met après arrêt de la réaction à différents temps par acidification, en utilisant la technique de "quenched-flow" couplée au dosage du produit par chromatographie en phase inverse (Voir Matériels et Méthodes). L'étape réductase s'accompagnant du passage de l'enzyme de l'état réduit (2 groupements thiols libres) à l'état intermédiaire acide sulfénique (1 seul groupement thiol libre), cette étape peut être suivie indirectement par le dosage des thiols libres de l'enzyme à l'aide d'un réactif spécifique, le 2PDS. De manière analogue, l'étape de formation du pont disulfure fait passer la MsrA de l'état acide sulfénique (1 groupement thiol titrable) à l'état oxydé disulfure (aucun groupement thiol titrable). Le dosage des groupements thiols

Résultats : Caractérisation cinétique du mécanisme

libres à partir des échantillons collectés précédemment par "quenched-flow" pourrait permettre d'atteindre la vitesse des étapes réductase et de formation du pont disulfure. Ceci implique l'hypothèse que l'intermédiaire acide sulfénique s'accumule et donc que sa vitesse de formation soit plus rapide que celle de formation du pont disulfure.

Ces cinétiques ont été réalisées en absence de réducteur, afin de ne permettre qu'un seul cycle catalytique de l'enzyme ("single turn-over"), jusqu'à la formation de l'intermédiaire pont disulfure qui s'accumule. L'appareil de cinétique rapide utilisé fonctionne en mode séquentiel, ou double mélange, permettant d'atteindre un temps de réaction minimum d'environ 25 ms. Ce « temps mort » fixe une limite supérieure de l'ordre de 30 s^{-1} pour les constantes de vitesse mesurables, correspondant à un temps de demi-réaction de 25 ms.

I.1.2 Spectrofluorimétrie en flux interrompu ("Stopped-flow")

La technique de "stopped-flow" a été utilisée pour suivre spécifiquement l'étape de formation du pont disulfure sur la MsrA et l'étape suivante de réduction de ce pont disulfure par la Trx. Cette technique tire avantage de la variation des propriétés d'émission de fluorescence de la MsrA ou de la Trx en fonction de leur état redox. En effet, la formation du pont disulfure Cys51-Cys198 de la MsrA entraîne l'augmentation de l'émission de fluorescence du Trp53, le seul Trp de l'enzyme de *N. meningitidis*. Ainsi, la variation de l'émission de fluorescence du Trp53 peut être utilisée comme un marqueur spectroscopique indirect de la formation du pont disulfure Cys51-Cys198. De manière similaire, la formation du pont disulfure Cys32-Cys35 dans le site actif de la Trx entraîne l'extinction de l'émission de fluorescence du Trp31 voisin. La variation de l'émission de fluorescence du Trp de la Trx est une sonde spectroscopique indirecte de l'état redox du site actif de l'enzyme, qui permet de suivre spécifiquement la vitesse de formation de la Trx oxydée (Trx_{ox}) lors de la réduction de MsrA. Afin de suivre sélectivement l'oxydation de la Trx, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 310 nm. Dans ces conditions, la variation de l'émission de fluorescence de la MsrA est négligeable par rapport à la contribution de la Trx. En effet, à cette longueur d'onde d'excitation, le rendement quantique d'émission de fluorescence des Trp de la Trx est supérieur à celui de l'unique Trp de la MsrA

I.2 Caractérisation cinétique du mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis*

I.2.1 Etape réductase et étape de formation du pont disulfure. Mise en évidence de l'étape cinétiquement limitante du mécanisme.

L'étape réductase s'est révélée trop rapide à pH 8,0 (pH qui peut être considéré comme optimum pour l'étape réductase, voir publication 3, page X) pour être étudiée par la technique de "quenched-flow". L'abaissement du pH conduit à un ralentissement de cette étape, rendant possible sa caractérisation cinétique par "quenched-flow". Une constante de vitesse, k_{obsMet} , de $12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ a été déterminée en suivant l'apparition de la Met au cours du temps à pH 5,5 et en présence de 100 mM de MetSO. Dans les mêmes conditions de pH, le k_{cat} mesuré à l'état stationnaire avec le système couplé Trx / Trx réductase / NADPH était de $0,6 \text{ s}^{-1}$. Ces résultats montrent que l'étape cinétiquement limitante se situe après l'étape de réduction de la MetSO et peut donc être associée soit à l'étape de formation du pont disulfure Cys51-Cys198, soit à l'étape de réduction de ce pont disulfure par la Trx.

Les dosages des groupements thiols libres, sur les échantillons collectés précédemment par "quenched-flow", ont mis en évidence la perte simultanée des deux groupements thiols de l'enzyme, gouvernée par une constante de vitesse observée, k_{obsSS} , de $20 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, du même ordre de grandeur que la constante de vitesse d'apparition de la Met. Ces résultats montrent que la formation du pont disulfure est concomitante à la formation de la Met. De plus, le suivi de la formation du pont disulfure par "stopped-flow" à pH 5,5 a conduit à la détermination d'une constante de vitesse observée, k_{obsSS} , de $11 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, en bon accord avec la constante de vitesse mesurée par "quenched-flow". Ce résultat confirme que la constante de vitesse observée de formation du pont disulfure est similaire à celle d'apparition de la Met et donc est cinétiquement limitée par la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique.

En conséquence, l'intermédiaire acide sulfénique ne s'accumule pas au cours du cycle catalytique. L'ensemble de ces résultats permet de conclure que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme de la MsrA est située après l'étape de formation du pont disulfure, et est donc associée à l'étape de réduction du pont disulfure de la MsrA par la Trx. L'ensemble de ces travaux est présenté dans la publication 1, pages 93 à 98.

I.2.2 Paramètres cinétiques de l'étape réductase

Comme précisé au paragraphe précédent, la vitesse de l'étape réductase est trop rapide pour être mesurable par la technique de "quenched-flow" à pH 8,0 et en présence de 100 mM de MetSO. Par contre, le suivi de la formation du pont disulfure dans les mêmes conditions par "stopped-flow" est possible et a conduit à la détermination d'une constante de vitesse observée, k_{obsSS} , de $144 \pm 1 \text{ s}^{-1}$. Le fait que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme de la MsrA soit située après l'étape de réduction du sulfoxyde implique que l'affinité apparente pour la MetSO mesurée à l'état stationnaire et caractérisée par la constante K_{MMetSO} ne reflète pas l'affinité "vraie" pour le substrat. Ainsi, la valeur de K_{MMetSO} de 9 mM (Olry *et al.*, 2002) doit être bien inférieure à la valeur de la constante apparente d'affinité K_{MetSO} dans l'étape réductase.

Bien que la vitesse de formation de Met ne soit pas caractérisable à pH 8,0 par "quenched-flow" car trop rapide, il est raisonnable d'assumer que l'étape de réduction du substrat reste cinétiquement déterminante dans le mécanisme conduisant à la formation du pont disulfure et que la vitesse de formation de ce pont disulfure mesurée par "stopped-flow" reflète en fait la vitesse de l'étape réductase. La mesure de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration en MetSO à pH 8,0 a conduit à l'obtention d'un profil hyperbolique, caractérisé par les constantes cinétiques k_{MetSO} de $1510 \pm 90 \text{ s}^{-1}$ et K_{MetSO} de $740 \pm 80 \text{ mM}$. La valeur élevée de la constante de vitesse k_{MetSO} indique que la catalyse chimique réalisée dans le site actif de la MsrA lors de la réduction de la fonction sulfoxyde du substrat est très efficace. Cette efficacité cinétique est fortement contrastée par la faible affinité de l'enzyme pour la MetSO, conduisant ainsi à une faible constante de vitesse de second ordre $k_{\text{MetSO}}/K_{\text{MetSO}} = 2040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Une telle affinité rend par ailleurs expérimentalement impossible la réalisation de cinétiques à concentrations saturantes en MetSO.

Alexandre Olry avait montré précédemment que l'affinité apparente à l'état stationnaire (K_{M}) de la MsrA pour le substrat AcMetSONHMe était améliorée d'un facteur 15 par rapport à la MetSO (Olry *et al.*, 2002). Ce substrat mime une MetSO incluse dans un peptide, ses fonctions amine et acide carboxylique étant engagées dans deux liaisons amides avec respectivement un groupement acétyle et méthyle amine (Figure 52). Les constantes cinétiques de l'étape réductase ont été déterminées avec l'AcMetSONHMe à pH 8,0 et donnent des valeurs de $k_{\text{AcMetSONHMe}}$ de $790 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ et $K_{\text{AcMetSONHMe}}$ de $55 \pm 2 \text{ mM}$, conduisant à une constante de second ordre $k_{\text{AcMetSONHMe}}/K_{\text{AcMetSONHMe}}$ de $14400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 52). Ces résultats montrent clairement que le substrat AcMetSONHMe est mieux reconnu par

l'enzyme que la MetSO, l'affinité apparente dans la première étape étant améliorée d'un facteur 13. De plus, l'utilisation du substrat AcMetSONHMe permet d'atteindre des concentrations saturantes pour l'étape de réduction du substrat sulfoxyde.

Ces travaux sont présentés dans la publication 1, pages 93 à 98, et la revue 2, pages 99 à 106.

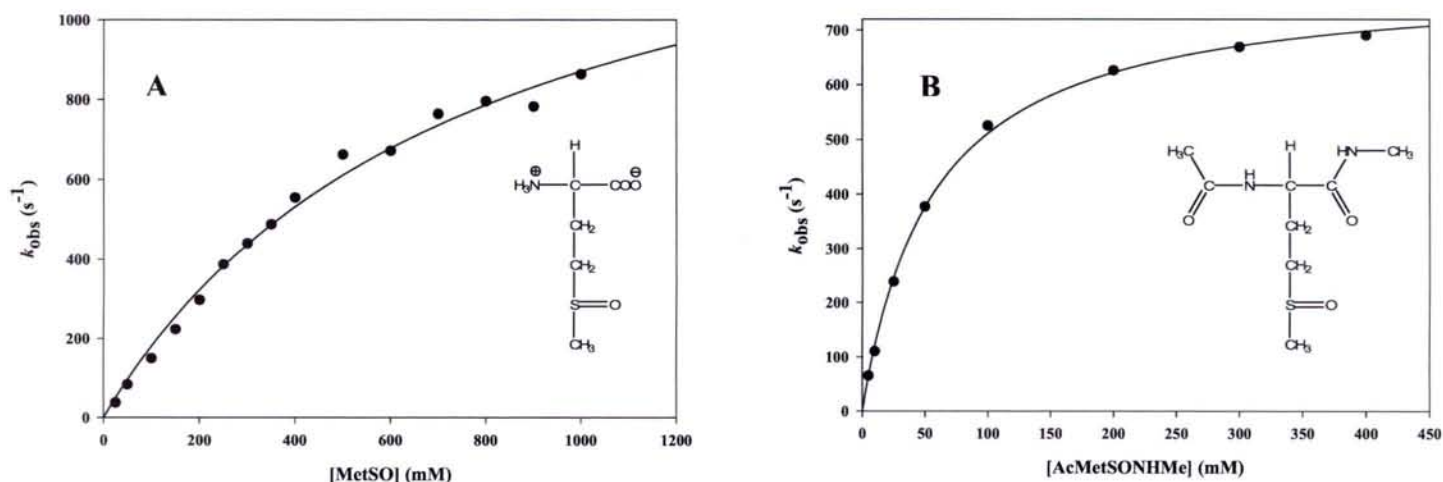
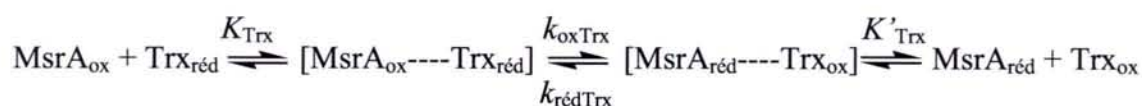


Figure 52 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape de réduction du substrat sulfoxyde par la MsrA de *N. meningitidis*. L'augmentation de fluorescence associée par la formation du pont disulfure Cys51-Cys198 est mesurée à 25°C et à pH 8,0. La concentration finale en MsrA est de 10 µM. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm et l'émission de fluorescence est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 320 nm. L'ajustement des données expérimentales à l'équation (x) par régression non linéaire conduit aux paramètres k_{MetSO} de $1510 \pm 90 \text{ s}^{-1}$ et K_{MetSO} de $740 \pm 80 \text{ mM}$, en présence de substrat MetSO (A) et $k_{\text{AcMetSONHMe}}$ de $790 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ et $K_{\text{AcMetSONHMe}}$ de $55 \pm 2 \text{ mM}$ en présence de substrat AcMetSONHMe (B). Les symboles (●) représentent les données expérimentales et les lignes continues représentent l'ajustement des données au modèle cinétique.

I.2.3 Etape de réduction de la MsrA par la Trx

La vitesse de l'étape de réduction de la MsrA oxydée (MsrA_{ox}) par la Trx réduite ($\text{Trx}_{\text{réd}}$) a été mesurée en suivant la vitesse d'oxydation de la Trx à pH 8,0 à différentes concentrations en $\text{Trx}_{\text{réd}}$. Le profil de variation du k_{obsTrx} en fonction de la concentration en $\text{Trx}_{\text{réd}}$ présente une allure hyperbolique, caractéristique de l'existence d'une reconnaissance entre les partenaires MsrA_{ox} et $\text{Trx}_{\text{réd}}$. Ainsi, la réduction de MsrA_{ox} par $\text{Trx}_{\text{réd}}$ peut être schématisée par le modèle minimum ci-dessous :



Résultats : Caractérisation cinétique du mécanisme

En admettant que la fixation de la Trx_{réd} sur la MsrA_{ox} est un équilibre rapide, l'ajustement des données expérimentales à l'équation (x) dérivant de ce mécanisme a permis de déterminer les paramètres cinétiques, à savoir une constante apparente d'affinité K_{Trx} de $910 \pm 560 \mu\text{M}$ et des constantes de vitesse d'échange de pont disulfure dans les deux sens k_{oxTrx} de $50 \pm 16 \text{ s}^{-1}$ et k_{redTrx} de $\approx 0 \text{ s}^{-1}$. Le fait que la constante k_{redTrx} soit nulle indique que l'échange de pont disulfure peut être considéré comme irréversible dans les conditions utilisées, et donc que la constante cinétique k_{oxTrx} représente la constante de vitesse de l'étape de transfert d'électrons. Ces résultats sont confirmés par le fait que la réaction inverse de réduction de la Trx_{ox} par la MsrA réduite (MsrA_{red}) n'a pas pu être observée. Le modèle simplifié correspondant à l'étape de réduction par la Trx est donc le suivant :



Les valeurs de K_{Trx} et k_{oxTrx} sont respectivement 12 et 7 fois supérieures aux valeurs de K_{MTrx} et k_{cat} déterminées à l'état stationnaire en présence du système couplé Trx réductase / NADPH, qui n'est pas limitant sur toute la gamme de concentration en Trx utilisée. Afin de confirmer que la valeur de k_{cat} mesurée en présence du système couplé reflète bien la valeur de la constante catalytique de la MsrA à l'état stationnaire, la valeur du k_{cat} a également été déterminée en absence de système couplé, en suivant la vitesse de formation de Met en présence de concentrations saturantes en MetSO et en Trx_{red}. Le suivi de l'apparition de la Met catalysée par la MsrA à pH 8,0 en présence de 1 mM de Trx_{red} et de 100 mM de MetSO a permis de déterminer une valeur de k_{cat} de $7,4 \text{ s}^{-1}$ (Figure 53), en bon accord avec les valeurs déterminées à l'aide du système couplé complet (comprise entre 3 et 7 s^{-1}).

Ainsi, le k_{cat} est clairement inférieur à la constante k_{oxTrx} , ce qui suggère fortement une étape cinétiquement limitante située, au sein de l'étape de recyclage par la Trx, après l'échange de pont disulfure et probablement associée à la dissociation des partenaires MsrA_{red}/Trx_{ox}. Dans ce modèle, il est possible que le processus de dissociation entre Msr_{red} et Trx_{ox} soit limité cinétiquement par une étape de changement conformationnel du complexe Msr_{red} / Trx_{ox} avant sa dissociation. Si tel est le cas, un changement conformationnel similaire du complexe Msr_{ox} / Trx_{red} devrait également avoir lieu après la formation du complexe Michaelien, dont la vitesse pourrait être cinétiquement déterminante pour la formation du complexe Msr_{red} / Trx_{ox}.

Ces travaux sont présentés en partie dans la publication 1, pages 93 à 98, et la revue 2, pages 99 à 106.

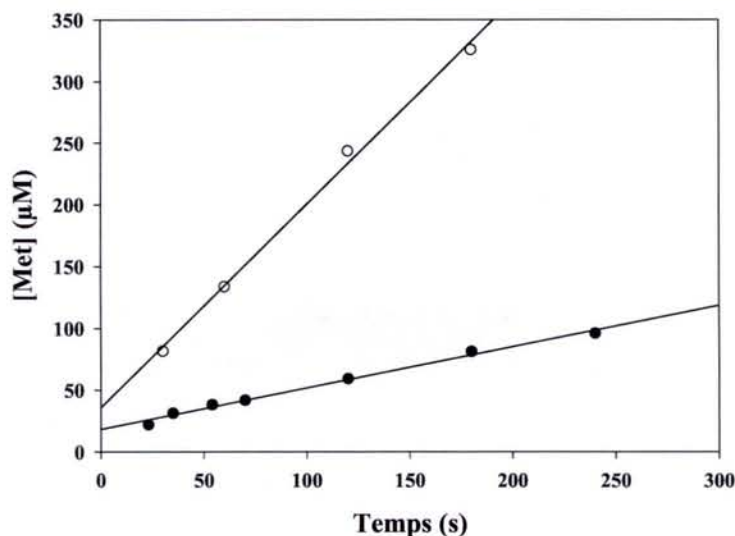
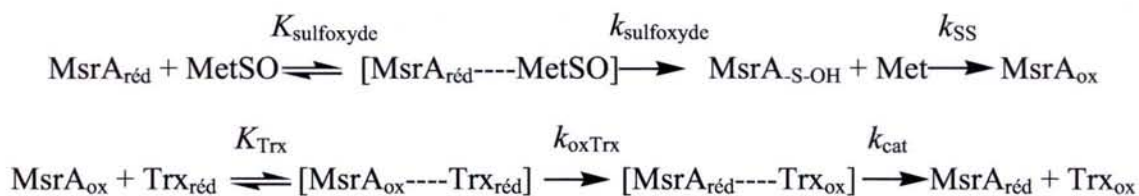


Figure 53 : Cinétique de réduction de la MetSO catalysée à l'état stationnaire par la MsrA de *N. meningitidis*, en présence de concentration saturante en Trx_{réd}. La Met formée au cours de la réaction est quantifiée par HPLC. Les concentrations en MetSO et Trx_{réd} sont respectivement de 100 mM et 1 mM. Les concentrations en MsrA utilisées sont de 0,05 µM (●) et 0,2 µM (○). L'ajustement des points expérimentaux par régression linéaire conduit aux constantes de vitesse k_{cat} de 6,7 s⁻¹ et 8,2 s⁻¹ respectivement à 0,05 µM et 0,2 µM en MsrA, soit une moyenne de 7,4 s⁻¹. Les ajustements sont représentés par les lignes continues.

1.2.4 Conclusion

Les résultats expérimentaux présentés précédemment ont permis de montrer que le mécanisme cinétique de la MsrA de *N. meningitidis* obéit au modèle ci-dessous. Les valeurs des différentes constantes de vitesse obtenues à pH 8.0 sont regroupées dans le Tableau 2.



| | Etape I | | | Etape II | Etape III | | Etat stationnaire | | |
|-------------|--|--------------------------------|--|---------------------------------------|--|--------------------------|--|---------------------------------|---------------------------|
| | $k_{\text{sulfoxyde}}$ (s ⁻¹) | $K_{\text{sulfoxyde}}$ (mM) | k/K (s ⁻¹ .M ⁻¹) | k_{SS} (s ⁻¹) | k_{oxTrx} (s ⁻¹) | K_{Trx} (µM) | k_{cat} (s ⁻¹) | $K_{\text{Msulfoxyde}}$ (mM) | K_{MTrx} (µM) |
| MetSO | 1510 | 740 | 2040 | 1510 ⁽¹⁾ | 50 | 910 | 3-7 ⁽²⁾ | 9 | 75 |
| AcMetSONHMe | 790 | 55 | 14363 | 790 ⁽¹⁾ | | | 3,4 ⁽³⁾ | 0,6 | ND |

Tableau 2 : Paramètres cinétiques des trois étapes du mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis*, déterminées en présence de substrat MetSO ou AcMetSONHMe. (1) : Les valeurs de k_{SS} sont égales aux valeurs de $k_{\text{sulfoxyde}}$, la vitesse de l'étape de formation du pont disulfure étant cinétiquement limitée par la vitesse de l'étape réductase. Les valeurs exactes des constantes de vitesse k_{SS} sont inaccessibles expérimentalement. (2) : Valeurs obtenues à l'état stationnaire, à l'aide du système couplé (Olry *et al.*, 2002), et par le suivi de l'apparition de Met (Figure 53). (3) D'après Olry *et al.*, 2002.

L'étude du mécanisme cinétique de la MsrB de *N. meningitidis*, réalisée par Alexandre Olry, a abouti à un modèle très similaire (Olry *et al.*, 2004). L'étape réductase de la MsrB est 27 fois moins rapide que celle de la MsrA (29 s^{-1}) et reste cinétiquement déterminante pour la formation du pont disulfure. La MsrB présente une affinité apparente pour le substrat AcMetSONHMe dans la première étape du même ordre de grandeur (49 mM) que celle de la MsrA. L'étape cinétiquement limitante est également associée à la réduction de la MsrB_{ox} par la Trx_{réd}, vraisemblablement à une étape de dissociation du complexe Msr_{réd} / Trx_{ox}.

I.3 Détermination du potentiel redox de la MsrA

I.3.1 Equilibre redox MsrA / Trx

L'approche cinétique développée précédemment a permis de montrer que l'étape de réduction de la MsrA par la Trx est irréversible. Il restait posée la question de la valeur de la constante d'équilibre de la réaction, qui devrait vraisemblablement être fortement déplacée vers la formation de MsrA_{réd}. Pour répondre à cette question, le potentiel redox de la MsrA a été déterminé.

La méthodologie utilisée a consisté à mesurer directement la constante d'équilibre redox (K') protéine-protéine entre la MsrA et la Trx. Le potentiel redox (E°) de la MsrA a ensuite été calculé grâce à la relation de Nernst, à partir de la constante d'équilibre K' mesurée. Deux variants de la Trx d'*E. coli*, présentant des potentiels redox différents et connus, ont été utilisés afin d'obtenir une valeur précise de E°_{MsrA} : la Trx de type sauvage, avec un potentiel redox de - 270 mV et le variant P34H, qui présente un potentiel redox augmenté de 35 mV par rapport à celui de la Trx de type sauvage. Ces potentiels redox ont servi de référence (Aslund *et al.*, 1997).



$$K' = ([\text{Trx}_{\text{ox}}] \times [\text{MsrA}_{\text{réd}}]) / ([\text{Trx}_{\text{réd}}] \times [\text{MsrA}_{\text{ox}}])$$

$$E^{\circ}_{\text{Trx}} - E^{\circ}_{\text{MsrA}} = \Delta E^{\circ}_{\text{Trx} - \text{MsrA}} = (RT/nF) \ln K'$$

$$E^{\circ}_{\text{MsrA}} = E^{\circ}_{\text{Trx}} - (RT/nF) \ln K'$$

Dans ces équations, n représente le nombre d'électrons transférés dans la réaction, T représente la température en degrés Kelvin, F représente la constante de Faraday ($F = 23040,612 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{V}^{-1}$) et R représente la constante des gaz parfaits ($R = 1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

La valeur de K' a été déterminée à partir de la quantification des quatre formes protéiques présentes à l'équilibre, après leur séparation par chromatographie analytique en phase inverse. Préalablement à l'analyse des mélanges redox obtenus à l'équilibre, les temps de rétention sur la colonne C₈ des différentes protéines réduites et oxydées ont été déterminés (Figure 54). On peut remarquer que les profils d'éluion des formes réduites et oxydées de la Trx P34H sont inversés par rapport à ceux des formes réduites et oxydées de la Trx sauvage.

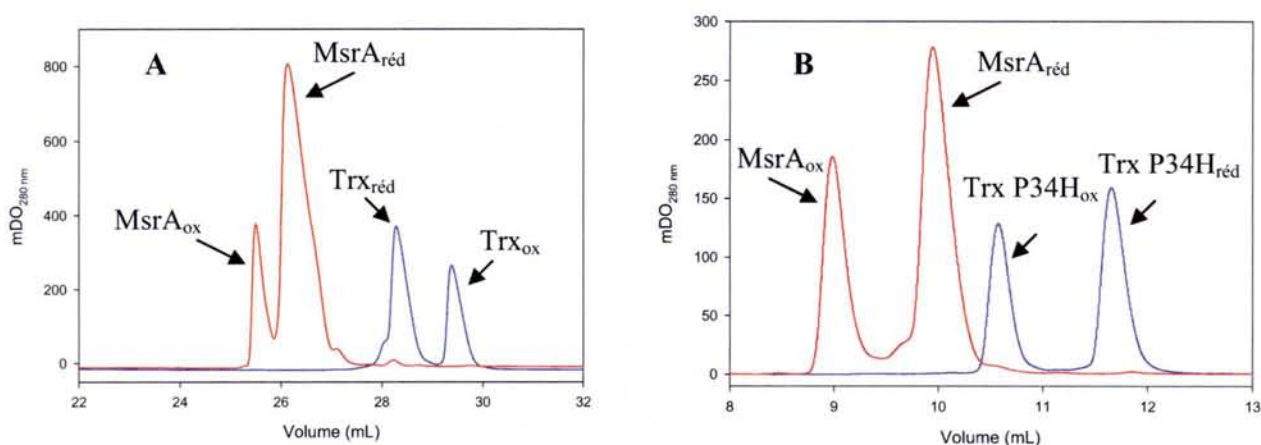


Figure 54 : Profils d'éluion des formes réduites et oxydées de MsrA, Trx et Trx P34H par chromatographie en phase inverse sur colonne C₈. A) En rouge est représenté le profil d'éluion des formes MsrA_{red} (190 μ M) et MsrA_{ox} (35 μ M), et en bleu celui des formes Trx_{red} (114 μ M) et Trx_{ox} (57 μ M). B) En rouge est représenté le profil d'éluion des formes MsrA_{red} (100 μ M) et MsrA_{ox} (50 μ M), et en bleu celui des formes Trx P34H_{red} (100 μ M) et Trx P34H_{ox} (50 μ M). L'éluion des protéines est suivie par mesure de la DO à 280 nm. Les séries A et B ont été réalisées avec un gradient d'acétonitrile différent, expliquant les différences de temps de rétention observés pour les deux formes de MsrA.

Afin de déterminer la valeur de K' , des mélanges équimolaires MsrA_{ox} / Trx_{red} ou Trx P34H_{red} et MsrA_{red} / Trx_{ox} ou Trx P34H_{ox} ont été réalisés et analysés après équilibration pendant 20 heures. Les résultats mettent en évidence la prédominance des formes MsrA_{red} et Trx_{ox}, indiquant un équilibre fortement déplacé surtout en présence de Trx sauvage (Figure 55). La quantification des quatre formes redox a permis de déterminer des constantes d'équilibre K' de 97 et 58 respectivement en présence de Trx et de Trx P34H, correspondant à des potentiels redox standard de la MsrA de -210 mV et -190 mV. La différence entre ces deux valeurs d' E°_{MsrA} peut s'expliquer par le fait qu'en présence de Trx sauvage, la population de Trx_{red} observée à l'équilibre est très faible et en conséquence l'erreur sur la

quantification est plus grande, amenant à des valeurs de K' et de E'°_{MsrA} sous-estimées. Le potentiel redox de la Trx P34H étant plus proche de celui de la MsrA, l'équilibre est moins déplacé et la quantification de la population de Trx P34H_{réd} à l'équilibre plus précise. En conséquence, il peut être conclu que le potentiel redox de la MsrA est de l'ordre de - 190 mV.

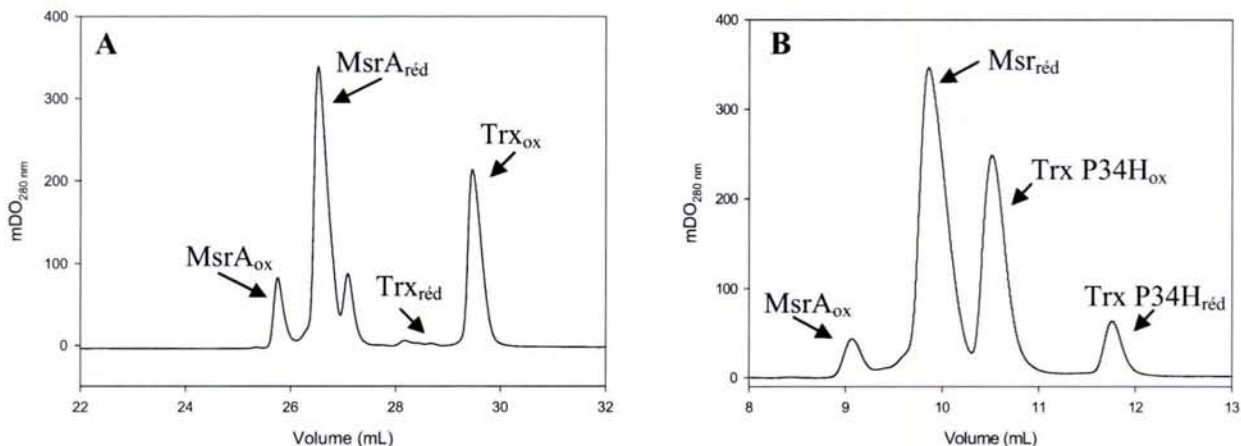


Figure 55 : Profil d'élution des mélanges équimolaires MsrA_{ox} / Trx_{réd} ou Trx P34H_{réd} après 20 heures d'incubation à 25°C et pH 7,0. La concentration de MsrA et de Trx ou Trx P34H est de 50 μ M chacune. L'équilibration est réalisée en tampon phosphate (100 mM KPi, 1 mM EDTA, pH 7). Les protéines sont séparées par chromatographie en phase inverse sur colonne C₈ et l'élution des protéines est suivie par la mesure de la DO à 280 nm. A) Profil de séparation du mélange MsrA/Trx, B) Profil de séparation du mélange MsrA/Trx P34H.

1.3.2 Conclusion

Les données obtenues mettent en évidence une différence de 80 mV entre les potentiels redox de la MsrA et de la Trx, qui reflète un équilibre fortement déplacé vers la formation de MsrA_{réd} et Trx_{ox}, caractérisé par une constante d'équilibre K' de l'ordre de 500. L'étude de l'équilibre entre la MsrB de *N. meningitidis* et la Trx, réalisée par Alexandre Olry et Fabrice Neiers, a conduit à des conclusions similaires avec un potentiel redox E'°_{MsrB} de l'ordre de - 200 mV, proche de celui de la MsrA. Ainsi, la réaction redox entre Msr et Trx est contrôlée thermodynamiquement afin de ne permettre que le transfert des deux électrons de la Trx_{réd} vers la Msr_{ox}.

I.5 Publication 1

M. ANTOINE, S. BOSCHI-MULLER et G. BRANLANT. (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *N. meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, 278, 45352-357.

Pages 93 à 98.

I.6 Publication 2 (Revue)

S. BOSCHI-MULLER, A. OLRY, M. ANTOINE et G. BRANLANT. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703, 231-8.

Pages 99 à 106.

Kinetic Characterization of the Chemical Steps Involved in the Catalytic Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Neisseria meningitidis**

Received for publication, July 11, 2003, and in revised form, September 2, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 3, 2003, DOI 10.1074/jbc.M307471200

Mathias Antoine, Sandrine Boschi-Muller, and Guy Branlant‡

From the UMR 7567 CNRS/UHP – Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Oxidation of methionine into methionine sulfoxide is associated with many pathologies and is described to exert regulatory effects on protein functions. Two classes of methionine sulfoxide reductases, called MsrA and MsrB, have been described to reduce the *S* and the *R* isomers of the sulfoxide of methionine sulfoxide back to methionine, respectively. Although MsrAs and MsrBs display quite different x-ray structures, they share a similar, new catalytic mechanism that proceeds via the sulfenic acid chemistry and that includes at least three chemical steps with 1) the formation of a sulfenic acid intermediate and the concomitant release of methionine; 2) the formation of an intra-disulfide bond; and 3) the reduction of the disulfide bond by thioredoxin. In the present study, it is shown that for the *Neisseria meningitidis* MsrA, 1) the rate-limiting step is associated with the reduction of the Cys-51/Cys-198 disulfide MsrA bond by thioredoxin; 2) the formation of the sulfenic acid intermediate is very efficient, thus suggesting catalytic assistance via amino acids of the active site; 3) the rate-determining step in the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond is that leading to the formation of the sulfenic intermediate on Cys-51; and 4) the apparent affinity constant for methionine sulfoxide in the methionine sulfoxide reductase step is 80-fold higher than the K_m value determined under steady-state conditions.

MsrAs, called MsrA and MsrB. The physiological role of MsrAs has been particularly well illustrated. For instance, mice lacking MsrA show an atypical walking pattern and have a reduced life span (3), whereas in contrast, overexpression of the *msrA* gene in the nervous system markedly extends the life span of the fruit fly *Drosophila* (4).

MsrAs and MsrBs have been extensively characterized at both structural (5–9) and enzymatic levels (10–14). Although MsrAs from *Escherichia coli*, *Bos taurus*, and *Mycobacterium tuberculosis* and MsrB from *Neisseria gonorrhoeae* show quite different three-dimensional x-ray structures and are specific for the *S* and the *R* isomers of the sulfoxide of MetSO, respectively, both structural classes of Msrs present a similar, new catalytic mechanism that includes a minimum of three chemical steps (Scheme 1). This is the case for MsrA and MsrB from *Neisseria meningitidis* (13). In the first step, a Michaelis complex is formed between Msr and MetSO that precedes the nucleophilic attack of the catalytic cysteine on the sulfoxide of MetSO. Then, a 1,3-sigmatropic rearrangement of the tetrahedral transition state probably occurs, which leads to formation of a sulfenic acid intermediate with a concomitant release of 1 mol of Met/mol of Msr. In the second step, an intradisulfide bond is formed between the cysteine oxidized under sulfenic acid state and another cysteine. Finally, in the third step, a Michaelis complex is formed between the oxidized Msr and the reduced form of thioredoxin (Trx) that precedes the reduction of the disulfide bond of the Msr by Trx. Such a mechanism is in agreement with the ping-pong mechanism that was recently determined for the MsrA from *E. coli* (11) and for the MsrB from *N. meningitidis*.²

No information is presently available for any of the two classes of Msrs on the nature of the amino acids essential for the catalysis or on the substrate stereo specificities. Such studies require first determining the rates of all the steps implicated in the mechanism to interpret the effects of the amino acid substitutions introduced by site-directed mutagenesis. As mentioned above, a sulfenic acid intermediate is formed in the first step. However, no information is available on the nature of the transition state(s) that leads to the sulfenic acid intermediate and on the efficiency of the reduction of MetSO. Furthermore, we do not know how efficient the formation of the intradisulfide bond is. In addition, finally, no kinetic data are available for the Trx reduction process.

In the present study, the rates of the three steps have been investigated for the MsrA from *N. meningitidis*. To attain these rates, adapted experimental kinetics approaches were used. The data show that the step associated with the Trx reduction process is rate-limiting, whereas the rate of the sulfoxide re-

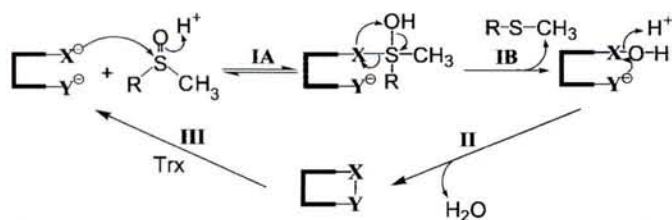
Methionine residues are easily oxidized to methionine sulfoxides (MetSO)¹ by reactive oxygen and nitrogen species produced either by aerobic metabolism or after exposure to various agents. This post-translation modification can provoke loss of protein function (1) and has been implicated in the aging process (for a review, see Ref. 2). Therefore, organisms have developed various defense strategies. One consists of restoring the biological function of the modified MetSO proteins. This is the role of methionine sulfoxide reductases (Msr), which reduce MetSO back to methionine (Met). There exist two classes of

* This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique ("Programme Physique et Chimie du Vivant 2000," "Programme Protéomique et Génie des Protéines 2001"), the University Henry Poincaré Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 5436), and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-83-68-43-04; Fax: 33-3-83-68-43-07; E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

¹ The abbreviations used are: MetSO, methionine sulfoxide; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzoate; MES, 2(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; Msr, methionine sulfoxide reductase; MsrA, methionine sulfoxide reductase A; MsrB, methionine sulfoxide reductase B; Trx, thioredoxin.

² A. Olry, unpublished results.



SCHEME 1. Proposed catalytic mechanism of MsrA and MsrB from *N. meningitidis*. A Michaelis complex is formed between Msr and MetSO, which precedes the nucleophilic attack of Cys-X on the sulfur atom of the sulfoxide function of MetSO (step IA). Then, a 1,3-sigmatropic rearrangement of the tetrahedral transition state probably occurs, which led to formation of a sulfenic acid intermediate with a concomitant release of 1 mol of Met/mol of enzyme (step IB). Steps IA and IB are favored by acid-assisted catalysis. In step II, nucleophilic attack of Cys-Y on the sulfur atom of the sulfenic acid leads to formation of a Cys-X/Cys-Y disulfide bond and a release of a water molecule, which is also favored by acid-assisted catalysis. In step III, return of the active site to a fully reduced state proceeds via reduction of the Msr disulfide bond by reduced Trx.

duction is very rapid and is rate-determining in the process leading to the formation of the intradisulfide bond. These results are discussed in relation with the three-dimensional structures of MsrAs described so far.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-directed Mutagenesis, Production, and Purification of Wild-type and Mutant *N. meningitidis* MsrAs—The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* MsrA productions was BE002 (MG1655 *msrA::spec* Φ , *msrB::* α 3kana), transformed with the plasmidic construction pSKPILBMsra containing the coding sequence of *msrA* under the *lac* promoter (13). The BE002 strain was kindly provided by Dr F. Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli* and thus avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* MsrA by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications were realized as described previously (13) with minor modifications. A Q-Sepharose column was done at 4 °C, and wild-type and mutant proteins were eluted at 80 mM KCl. At this stage, wild-type and mutant MsrAs were pure, as checked by electrophoresis on 12.5% SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses.

Storage of the enzymes was done as described previously (13). The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of 26,200 M⁻¹ cm⁻¹ for wild-type and C198S MsrA (13) and 20,480 M⁻¹ cm⁻¹ for W53F MsrA. In this report, *N. meningitidis* MsrA amino acid numbering is based on *E. coli* MsrA.

Quantification of the Free Cysteine Content with 5,5'-Dithiobis(2-nitro)benzoate (DTNB)—Cysteine content of MsrA and Trx was determined using DTNB under non-denaturing conditions in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) as described previously (10).

Preparation of MsrA and Trx, under Oxidized Disulfide State—MsrA oxidation was achieved by mixing 100 μ M MsrA with 100 mM MetSO in buffer A. The MetSO used was DL-Met-R,S-SO, of which only the S isomer is a substrate for MsrA. For Trx, oxidation was achieved by mixing 500 μ M Trx with 1 mM DTNB in buffer A. After 10 min of incubation at room temperature, oxidized proteins were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A. Oxidation of both proteins in the disulfide state was checked by titration with DTNB.

Fluorescence Properties of Wild-type and Mutated MsrAs and Trx—The fluorescence characteristics of 1) the wild-type MsrA in its reduced form and Cys-51/Cys-198 disulfide state, 2) the C198S MsrA in its reduced form and sulfenic acid state, 3) the W53F MsrA in its reduced form and Cys-51/Cys-198 disulfide state, and 4) the Trx in its reduced and disulfide state were recorded on a fix spectrofluorometer (SAFAS) thermostated at 25 °C, in buffer A with 10 μ M of each protein (see the legends of Figs. 1 and 2 for more details).

Determination of the Rate of Met Formation and of Thiol Loss by Single Turnover Quenched-flow Experiments—Quenched-flow measurements were carried out at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for the double-mixing mode and adapted to recover the quenched samples. The apparatus worked in a

pulsed mode. Under the conditions used, a minimum aging time of about 25–40 ms was determined. Equal volumes (57.5 μ l) of a solution containing 550 μ M MsrA in 50 mM MES, pH 5.5, or buffer A and a solution containing 200 mM MetSO in 50 mM MES, pH 5.5, or buffer A were mixed in the aging loop. The mixture was then allowed to react for 40–500 ms before being mixed with 115 μ l of a quenching aqueous solution containing 2% of trifluoroacetic acid. Quenched samples were then collected in a 200- μ l loop. For each aging time, four shots were done, and the four corresponding quenched samples were pooled in a volume of 700 μ l and then analyzed.

To precipitate the protein, 50 μ l of 100% trifluoroacetic acid were added to aliquots of 300 μ l of the quenched samples. Samples were centrifuged at 12,000 \times g for 30 min at room temperature. Met quantification in the resulting supernatant was carried out by reverse-phase chromatography as described previously in Ref. 10, with slight modifications: 100 μ l were injected onto a 4.6 \times 250 mm Atlantis dC18 reverse-phase column (Waters) on an AKTA explorer system (Amersham Biosciences), equilibrated with H₂O, 7.5% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid. Met was eluted isocratically after MetSO.

The other part of the quenched samples that were not treated with 100% of trifluoroacetic acid was used to 1) determine the protein concentration from the absorbance at 280 nm and 2) quantify the free cysteine content, using 2,2'-dipyridyldisulfide as a thiol probe, in the presence of urea to avoid precipitation of the protein in the cuvette. Progress curves of pyridine-2-thione production were recorded at 343 nm in 1.1 M urea, buffer A. Enzyme concentration was 6.19 μ M, and 2,2'-dipyridyldisulfide concentration was 665 μ M. The amount of pyridine-2-thione formed was calculated using an extinction coefficient at 343 nm of 8,080 M⁻¹ cm⁻¹.

Data were plotted as mol of Met formed per mol of MsrA and as free remaining thiols per mol of MsrA, both as a function of time. The rate of Met formation was determined by fitting the curve to the monoexponential equation (Equation 1) in which *a* represents the fraction of Met formed per mol of MsrA and *k*_{obs} represents the rate constant.

$$y = a(1 - e^{-k_{obs}t}) \tag{Eq. 1}$$

The rate of loss in free thiols was determined by fitting the curve to the monoexponential equation (Equation 2) in which *y*₀ represents the number of free remaining thiols, *a* represents the number of oxidized thiols, and *k*_{obs} represents the rate constant.

$$y = y_0 + a e^{-k_{obs}t} \tag{Eq. 2}$$

Kinetics of the Formation of the Cys-51/Cys-198 MsrA Disulfide Bond in the Absence of Trx by Single Turnover Stopped-flow Experiment—Kinetics of the MsrA fluorescence increase associated with the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond were measured at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for fluorescence measurements. The excitation wavelength was set at 284 nm, and the emitted light was collected using a 320-nm cutoff filter. One syringe contained MsrA in buffer A (10 μ M, final concentration after mixing), and the other one contained MetSO at various concentrations in buffer A (25 mM to 1 M, final concentration). An average of six runs was recorded for each MetSO concentration. Rate constants, *k*_{obs}, were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential equation (Equation 3) in which *c* represents the end point, *a* represents the amplitude of the fluorescence increase (<0), and *k*_{obs} represents the rate constant.

$$y = a e^{-k_{obs}t} + c \tag{Eq. 3}$$

Data were fit to Equation 4 using least squares analysis to determine *k*_{obs max} and *K* for MetSO. *S* represents the MetSO concentration, and *K* represents the apparent affinity constant.

$$k_{obs} = k_{obs max} S / (K + S) \tag{Eq. 4}$$

Kinetics of the Reduction of the Cys-51/Cys-198 MsrA Disulfide Bond by Trx by Single Turnover Stopped-flow Experiments—Kinetics measurements of the Trx fluorescence quenching associated with the formation of the Cys-32/Cys-35 disulfide bond upon the reduction of the oxidized MsrA were carried out as described above. The excitation wavelength was set at 310 nm, and the emitted light was collected using a 320-nm cutoff filter. One syringe contained the oxidized MsrA in buffer A (25 μ M, final concentration), and the other one contained the reduced Trx at various concentrations in buffer A (from 20 to 800 μ M, final concentration). An average of six runs was recorded for each concentration of Trx. Rate constants, *k*_{obs}, were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential Equation 3 with *a* > 0.

Determination of k_{cat} and K_m for Trx under Steady-state Conditions—Kinetic parameters were determined in steady-state conditions with the Trx reductase recycling system (*E. coli* Trx reductase (4.8 μ M), NADPH (1.2 mM), saturating concentration of MetSO (100 mM)) and by varying the concentrations of Trx. Initial rate measurements were carried out at 25 °C in buffer A on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. Initial rate data were fitted to the Michaelis-Menten relationship using least squares analysis to determine k_{cat} and K_m for Trx. *E. coli* Trx1 and Trx reductase were prepared following experimental procedures already published (15, 16).

RESULTS AND DISCUSSION

MsrA from *N. meningitidis* possesses two cysteines at position 51 and 198 (13). As mentioned in the Introduction, the catalytic mechanism of the MsrA from *N. meningitidis* involves three chemical steps: a) the reduction of MetSO, which leads to the formation of a sulfenic acid intermediate on Cys-51 and a concomitant release of 1 mol of Met/mol of enzyme; b) the formation of an intradisulfide bond between Cys-51 and Cys-198; and c) the reduction of the disulfide bond by Trx, which finally liberates MsrA and Trx under reduced and oxidized forms, respectively.

To investigate the rates of all these steps thus implied setting up experimental approaches that selectively apprehended each rate. For the formation of the sulfenic acid intermediate, the rate was determined by following that of the Met formation under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of Trx. For the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond, two methods were used, also under single turnover conditions. The first one took advantage of the observation that the fluorescence emission intensity of MsrA increased upon going from the reduced to the oxidized disulfide forms. The second one used a specific thiol reagent to follow the rate of the oxidation of Cys-51 and Cys-198, which was shown to occur concomitantly. The third step was apprehended by following the rate of the reduction of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond by Trx under single turnover conditions, using as a probe the quenching of the Trx fluorescence intensity upon going from reduced to oxidized forms. Finally, the catalytic constants of MsrA were determined for the MetSO reductase step and the Trx-reducing step as well, under conditions in which the concentrations of the substrates were nearly saturating.

Characterization of the Fluorescence Properties of the MsrA and Trx under Reduced and Disulfide Oxidized Forms—MsrA, under reduced form, presented a maximum excitation wavelength at 284 nm and a fluorescence emission maximum at 302 nm with a shoulder around 340 nm (Fig. 1). This suggested a contribution of both tyrosine and tryptophan residues to the fluorescence signal when excitation was set at 284 nm. In MsrA from *N. meningitidis*, there are 16 tyrosines and 1 tryptophan at position 53. When excitation was done at 295 nm, a fluorescence emission maximum was observed at 340 nm (Fig. 1). This suggested the contribution of only Trp-53 at this excitation wavelength. This was confirmed by the fact that W53F MsrA did not exhibit any fluorescence emission at 340 nm when the excitation was done at 295 nm (spectrum not shown). When excited at 295 nm, oxidized MsrA in the Cys-51/Cys-198 disulfide state also showed a fluorescence emission maximum at 340 nm but with a fluorescence increase of 85% (integrated from 320 to 450 nm) when compared with that of the reduced form (Fig. 1). Inspection of the x-ray structure shows that Trp-53 is situated in an α helix near the catalytic Cys-51 (5). Therefore, the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond, which is located near Trp-53, is likely responsible for the increase of the fluorescence emission intensity at 340 nm.

As already shown by others, Trx1 from *E. coli* exhibited a fluorescence emission maximum at 342 nm when excited at 280

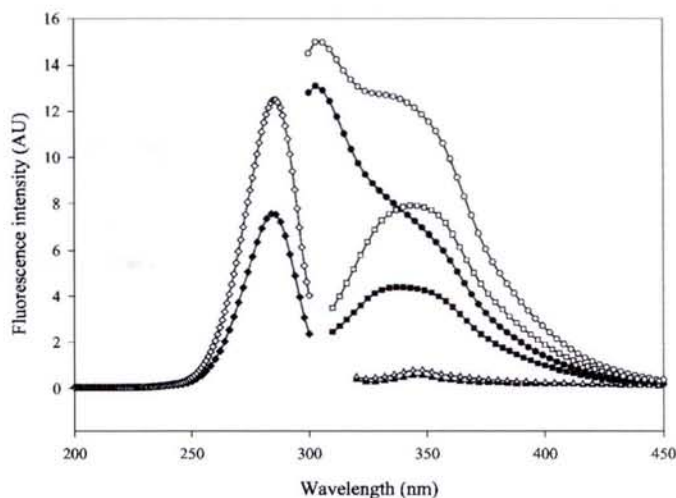


FIG. 1. Fluorescence spectra of *N. meningitidis* MsrA under reduced and disulfide oxidized state. Excitation spectra of reduced (\blacklozenge) and oxidized (\diamond) MsrA (emission followed at 340 nm), emission spectra of reduced (\bullet) and oxidized (\circ) MsrA (excitation at 284 nm), reduced (\blacksquare) and oxidized (\square) MsrA (excitation at 295 nm), and reduced (\blacktriangle) and oxidized (\triangle) MsrA (excitation at 310 nm) were recorded with 10 μ M protein at 25 °C in buffer A.

nm (17). Two tryptophans are present in the *E. coli* enzyme at positions 28 and 31, and it was shown that Trp-28 is mainly responsible for the strong quenching of the fluorescence emission intensity observed when Trx is oxidized in the Cys-32/Cys-35 disulfide state (17–19). Therefore, following the rate associated with the formation of the Cys-32/Cys-35 Trx disulfide bond on a stopped-flow apparatus equipped for fluorescence measurements can give information on the nature of the rate-limiting step in the Trx-reducing process provided that the fluorescence signal of the Msr does not interfere. As mentioned above, the reduction of the Cys-51/Cys-198 MsrA bond also leads to a quenching of the fluorescence emission intensity at 340 nm. However, as shown in Fig. 2, when the excitation was done at 295 nm, the contribution of MsrA to the quenching of the fluorescence signal is small when compared with that of Trx. It is even insignificant when the excitation was done at 310 nm and when considering the ratio of the fluorescence emission intensity of both partners, integrated from 320 to 450 nm (Fig. 2).

Rate of the Met Formation—A means to determine the rate of the formation of the sulfenic acid intermediate was to attain that of the Met, which is formed concomitantly. To do so, the stopped-flow apparatus was adapted to be used in a quenched-flow mode. At various times of incubation of MsrA with MetSO, in the absence of Trx, the reaction mixture was quenched by mixing it with trifluoroacetic acid. Met was then quantified by reverse-phase chromatography analysis (see “Experimental Procedures” for more details). The study was done at 100 mM MetSO, a concentration that is known to be saturating under steady-state conditions (13). At pH 8, which is the optimum pH determined under steady-state conditions (data not shown), a Met burst was observed with a stoichiometry of 0.9 mol of Met/mol of MsrA. However, the rate of the Met formation was too fast, at least 100 s^{-1} , to be determined with the apparatus adapted for quenched-flow experiments, which gave a minimum aging time around 30 ms. In contrast, at pH 5.5, the curve profile fitted to the monoexponential Equation 1 with a k_{obs} value of $12 \pm 1 s^{-1}$ and a stoichiometry of 0.9 ± 0.1 mol of Met/mol of MsrA (Fig. 3). Under steady-state conditions, at 200 μ M Trx and 100 mM MetSO, k_{cat} values were 7 and 0.6 s^{-1} at pH 8 and 5.5, respectively. Therefore, the data demonstrated that the rate-limiting step in MsrA occurs after the formation of the

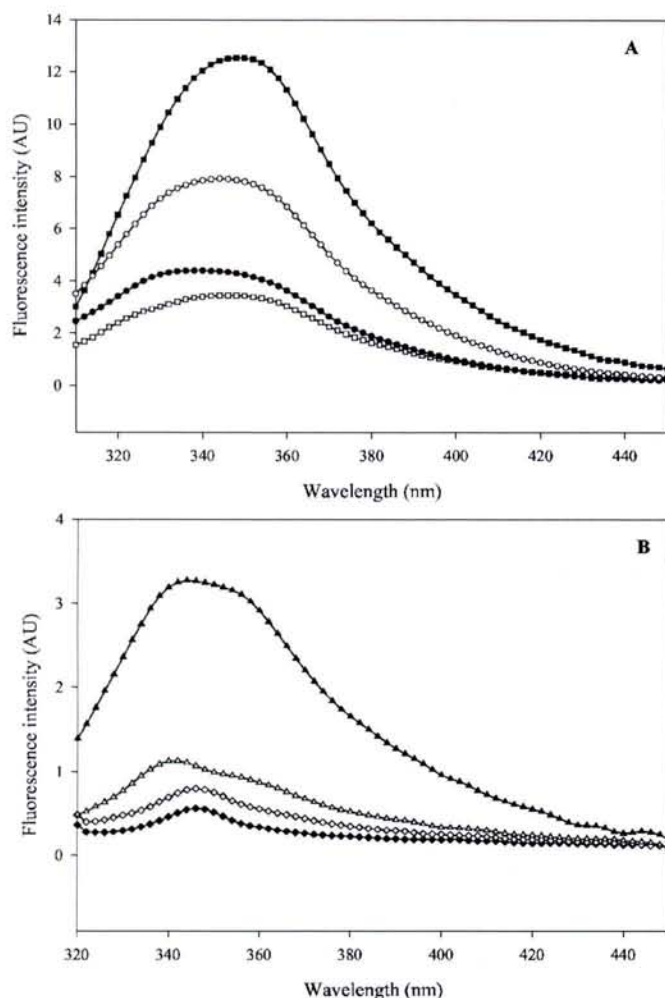


FIG. 2. Fluorescence emission spectra of *E. coli* thioredoxin under reduced and disulfide oxidized state and comparison with those of *N. meningitidis* MsrA under reduced and disulfide oxidized state. In A, fluorescence spectra of 10 μM reduced (■) and oxidized (□) Trx and reduced (●) and oxidized (○) MsrA in buffer A were recorded at 25 °C on excitation at 295 nm. In B, fluorescence spectra of 10 μM reduced (▲) and oxidized (△) Trx and reduced (◆) and oxidized (◇) MsrA in buffer A were recorded at 25 °C on excitation at 310 nm.

sulfenic acid intermediate and is associated with either the Cys-51/Cys-198 disulfide bond formation or the Trx reduction process.

Rate of the Formation of Cys-51/Cys-198 MsrA Disulfide Bond—First, the rate of formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond was determined at 100 mM MetSO in the absence of Trx by following the increase of the MsrA fluorescence emission intensity due to the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond. Two pH conditions were investigated. At pH 8 and 5.5, a fast increase of the fluorescence signal was observed. The curves fitted to the monoexponential Equation 3 with k_{obs} values of $144 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ and $11 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, respectively (Fig. 4). The k_{obs} value at pH 5.5 is similar to that of the Met formation at the same pH. Therefore, this strongly suggested that the step leading to the formation of Met, and thus of the sulfenic acid intermediate, is rate-determining in the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond. In other words, the rate of the nucleophilic attack of Cys-198 on the Cys-51 sulfenic intermediate is limited by that determining the formation of the sulfenic acid intermediate, which as a consequence does not accumulate. Therefore, even if a change in the fluorescence emission intensity of the MsrA occurs upon the formation of the sulfenic acid, this should not interfere with the increase of the fluorescence

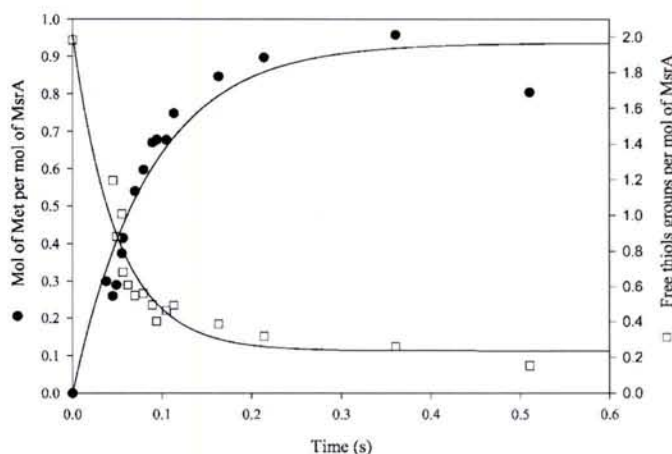


FIG. 3. Time-resolved appearance of Met and disappearance of free thiols of *N. meningitidis* MsrA under single turnover kinetics. A quenched-flow experiment was carried out at 25 °C in 50 mM MES, pH 5.5. Briefly, reduced MsrA (275 μM , final concentration) was allowed to react with MetSO (100 mM, final concentration) in the aging loop of the stopped-flow apparatus before being mixed with a 2% trifluoroacetic acid aqueous solution (1% final concentration). After recovery, quenched samples were used for Met quantification and free thiols titration as well (see "Experimental Procedures" for more details). Symbols represent experimental points (● for Met, □ for free thiols). Data were fitted to Equations 1 and 2, respectively, and gave rate constants of 11 ± 1 and $20 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, respectively.

signal observed upon the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond. To confirm this interpretation, C198S MsrA was produced. In this mutated protein, the Cys-51 sulfenic acid intermediate accumulates (13). Its formation led to a quenching of the fluorescence signal of Trp-53 (data not shown) in contrast to the increase observed when following the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond in wild-type MsrA. Thus, the fact that only an increase of the fluorescence signal was observed in the wild-type enzyme again supports the nonaccumulation of the sulfenic acid intermediate in the wild-type enzyme. The fact that the k_{obs} value at pH 8 is 144 s^{-1} confirms that the k_{obs} value of the Met formation could not be attainable in the previous quenched-flow experiment with the stopped-flow apparatus.

A second approach for determining the rate of the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond was to follow the loss of the two free thiol groups. This analysis was done with the samples obtained from the quenched-flow experiments described above. As suggested above, as soon as Cys-51 is oxidized into sulfenic acid form, Cys-198 forms a disulfide bond with Cys-51. Consequently, the enzyme should pass directly from the reduced state form with two free thiols to the oxidized Cys-51/Cys-198 disulfide form with no more free thiols. At pH 5.5 and using 100 mM MetSO, the curve profile fitted to the monoexponential Equation 2, with the loss of two cysteines and a k_{obs} value of $20 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 3). The fact that the k_{obs} value is in the range of that found for the Met formation again supports a rate-determining step associated with the formation of the sulfenic acid intermediate and the nonaccumulation of the sulfenic acid intermediate.

Rate of the Reduction of Cys-51/Cys-198 MsrA Bond by Trx—As already mentioned, the rate of reduction of the Cys-51/Cys-198 MsrA disulfide bond was determined on a stopped-flow apparatus by following selectively the quenching of the fluorescence emission intensity of Trx upon going from the reduced to an oxidized form, *i.e.* Cys-32/Cys-35 intradisulfide state or MsrA Cys-198/Trx Cys-32 interdisulfide form. Under the experimental conditions used, at pH 8, the concentration of the Cys-51/Cys-198 disulfide MsrA was 25 μM , and the concentration of the reduced Trx was varied from 75 μM to up 800 μM .

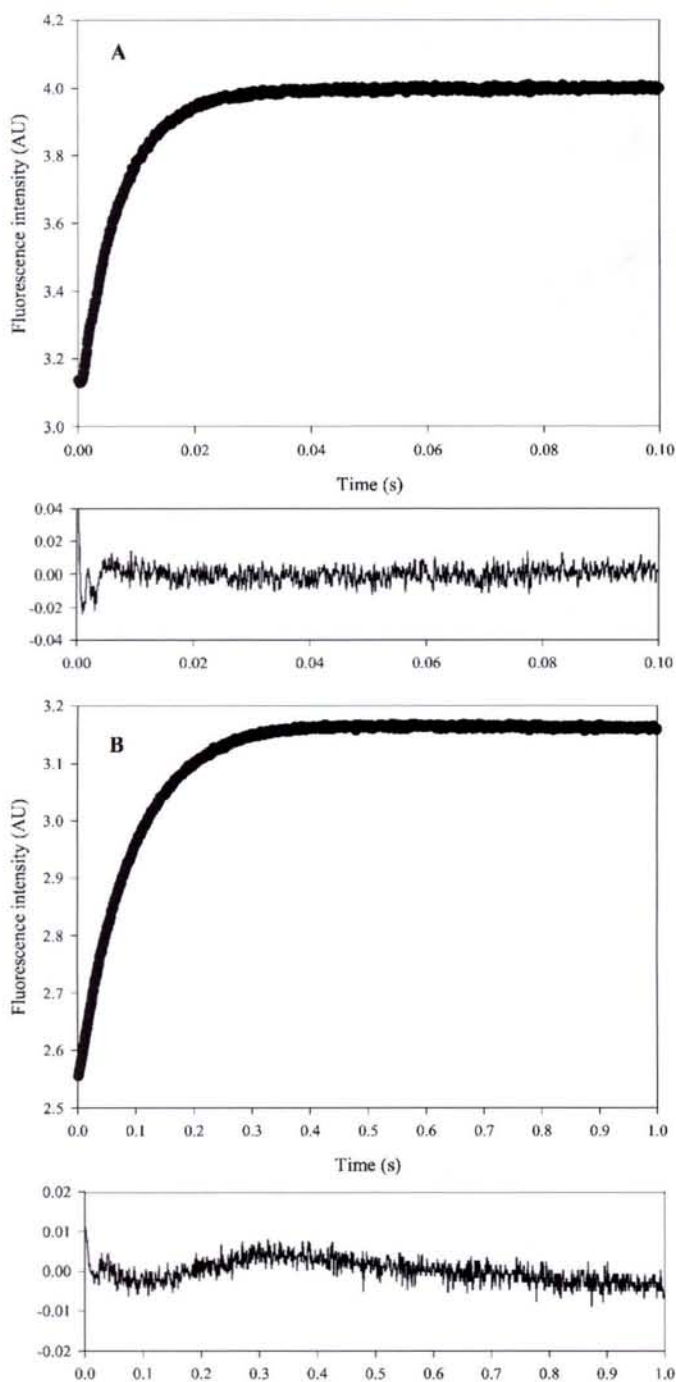


FIG. 4. Rate of formation of the Cys-51/Cys-198 MsrA disulfide bond measured by fluorescence stopped-flow experiment under single turnover kinetics. The MsrA fluorescence increase associated with the disulfide bond formation was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C in buffer A (A) or in 50 mM MES, pH 5.5 (B). In both experiments, MsrA and MetSO final concentrations were 10 μM and 100 mM, respectively. Excitation wavelength was set at 284 nm, and emitted light was collected via a 320 nm cutoff filter. The upper frames show the recorded fluorescence trace, and the lower frames show the residual values of the best monoexponential fit. Rate constants were 144 ± 1 and $11 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ in buffer A and in MES buffer, pH 5.5, respectively.

For each concentration of Trx, a k_{obs} value was determined. At a concentration of 200 μM Trx, a k_{obs} value of 9.5 s^{-1} was obtained (Fig. 5). This value is in the range of the rate value of 7 s^{-1} found under steady-state conditions, *i.e.* 200 μM Trx and 100 mM MetSO, and under conditions in which the process of Trx reduction by thioredoxin reductase and NADPH was shown not to be rate-limiting. These results demonstrated that

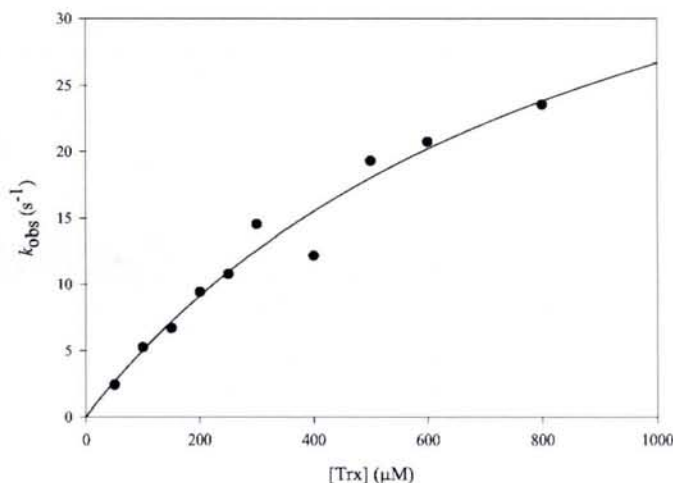


FIG. 5. Rate of reduction of the Cys-51/Cys-198 *N. meningitidis* MsrA disulfide bond by *E. coli* Trx measured by fluorescence stopped-flow experiment. The Trx fluorescence quenching associated with Trx disulfide bond formation was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C in buffer A by mixing reduced Trx and oxidized MsrA. MsrA final concentration was 25 μM . Excitation wavelength was set at 310 nm, and emitted light was collected via a 320 nm cutoff filter. Data were then fitted to the Michaelis-Menten relationship by least squares regression, which gave $k_{\text{obs max}}$ and K_m values of $50 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ and $930 \pm 300 \mu\text{M}$, respectively. Symbols (●) represent experimental points.

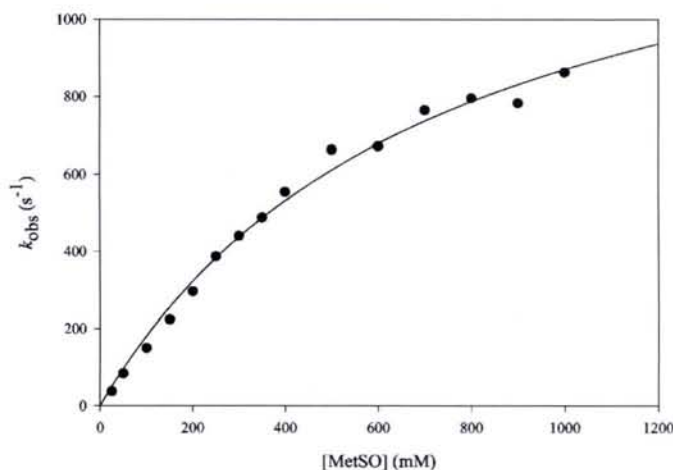


FIG. 6. Determination of the catalytic parameters of the MetSO reductase step of the *N. meningitidis* MsrA. The MsrA fluorescence increase associated with the Cys-51/Cys-198 disulfide bond formation was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C in buffer A. MsrA final concentration was 10 μM . Excitation wavelength was set at 284 nm, and emitted light was collected via a 320-nm cutoff filter. Data were then fitted to Equation 4 by least squares regression which gave $k_{\text{obs max}}$ and apparent affinity constant values of $1510 \pm 90 \text{ s}^{-1}$ and $740 \pm 80 \text{ mM}$, respectively. Symbols (●) represent experimental points.

the rate-limiting step of MsrA is associated with the Trx reduction process. Furthermore, we could conclude that the rate-limiting step is prior to the dissociation of oxidized Trx from reduced MsrA, a step that occurs after the chemical process. In this context, the rate-limiting step can be associated either with the formation of the Michaelis complex between the oxidized MsrA and the reduced Trx or with the chemical processes associated with either the formation of the interdisulfide bond between Cys-198 of the MsrA and Cys-32 of Trx or the nucleophilic attack of Cys-35 of Trx on Cys-32 engaged in an interdisulfide bond with the Cys-198 of MsrA. Although additional experiments are needed, it is probable that the formation of the Cys-32/Cys-35 Trx intradisulfide bond is efficient, similar to what is observed for the formation of the Cys-51/Cys-198 MsrA

intradisulfide bond, and therefore is not rate-limiting.

The K_m Trx and $k_{obs\ max}$ values cannot be determined with accuracy (Fig. 5). This is because when Trx is in a large excess when compared with MsrA, the fluorescence quenching message measured upon the formation of the oxidized Trx becomes small as compared with the fluorescence message of the remaining reduced Trx and, as a consequence, the quenching signal cannot be measured with great precision. Therefore, only an estimation of the K_m Trx and of the $k_{obs\ max}$ values was made, i.e. 500–900 μ M and at least 30 s^{-1} , respectively. The values of K_m for Trx and $k_{obs\ max}$ are much higher than those described so far by our group and other groups, which were determined under steady-state conditions with the Trx reductase recycling system. This apparent discrepancy is probably due to the fact that under the steady-state conditions used, the rate of the Trx reductase process becomes rate-limiting at high concentrations of Trx.

Rate of the Met Formation under Saturating MetSO Concentration—The fact that the Trx reduction step is rate-limiting suggested that the K_m value for MetSO determined under steady-state conditions was much lower than the apparent affinity constant in the MetSO reductase step. Indeed, having a slow step following a fast catalytic one always lowers the K_m value for the substrate. Thus, the concentration of MetSO, i.e. 100 mM, which was used for determining the k_{obs} of the reductase activity, was probably not saturating. This is indeed the case. At pH 8, using the fluorescence signal increase observed upon the formation of the Cys-51/Cys-198 bond, in the absence of Trx, a k_{obs} value of 795 s^{-1} was observed at 800 mM MetSO. From the curve, an apparent affinity constant value of 740 mM for MetSO with a $k_{obs\ max}$ value of 1510 s^{-1} can be estimated (Fig. 6). These values are 80- and 40-fold higher than those determined under steady-state conditions at 200 μ M Trx, respectively. As shown above, the rate of the formation of the sulfenic acid intermediate is rate-determining in the process leading to the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond. Therefore, the k_{obs} and affinity constant values correspond to those of the MetSO reductase step. In this context, it should be noted that the affinity constant values for the D and the L isomers of MetSO are similar (data not shown) and have to be divided by 2, taking into account the fact that the R isomer of the sulfoxide function of MetSO is neither a substrate nor an inhibitor of MsrA (13).

Conclusion—We have shown that 1) the rate-limiting step of the *N. meningitidis* MsrA reaction is associated with the thioredoxin reduction process and 2) the formation of the sulfenic acid intermediate is rate-determining within the two-step processes leading to the formation of the intradisulfide Cys-51/Cys-198 intermediate. As already mentioned (11), three subclasses of MsrAs exist. The *N. meningitidis* enzyme, which is the prototype of the first subclass, contains two essential cysteines at positions 51 and 198. The second one, which is represented by *E. coli* and *B. taurus* MsrAs, possesses three essential cysteines at positions 51, 198, and 206. In this case, only the Cys-198/Cys-206 disulfide bond was shown to be reduced by Trx (10). In fact, the reduction of the Cys-51/Cys-198 bond probably does not occur because of its nonaccumulation. As soon as the Cys-51/Cys-198 disulfide intermediate is formed, Cys-206, which is located in a flexible region, attacks it and forms the Cys-198/Cys-206 disulfide bond, which is then reduced by Trx. The fact that in C206S *E. coli* MsrA, the Cys-51/Cys-198 disulfide bond can be reduced by Trx (data not shown) supports our interpretation. The third subclass, which is rep-

resented by the *Bacillus subtilis* MsrA, contains two essential cysteines at positions 51 and 54. Also, in this case, the rate-limiting step is associated with reduction by Trx (data not shown).

Under saturating concentrations of MetSO, at pH 8, the rates of formation of the sulfenic acid intermediate and of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond are 1510 s^{-1} and at least 1510 s^{-1} , respectively. Thus, the chemical process that leads to the formation of the sulfenic acid is efficient. Cys-51 is probably activated by the active site, and the electrophilic character of the sulfur atom of the substrate sulfoxide and the rate of the 1,3-sigmatropic rearrangement of the tetrahedral transition state are likely increased via an acid catalyst belonging to the active site, which has been recently shown to be Glu-94 (data not shown). Both activations should favor the efficiency of the reductase process. Also, the rate of formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond is fast. Therefore, the nucleophilic attack of Cys-198 on sulfenic acid Cys-51 is also efficient. Inspection of the three-dimensional structures of MsrAs solved so far and comparison of the primary structures of MsrAs show that Cys-198 is located in a flexible region with no secondary structural elements (5). The fact that 1) a sulfenic acid is chemically unstable; 2) the Cys-198, as part of a flexible region, can easily approach position 51; and 3) an acidic amino acid likely intervenes to favor the release of the water molecule from the Cys-51 oxidized in the sulfenic acid state can explain why the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond is so efficient. Studies are presently underway to characterize all the amino acids of the MsrA from *N. meningitidis*, which are involved not only in the chemical activation of the three steps but also in the substrate specificities.

Acknowledgments—We are very grateful to Drs. A. Van Dorsselear and S. Sanglier-Cianferani for mass determination and to Dr. F. Barras for the gift of BE002 *E. coli* strain. We also thank Dr. S. Azza and C. Gauthier for very efficient technical help and Dr. E. McRae for the careful reading of the manuscript.

REFERENCES

- Vogt, W. (1995) *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 93–105
- Schoneich, C. (1999) *Exp. Gerontol.* **34**, 19–34
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12920–12925
- 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., Hoshi, T., Chen, M. L., Joiner, M. A., and Heinemann, S. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2748–2753
- Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure* **8**, 1167–1178
- Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307–13312
- Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Matthews, B. W. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 348–352
- Kauffmann, B., Favier, F., Olry, A., Boschi-Muller, S., Carpentier, P., Branlant, G., and Aubry, A. (2002) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1467–1469
- Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4119–4126
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913
- Boschi-Muller, S., Azza, S., and Branlant, G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 2272–2279
- Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., Honek, J. F., and Matthews, B. W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6463–6468
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., and Barras, F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48915–48920
- Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233–1244
- Mulrooney, S. B. (1997) *Protein Expression Purif.* **9**, 372–378
- Holmgren, A. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1992–1998
- Holmgren, A. (1981) *Biochemistry* **20**, 3204–3207
- Slaby, I., Cerna, V., Jeng, M. J., Dyson, H. J., and Holmgren, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3091–3096



Review

The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases

Sandrine Boschi-Muller, Alexandre Olry, Mathias Antoine, Guy Branlant*

UMR CNRS-UHP 7567, Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received 30 June 2004; received in revised form 14 September 2004; accepted 15 September 2004
Available online 6 October 2004

Abstract

The methionine sulfoxide reductase (Msr) family is composed of two structurally unrelated classes of monomeric enzymes named MsrA and MsrB, which display opposite stereo-selectivities towards the sulfoxide function. MsrAs and MsrBs, characterized so far, share the same chemical mechanism implying sulfenic acid chemistry. The mechanism includes three steps with (1) formation of a sulfenic acid intermediate with a concomitant release of 1 mol of methionine per mol of enzyme; (2) formation of an intramonomeric disulfide Msr bond followed by; (3) reduction of the oxidized Msr by thioredoxin (Trx). This scheme is in accordance with the kinetic mechanism of both Msrs which is of ping-pong type. For both Msrs, the reductase step is rate-determining in the process leading to the formation of the disulfide bond. The overall rate-limiting step takes place within the thioredoxin-recycling process, likely being associated with oxidized thioredoxin release. The kinetic data support structural recognition between oxidized Msr and reduced thioredoxin. The active sites of both Msrs are adapted for binding protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) more efficiently than free MetSO. About 50% of the MsrBs binds a zinc atom, the location of which is in an opposite direction from the active site. Introducing or removing the zinc binding site modulates the catalytic efficiency of MsrB.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Msr; Sulfenic acid; Catalytic mechanism; Rate-limiting step; Thioredoxin; Trp fluorescent probe

1. Introduction

Mild oxidizing conditions convert both free and protein-bound Met to methionine sulfoxide (MetSO). The oxidation of Met results in formation of asymmetric sulfoxides, which are referred to as Met-(R)-SO and Met-(S)-SO. Most organisms from the three kingdoms contain two different methionine sulfoxide reductases (Msrs) that reduce free and protein-bound MetSO residues. One Msr is specific for the reduction of Met-(S)-SO and is referred to as MsrA. The other one is specific for the reduction of Met-(R)-SO and is referred to as MsrB.

In vivo studies have shown that Msr activities in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* depend on the presence of thioredoxin (Trx). A Met auxotrophic strain, lacking Trx or Trx reductase (the physiological partner of Trx), is unable to grow in the presence of MetSO as the sole carbon source [1,2]. In vitro, Trx can be replaced by dithiothreitol (DTT) as a reductant.

MsrA and MsrB are monomeric enzymes which display no sequence identity and are structurally unrelated [3–7]. In the present review, the three-step catalytic mechanism of Msrs is described and discussed in terms of catalysis and substrate specificities, in relation with the Msr 3D structures.

2. Chemical mechanism: implication of the sulfenic acid chemistry

The MsrAs and MsrBs characterized so far share the same chemical mechanism involving sulfenic acid chem-

Abbreviations: MetSO, methionine sulfoxide; MsrA/B, methionine sulfoxide reductase A/B; Trx, thioredoxin; Msr_{ox}, Msr in the disulfide state; Msr_{red}, Msr in the reduced state; Trx_{ox}, Trx in the disulfide state; Trx_{red}, Trx in the reduced state; TNB⁻, 3-carboxy 4-nitrobenzenethiol; DTT, dithiothreitol

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 43 04; fax: +33 3 83 68 43 07.

E-mail address: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr (G. Branlant).

istry [8,9]. The mechanism includes three steps with: (1) formation of a sulfenic acid intermediate on the “catalytic” Cys residue, with concomitant release of 1 mol of Met per mol of enzyme, (2) formation of an intramonomeric disulfide bond between the catalytic Cys and the “recycling” Cys, with concomitant release of 1 mol of H₂O and; (3) reduction of the Msr disulfide bond by Trx, leading to regeneration of the reduced form of Msr (Msr_{red}) and to formation of oxidized Trx (Trx_{ox}) in a disulfide state (Fig. 1).

This mechanism has been demonstrated in particular on the Msrs from *Neisseria meningitidis*, which were produced as individual folded entities, while in vivo they are part of a three-domain protein named PILB [9]. The central domain shows a methionine sulfoxide reductase A (MsrA) activity, whereas the C-terminus domain displays a methionine sulfoxide reductase B (MsrB) activity. The chemical mechanism of both *N. meningitidis* Msrs involves two invariant Cys residues: the catalytic Cys (position 51 for MsrA and 117 for MsrB) and the recycling one (position 198 for MsrA and 63 for MsrB) (Fig. 2). For both enzymes, the stoichiometry of methionine formation was determined in the absence of reductant, which yielded 1 mol of methionine per mol of enzyme with loss of two thiols. This result is in agreement with formation of a disulfide bond between the catalytic and the recycling Cys. One mole of methionine was also formed with the Ser mutant of the recycling Cys with loss of one thiol, whereas no methionine was produced with the Ser mutant of the catalytic Cys. In the presence of Trx, a recycling activity was observed with the wild-type but not with the Ser mutant of the recycling Cys. Altogether, these results suggest the formation of a sulfenic acid on the catalytic Cys and its regeneration via the formation of an intramonomeric disulfide bond involving the recycling Cys then followed by reduction by Trx. Evidence for the formation of a sulfenic acid intermediate came from the use of 3-carboxy 4-nitrobenzenethiol (TNB⁻) and dimesone which are specific reagents of sulfenic acid. In the case of the Ser mutant of the recycling Cys, decrease of the absorbance at 410 nm by one equivalent of TNB⁻/mol was observed when the mutant was first incubated with MetSO and then treated with an excess of TNB⁻. Incubation of the mutant with MetSO and subsequent addition of dimesone produced an enzyme

species with an increased mass of 138 Da, in accordance with the formation of a covalent adduct between enzyme and dimesone. Moreover, the fact that an increased mass of 16 Da was observed by ESI-MS after incubation of the C198S MsrA from *E. coli* with MetSO is also in agreement with the formation of a sulfenic acid intermediate [8].

The fact that the catalytic mechanism takes place through the formation of a sulfenic acid intermediate for both Msrs supports the idea that sulfenic acid chemistry is a general feature in the reduction of sulfoxides by thiols. This new and original chemical mechanism of sulfoxide reduction by thiols highlights the importance of the sulfenic acid chemistry in the field of the oxidative stress. Such chemistry has been involved in the detoxification process of peroxides, in redox signaling pathways and in the regulation of specific transcription factors (see Ref. [10] for a review).

In the presence of Trx, a recycling activity was observed with wild-type Msrs but not with the Ser mutants of the recycling Cys. This showed that (1) the regeneration of the catalytic Cys occurs via the formation of an intradisulfide bond with the recycling Cys, followed by reduction by Trx; (2) the sulfenic acid intermediate formed on the catalytic Cys cannot be reduced by Trx. This latter result supports the observation that a sulfenic acid intermediate within an active site is usually not reducible by Trx except for the BCP protein and Prx1p [11,12]. This is in contrast to what is observed with DTT. Thus, this supports either a non-accessibility of the sulfenic acid within the active site of Msrs to Trx or more probably the formation of a non-productive complex between Ser mutants and Trx_{red}. In this context, knowledge of the three-dimensional structure of Msr mutants in the sulfenic acid state will be informative.

Inspection of the alignment of the protein sequences of Msrs whose activity has been characterized so far either biochemically or by gene inactivation, shows that the catalytic Cys residue is invariant while the recycling one is not. This is correlated to the fact that Msrs can proceed via different mechanisms for the regeneration of the catalytic Cys. Consequently, different subclasses of Msrs can be defined.

For MsrAs, at least four alternative mechanisms of C51 regeneration would be operative (Fig. 2A). The *N. meningitidis* MsrA represents the first subclass, characterized by the presence of the recycling Cys at position 198.

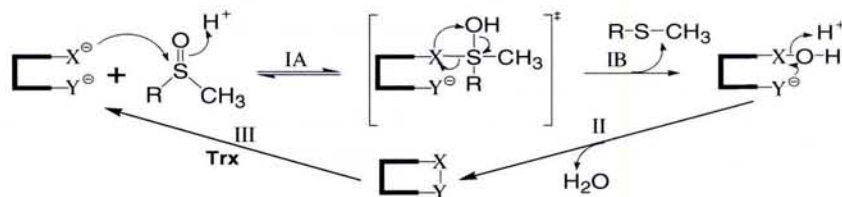


Fig. 1. Proposed catalytic mechanism of Msrs. Representation of the three-step chemical mechanism as described by Olry et al. [9]. In step III, a Michaelis complex is formed between Msr_{ox} and Trx_{red}. Then, a nucleophilic attack of Cys-32 of Trx on the disulfide bond of the Msr leads to formation of an intermolecular disulfide bond which is followed by a nucleophilic attack of Cys-35 of Trx that leads to Msr_{red} and Trx_{ox}. X represents the catalytic Cys and Y the recycling Cys.

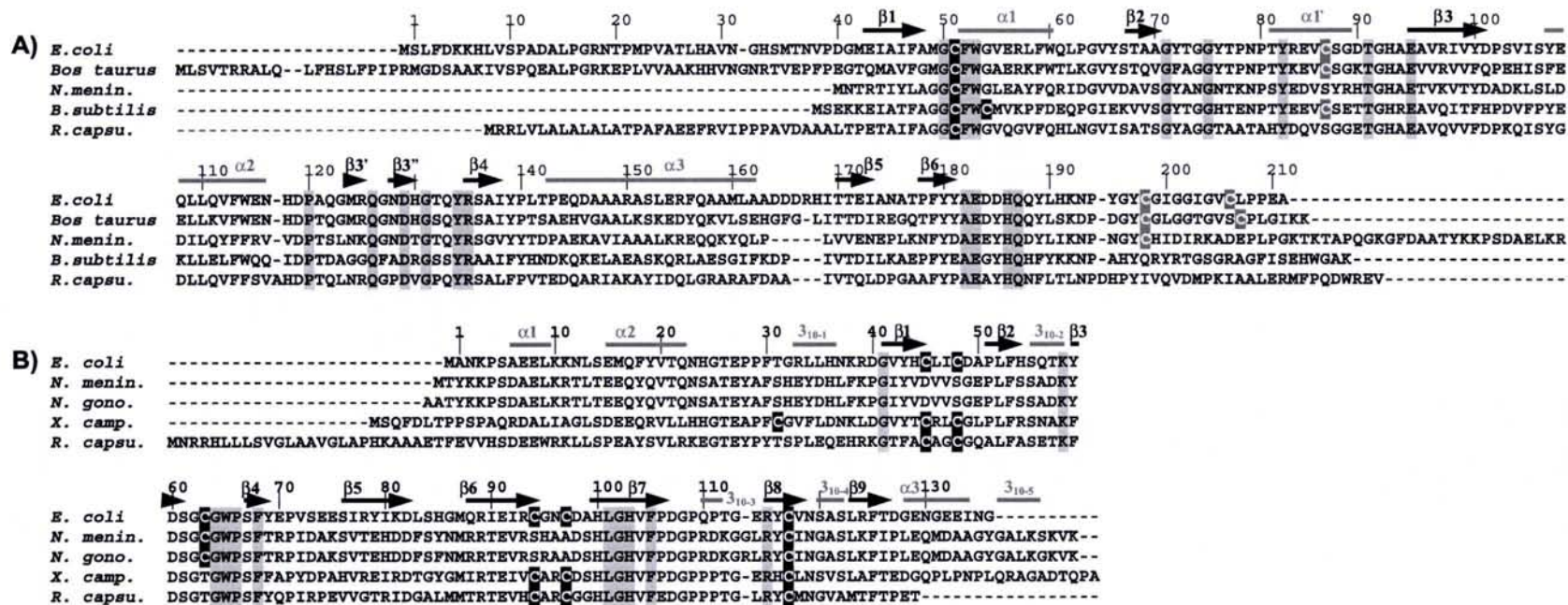


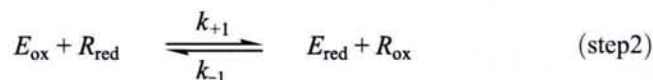
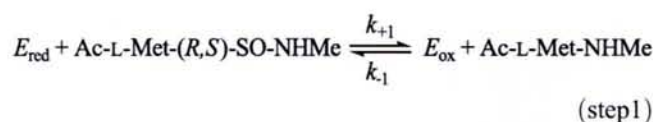
Fig. 2. Sequence alignment of representative sequences of MsrA (A) and MsrB (B) subclasses. (A) The sequences of *E. coli*, *B. taurus*, *N. meningitidis* (*N. mening.*), *B. subtilis* and *R. capsulatus* (*R. capsu.*) MsrAs were aligned with Bioedit software. The numbering of amino acid residues indicated is based on the numbering of the *E. coli* MsrA sequence. The cysteine residues are written in white on black boxes and conserved residues in all putative Msr sequences in black on grey boxes. C51 is the catalytic cysteine whereas C54 or C198 or C206 are the recycling ones [8,9]. α -Helices and β -strands of the *E. coli* MsrA [3] are indicated by grey lines and black arrows, respectively. (B) The sequences of *E. coli*, *N. meningitidis* (*N. mening.*), *N. gonorrhoeae* (*N. gono.*), *X. campestris* (*X. camp.*) and *R. capsulatus* (*R. capsu.*) MsrBs were aligned with Bioedit software. The numbering of amino acid residues indicated is based on the numbering of the *E. coli* MsrB sequence. The cysteine residues are written in white on black boxes and conserved residues in all putative Msr sequences in black on grey boxes. C117 is the catalytic cysteine whereas C63 or C31 is the recycling one [9,13]. C45, C48, C94 and C97 are the cysteines involved in the binding of Zn^{2+} ([25] and unpublished results). α -Helices and β -strands of the *N. gonorrhoeae* MsrB [6] are indicated by grey lines and black arrows, respectively.

The second one contains two recycling Cys residues at positions 198 and 206, and is well represented by *E. coli* and bovine MsrAs. In this case, the Trx-recycling process requires the formation not of one but of two successive disulfide bonds. The first one is formed between the catalytic C51 and the C198. The second one, formed between C198 and C206, is the one preferably reduced by Trx. The third subclass represented by the *Bacillus subtilis* enzyme has a C₅₁FWC₅₄ Trx-like signature. The mechanism of C51 regeneration consists of the attack of the sulfenic acid intermediate on C51 by C54 followed by the reduction of the C51/C54 disulfide bond by Trx. Finally, the alignment of putative MsrAs (not yet characterized) suggests the existence of a new subclass of MsrA represented by the *Rhodobacter capsulatus* enzyme, which only bears a C51. If the latter MsrA is operative in vivo, an alternative Trx-independent mechanism of C51 regeneration must exist.

For MsrBs, at least two subclasses can be defined (Fig. 2B). The first one is represented by the *N. meningitidis* MsrB in which the regeneration of the catalytic C117 is done via formation of the disulfide bond 117/63. The second subclass represents 37% of putative MsrBs and is characterized by the absence of the recycling Cys at position 63. This raises the question of the regeneration of the catalytic C117 for these MsrBs. One possibility is the involvement of another Cys, which can substitute for C63 in the Trx-recycling process. This is the case for the *Xanthomonas campestris* enzyme in which C31 was recently shown to play a role similar to that of C63 [13]. Such a result supports a great flexibility of the MsrB structures, at least of the two loops on which C63 and C31 are located. In the case where no cysteine can substitute for C63, the catalytic C117 should be regenerated by yet another uncharacterized recycling process in which Trx is not involved.

3. Kinetic mechanism

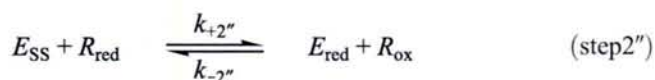
MsrS display a ping-pong kinetic mechanism in the presence of Trx or DTT as a reductant ([14], unpublished data). Kinetic saturations are only observed with Trx with low K_M values (Table 1). The kinetic ping-pong model can be described by the following scheme, where E_{ox} is the sulfenic acid intermediate and R the reductant (Trx or DTT):



This scheme is in accordance with the chemical mechanism in which formations of Ac-L-Met-NHMe and of the sulfenic acid intermediate are concomitant. In this

scheme, the reciprocal rate constant k_{cat}/K_S for the net forward reaction of the reduced enzyme with Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe is defined as k_{+1}/k_{-1} and may be regarded as k_{+1} since the partial reaction shown in step 1 can be considered as irreversible. The catalytic efficiency for sulfoxide reduction is at least 100-fold less efficient compared to other enzymatic systems involving sulfenic acid intermediates like peroxidases [15–17].

The saturation kinetics observed with Trx, in contrast to that observed with DTT, could only result from a shift of the rate constants in the recycling part of the catalytic cycle, implying that the rate-limiting step of the overall reaction should be associated with step 2. In fact, step 2 can be decomposed into two chemical steps with (1) formation of the intramonomeric disulfide bond (E_{ss} , step 2')¹ and, (2) reduction of the Msr disulfide bond (step 2'').



Therefore, the rate-limiting step in the overall process can be associated with either step 2' or step 2''. Since the rate of formation of the intramonomeric disulfide bond from the sulfenic acid intermediate in Msrs is very fast [20,21], k_{+2} corresponds to $k_{+2''}$, and the rate-limiting step is associated with step 2''.

The fact that saturation kinetics are only observed with Trx favours a rate-limiting step that takes place after formation of the Michaelis complex between Msr_{ox} and Trx_{red} , either concomitantly or before the two-electron chemical process, or associated with the release of Trx_{ox} .

The catalytic efficiency for Trx compared to DTT is high ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ versus $\sim 10^1\text{--}10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and is similar to the catalytic efficiency of other systems using Trx [17–19]. Moreover, MsrA from *E. coli* and MsrB from *N. meningitidis* display a low K_M value for Trx in the 10 μM range (Table 1). This supports the existence of specific interactions between Trx_{red} and $MsrA_{ox}/MsrB_{ox}$, which are probably a prerequisite for an efficient two-electron transfer between $MsrS_{ox}$ and Trx_{red} .

4. Kinetic characterization of the three steps of the mechanism: identification of the rate-limiting step

Recent studies on the catalytic mechanism of the MsrA and MsrB from *N. meningitidis* have shown that the rate of the sulfenic acid intermediate formation is fast and is rate-

¹ In the case of *E. coli* MsrA, two successive disulfide bonds between C51–C198, and C198–C206, are formed. Trx reduces the C198–C206 disulfide bond.

Table 1

Kinetic parameters for the Msr activity of wild-type *E. coli* MsrA and *N. meningitidis* MsrB

| Enzyme (reductant) | k_{cat} (s ⁻¹) | $K_{sulfoxide}$ (mM) | $k_{cat}/K_{sulfoxide}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) | $K_{reductant}$ (μM) | $k_{cat}/K_{reductant}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) |
|-------------------------|------------------------------|----------------------|--|----------------------|--|
| MsrA ^a (Trx) | 3.7±0.5 | 1.9±0.2 | 2020±500 | 10±2 | (4.0±0.1).10 ⁵ |
| MsrA ^a (DTT) | infinite | not determinable | 280±20 | infinite | 83±7 |
| MsrB ^b (Trx) | 1.1±0.2 | 1.2±0.2 | 917±50 | 58±12 | (1.9±0.3).10 ⁴ |
| MsrB ^b (DTT) | infinite | not determinable | not determined | infinite | 2.1±0.2 |

Reactions were carried out in Tris–HCl 50 mM, EDTA 2 mM buffer, pH 8 at 25 °C. Sulfoxide substrate used was D,L-Met-(R,S)-SO for MsrA and Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe for MsrB. Data presented were obtained by fitting the experimental data to a ping-pong mechanism.

^a Boschi-Muller et al. [14].

^b Olry et al. (unpublished results).

determining in the process leading to formation of the Msr disulfide bond, and that the overall rate-limiting step is associated with the Trx-recycling process. Moreover, the data suggest that the rate-limiting step takes place after the two-electron chemical exchange and is thus associated with the release of Trx_{ox} [20,21]. Similar results were obtained with *E. coli* and *B. subtilis* MsrAs (data not shown).

Such data derive from the measurement of the rates of the three steps, using adapted experimental kinetic approaches that allowed us to selectively investigate each step. The rate of formation of the sulfenic acid intermediate was determined by following the rate of the Met formation under single turnover conditions, i.e. in the absence of Trx. For the formation of the intramonomeric disulfide bond, a specific thiol reagent was used, also under single turnover conditions, to follow the rate of oxidation of the catalytic and the recycling Cys, whose oxidations occur concomitantly. Another method can also be used under single turnover conditions, which takes advantage of the observation that the fluorescence emission intensity of Msr differs between the reduced and the sulfenic acid form for MsrB, and between the reduced and the oxidized disulfide form for MsrA. For the third step, only the rate of formation of Trx_{ox} under single turnover conditions was determined, using the quenching of the Trx fluorescence intensity upon oxidation as a probe.

Using these approaches, a K_S value for Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe of 55 and 101 mM and a $k_{obs\ max}$ value of 790 and 85 s⁻¹ were determined at pH 8 for the reductase step of

N. meningitidis MsrA and MsrB, respectively (Table 2). These $k_{obs\ max}$ values are 230- and 77-fold higher than those determined under steady-state conditions for MsrA and MsrB, respectively. Therefore, it can be concluded that the rate of the reductase step, which can be considered as irreversible, is largely higher than the k_{cat} value. This demonstrates that the rate-limiting step in Msrs takes place after formation of the sulfenic acid intermediate and is associated with either the disulfide bond formation or the Trx-recycling process.

For the disulfide bond formation, which can also be considered as irreversible, the k_{obs} values determined for MsrA and MsrB were in the range of those determined for the reductase step (Table 2). This suggested that as soon as the catalytic Cys is oxidized in the sulfenic acid form, it reacts with the recycling Cys and forms a disulfide bond. In other words, the rate of the nucleophilic attack of the recycling Cys on the sulfenic intermediate is limited by the rate of formation of the sulfenic acid intermediate, which as a consequence cannot accumulate. Therefore, the rate-limiting step in Msrs takes place after the disulfide bond formation and the rate-determining step in the formation of the disulfide bond is governed by the one leading to formation of the sulfenic acid intermediate.

The rate of formation of the Trx_{ox} in the Trx-recycling process was determined by following the decrease of the Trx fluorescence intensity between the oxidized and reduced forms, during the reduction of the Msr disulfide bond. When the excitation wavelength was set at 310 nm, the fluorescence signal of Msrs upon going from Msr_{ox} to Msr_{red}

Table 2

Kinetic parameters of the three steps and of the overall reaction for the Msr activity of *N. meningitidis* MsrA and MsrB

| Enzyme | Step I | | Step II | Step III | Steady-state | | | |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | $k_{obs\ max}$ (s ⁻¹) | $K_{Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe}$ (mM) | k_{obs} (s ⁻¹) | K_{Trx} (μM) | k_f (s ⁻¹) | k_{cat} (s ⁻¹) | $K_{M(Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe)}$ (mM) | K_M (Trx) (μM) |
| MsrA | 790±10 ^a | 55±2 ^a | ≥500 ^a | 910±10 ^b | 50±1 ^b | 3.4±0.2 ^c | 0.6±0.2 ^c | 75±15 ^d |
| MsrB | 85±1 ^d | 101±4 ^d | ≥85 ^d | 440±2 ^d | 5.2±0.2 ^d | 1.1±0.2 ^e | 1.2±0.2 ^e | 58±12 ^e |

The values of $K_{M(Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe)}$ and $K_{Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe}$ have to be divided by 2 because only one of the two isomers is a substrate.

^a Antoine et al. (unpublished results).

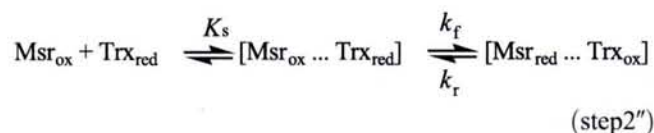
^b Antoine et al. [20].

^c Olry et al. [9].

^d Olry et al. [21].

^e Olry et al. (unpublished results).

does not interfere with the Trx message. Therefore, the signal which is followed is specific for the Trx.



Assuming the binding of Trx_{red} to Msr_{ox} is rapid equilibrium, K_S values of 910 and 440 μM for Trx, k_f values of 50 and 5.2 s^{-1} and k_r values of $\sim 0 \text{ s}^{-1}$ were determined for MsrA and MsrB, respectively (Table 2). The k_r values of $\sim 0 \text{ s}^{-1}$ indicate that the recycling process can be considered as irreversible and therefore the k_{obs} value is presumably measuring the rate of the two-electron chemical exchange. The values of K_S and k_f are 12- and 15-fold, and 7- and 5-fold higher than the K_M and k_{cat} values determined under steady-state conditions for MsrA and MsrB, respectively. Thus, the rate-limiting step within the Trx-recycling process probably takes place after the two-electron chemical exchange and is associated with the release of Trx_{ox} . The fact that the Trx-recycling step behaves as an irreversible process can be related to the value of the equilibrium constant of the reaction which is at least 100-fold in favour of formation of Msr_{red} and Trx_{ox} and to the apparent impossibility to attain the kinetics in the reverse direction (data not shown). Altogether, these data suggest a weak binding between Trx_{ox} and Msr_{red} . Further studies including determination of Msr/Trx binding kinetics should be investigated to validate these hypotheses.

5. Substrate specificity

MsrAs and MsrBs display opposite stereo-selectivities towards the *S* and *R* enantiomers of the sulfoxide center, respectively. Only 50% of the mixture of D,L-Met-(*R,S*)-SO was reduced by either *N. meningitidis* MsrA or MsrB. Moreover, only L-Met-(*S*)-SO and D-Met-(*S*)-SO were quantitatively reduced by *N. meningitidis* MsrA whereas D-Met-(*R*)-SO and L-Met-(*R*)-SO were only reduced by *N. meningitidis* MsrB [9]. These results support the data reported by Grimaud et al. [22] on oxidized calmodulin suggesting that *E. coli* MsrB is stereo-specific for the *R* isomer of the sulfoxide of MetSO whereas, as previously shown, MsrA is stereo-specific for the *S* isomer [23,24].

Recent studies on the substrate specificity of MsrA and MsrB from *N. meningitidis* [9,20,21], including determination of the catalytic constants under steady- and pre-steady-state conditions, support that (1) the presence of the sulfoxide function is a prerequisite for binding to Msrs (Met does not behave as an inhibitor at the concentrations used), (2) the hydrophobic pocket responsible for the recognition of the substrate methyl group is specific (the apparent affinity observed with an analogue substrate substituted by an ethyl group is drastically decreased), (3) the presence of

at least two carbon atoms between the C_α and the sulfur atom of the sulfoxide function is required, (4) the configuration at the C_α carbon atom is not a determining factor for an efficient binding to both Msrs, and (5) the active sites of both Msrs are rather adapted for binding protein-bound MetSO more tightly than free MetSO.

6. Role of metal in MsrBs

Inspection of the primary structures of MsrBs revealed that about 50% of the MsrBs possesses a metal binding site formed by two CXXC motifs. These motifs generate a Zn^{2+} -binding site, located in an opposite direction from the active site, which is absent in the *Neisseria* MsrB but present in the *E. coli* and *Drosophila* MsrBs (Fig. 2B). Studies on the *Drosophila* MsrB showed that substituting the four Cys residues of the metal-binding site results in complete losses of metal and catalytic activity [25]. Similar results were recently observed with the *E. coli* MsrB. Moreover, substituting the four Cys residues was shown to induce drastic modifications of the conformation of the *E. coli* enzyme. On the other hand, introduction of both CXXC motifs in the *N. meningitidis* MsrB results in the tight binding of one atom of zinc, with no significant change of the conformation of the enzyme. The engineered *N. meningitidis* metal-containing MsrB shows a reductase activity similar to that observed for the wild-type but loses any Trx-recycling activity. It also displays an increased thermal stability as shown by differential scanning calorimetry (data not shown).

These results show that introducing or removing Zn^{2+} in MsrBs generates subtle structural messages to the active site which in turn modulates the catalytic efficiency. Clearly, the presence of the metal strongly increases the thermal stability of the engineered metal containing MsrB.

7. Questions to be addressed?

The enzymology of the Msrs revealed a new chemical mechanism of sulfoxide reduction by thiol through the sulfenic acid chemistry. It also showed the formation of an efficient complex between Msr_{ox} and Trx_{red} . However, the mechanism of sulfenic acid formation remains to be elucidated. In particular, what is the nature/the geometry of the transition state which leads to formation of the sulfenic acid intermediate? Which type of catalysts enhances the rate of the reductase step? Also nothing is known on the nature of the structural factors involved in the recognition between Msrs and Trx.

Msrs represent an interesting example of convergent evolution in which two structurally unrelated proteins have evolved to catalyze the same reaction with the same chemical and kinetic mechanisms but with opposite stereo-selectivities. Nevertheless, the fact that the conserved

amino acids of the MsrA and MsrB active sites are different strongly suggests that the amino acids involved in catalysis and/or structural specificity are specific for each class of Msr.

For both classes of Msrs, formation of the sulfenic acid intermediate is rate-determining within the two-step processes leading to the formation of the intramonomeric disulfide bond. Moreover, the rate of the chemical process that leads to the sulfenic acid intermediate is fast. This supports an activation of the catalytic Cys and an increase of the electrophilic character of the sulfur atom of the sulfoxide substrate via an acid catalyst from the active site. Both activations should favour the efficiency of the reductase process. Based on the available 3D structures of MsrA and MsrB, it is clear that the amino acids involved in catalysis are located in different 3D environments. For MsrA, the catalytic Cys is situated at the N-terminus of the α_1 helix, whereas it is in the middle of the strand β_8 for MsrB [3,6]. Three invariant residues (Y82, E94 and Y134) in MsrA are positioned close to the oxygen atom of a water molecule near the arsenate atom of the dimethyl arsenate adduct [3]. The oxygen atom likely mimics the oxygen atom of MetSO. These three residues could participate in the increased electrophilic character of the sulfur atom of MetSO, the E94 being a candidate to act as a general acid–base catalyst. In contrast, for MsrB, H100 and H103 are involved in a hydrogen-bonding network and provide contacts to one of the oxygen atoms of the cacodylate molecule, which could mimic the interactions of the oxygen atom of MetSO within the active site [6]. H103 is the candidate to act as a general acid–base catalyst. The fact that the rate of the reductase step at pH 8, is 20-fold slower in MsrB than in MsrA remains to be explained, but likely reflects differences in the nature of the amino acids of the two active sites involved either in catalysis or in substrate recognition.

The mechanism leading to sulfenic acid formation has been proposed to proceed through formation of a sulfurane transition state of unknown geometry, the rearrangement of which leading to formation of the sulfenic acid intermediate [8]. Theoretical chemical studies should be undertaken to validate this mechanism.

The rate of formation of the disulfide bond is also fast, indicating an efficient nucleophilic attack of the recycling Cys on the sulfenic acid intermediate. The fact that a sulfenic acid is chemically unstable and that an acidic amino acid likely intervenes to favour the release of the water molecule from the catalytic Cys oxidized in the sulfenic acid state can explain the rate of formation of the intramonomeric disulfide bond. This implies, however, that the recycling Cys is well positioned for attacking the sulfenic acid intermediate. In *E. coli* and *B. taurus* MsrA, the recycling Cys residues are located in the C-terminal end, which is composed of 29 amino acids and contains no α helices and β strands [3]. This extended chain is highly flexible and the distances in the crystal structure between the catalytic C51, the recycling C198 and C206, are by far too large for

disulfide bond formation, and therefore some structural rearrangements relative to the structure observed in the crystal are needed to accommodate disulfide bond formation. In contrast, the recycling C63 in *Neisseria* MsrB is located near the catalytic C117 in a loop connecting the β_3 and β_4 strands and the observed distance of 3.0 Å observed in the crystal [6] between the sulfur atoms of C117 and C63 is compatible with the catalytic mechanism.

MsrB recognizes only the *R* isomer of the sulfoxide function, whereas MsrA recognizes the *S* isomer. These differences in stereo-specificities are of particular importance in vivo as they allow the complete reduction of Met-(*R,S*)-SO back to methionine, and are in accordance with the structural symmetry observed between the active site of MsrB and that of MsrA [6]. A specific hydrophobic pocket, which could act as a binding site specific for the recognition of the methyl group of the sulfoxide substrate, is present in each active site, comprising the invariant F52 and W53 in MsrAs and the invariant W65 in MsrBs.

Moreover, the fact that the K_S value for protein-bound MetSO in the reductase step is lower than that for free MetSO strongly suggests the existence of other, not yet characterized, structural elements in Msrs responsible for the recognition of the main chain of the MetSO substrate. In this regard, the knowledge of the 3D structure of Msrs–sulfoxide substrate complexes combined with site-directed mutagenesis will be useful for characterizing the amino acids involved in substrate specificity.

No three-dimensional structures of oxidized Msrs under disulfide state are presently available. Reduced and oxidized forms of MsrA and MsrB display different gel filtration profiles on analytical gel filtration column (Superdex75, Amersham Biosciences) (data not shown). This supports significant conformational changes of Msrs upon oxidation. This can be a prerequisite for formation of an efficient Msr_{ox}/Trx_{red} complex. This can also be related to the apparent irreversibility of the Trx-recycling process. Inspection of the available 3D structures of Msrs has not permitted the identification of any common structural/molecular factors which could be involved in these interactions. In this context, the determinations of the 3D structure of stable Msr/Trx complexes which have been recently undertaken by NMR (Cung M.T., unpublished results) will be informative.

Acknowledgments

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (“Programme Physique et Chimie du Vivant 2000”, “Programme Protéomique et Génie des Protéines 2001”), the University Henri Poincaré Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 5436), the PRST Bioingénierie and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie. We are very grateful to Dr. M. Marraud, Dr.

F. Barras and to Dr. A. Van Dorsseleer for efficient collaborations.

References

[1] M. Russel, P. Model, The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 14997–15005.

[2] T.Y. Lin, G33D mutant thioredoxin primarily affects the kinetics of reaction with thioredoxin reductase. Probing the structure of the mutant protein, *Biochemistry* 38 (1999) 15508–15513.

[3] F. Tête-Favier, D. Cobessi, S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, A. Aubry, Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase at 1.9 Å resolution, *Struct. Fold. Des.* 8 (2000) 1167–1178.

[4] W.T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, B.W. Matthews, Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an “anti-oxidation” enzyme, *Biochemistry* 39 (2000) 13307–13312.

[5] A.B. Taylor, D.M. Benglis, S. Dhandayuthapani, P.J. Hart, Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 4119–4126.

[6] W.T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, B.W. Matthews, The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 348–352.

[7] B. Kauffmann, F. Tête-Favier, A. Olry, S. Boschi-Muller, P. Carpentier, G. Branlant, A. Aubry, Crystallisation and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1467–1469.

[8] S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsseleer, G. Branlant, A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35908–35913.

[9] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsseleer, G. Branlant, Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12016–12022.

[10] L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne, Protein sulfenic acids in redox signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 325–347.

[11] W. Jeong, M.K. Cha, I.H. Kim, Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2924–2930.

[12] J.R. Pedrajas, A. Miranda-Vizuete, N. Javanmardy, J.A. Gustafsson, G. Spiyrou, Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one

conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16296–16301.

[13] F. Neiers, A. Kriznik, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin-recognition signature, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42462–42468.

[14] S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, *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 (2001) 2272–2279.

[15] D. Parsonage, H. Miller, R.P. Ross, A. Claiborne, Purification and analysis of streptococcal NADH peroxidase expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 15 (1993) 3161–3167.

[16] E.J. Crane, J.I. Yeh, J. Luba, A. Claiborne, Analysis of the kinetic and redox properties of the NADH peroxidase R303M mutant: correlation with the crystal structure, *Biochemistry* 39 (2000) 10353–10364.

[17] A.A. Sayed, D.L. Williams, Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26159–26166.

[18] B.W. Lennon, C.H. Williams, Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 36 (1997) 9464–9477.

[19] L. Zhong, A. Holmgren, Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18121–18128.

[20] M. Antoine, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45352–45357.

[21] A. Olry, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*, *Biochemistry* 43 (2004) 11616–11622.

[22] R. Grimaud, B. Ezraty, J.K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P.J. Derrick, F. Barras, Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48915–48920.

[23] V.S. Sharov, D.A. Ferrington, T.C. Squier, C. Schoneich, Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase, *FEBS Lett.* 455 (1999) 247–250.

[24] J. Moskovitz, J.M. Poston, B.S. Berlett, N.J. Nosworthy, R. Szczepanowski, E.R. Stadtman, Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14167–14172.

[25] R.A. Kumar, A. Koc, R.L. Cerny, V.N. Gladyshev, Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37527–37535.

Partie II : Mécanisme de l'étape de réduction du substrat par la MsrA de *N. meningitidis* et mise en évidence des acides aminés impliqués dans la catalyse.

La caractérisation cinétique du mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis* présentée dans la partie précédente a révélé que l'étape de réduction de la fonction sulfoxyde du substrat est très rapide. D'après le mécanisme proposé précédemment, cette étape doit faire intervenir la formation du complexe enzyme/substrat, la déprotonation de la Cys51, l'action d'un catalyseur acide afin de protoner la fonction sulfoxyde et ainsi favoriser la formation de l'intermédiaire et/ou état de transition de type sulfurane et le réarrangement de ce sulfurane pour permettre la formation de Met et de l'intermédiaire acide sulfénique. Nous avons donc entrepris la caractérisation des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la catalyse enzymatique de l'étape réductase.

Comme décrit précédemment au cours de l'introduction (paragraphe III.4.3.1, page 74), l'examen des structures tridimensionnelles des MsrA de *E. coli*, *B. taurus* et *M. tuberculosis* nous a permis de proposer des hypothèses concernant la nature des acides aminés potentiellement impliqués dans la reconnaissance du substrat et/ou la catalyse de la réduction de la fonction sulfoxyde. Ainsi, les résidus invariants Tyr82, Glu94 et Tyr134 interagissent fortement *via* des liaisons H avec une molécule d'eau, conservée dans chacune de ces structures. L'oxygène de cette molécule d'eau est bien placé pour mimer l'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat. Ces trois chaînes latérales pourraient jouer un rôle important dans la fixation de la fonction sulfoxyde et/ou la stabilisation de l'état de transition formé lors de la réduction de cette fonction, notamment le résidu Glu94, seule fonction acide à proximité immédiate du sulfoxyde.

Afin de valider ces propositions, nous avons entrepris l'étude des relations structure-fonction au sein du site actif de la MsrA de *N. meningitidis* en appliquant une approche d'ingénierie protéique par mutagenèse dirigée afin d'introduire différentes substitutions aux positions 82, 94 et 134, couplée à la caractérisation cinétique des variants générés. Cette étude a été complétée par la détermination et l'attribution des pKa des résidus impliqués dans la catalyse de l'étape MetSO réductase.

II.1 Activation de la Cys51 dans le complexe MsrA/substrat

II.1.1 Détermination du pKa des Cys51 et 198 dans l'enzyme libre

Les pKa des Cys51 et Cys198 dans la MsrA de type sauvage et les variants C51S et C198S ont été mesurés par deux approches indépendantes, à savoir la réactivité d'une sonde chimique spécifique des Cys, le 2,2'-dithiodipyridine (2PDS) et la titration directe des thiolates par spectrophotométrie d'absorption UV, en fonction du pH. Les résultats obtenus avec la MsrA de type sauvage et le variant C198S montrent que dans le site actif en absence de tout ligand, la Cys51 catalytique présente un pKa élevé, de l'ordre de 9,5, et une réactivité compatible avec une bonne accessibilité au solvant. La Cys198 de recyclage, éloignée du site actif dans l'enzyme réduite, présente des caractéristiques semblables, mesurées à l'aide du variant C51S.

II.1.2 Détermination des pKapp gouvernant l'étape MetSO réductase

Afin de mettre en évidence le(s) groupement(s) ionisable(s) influençant l'étape de réduction de la MetSO catalysée par la MsrA de type sauvage, les paramètres cinétiques $k_{\text{sulfoxyde}}$ et $K_{\text{sulfoxyde}}$ gouvernant cette étape ont été déterminés en présence du substrat AcMetSONHMe et en fonction du pH par spectrofluorimétrie résolue en temps. Le profil des constantes $k_{\text{sulfoxyde}}$ en fonction du pH présente une allure sigmoïdale croissante gouvernée par la déprotonation d'une fonction de pKa apparent de 5,7 impliquée dans la catalyse de l'étape réductase. Cette ionisation apparente d'un résidu de pKa 5,7 gouvernant la constante $k_{\text{sulfoxyde}}$ et dont la forme déprotonée est catalytiquement active peut être assignée à la fonction thiol de la Cys51 dans le complexe MsrA/MetSO, dont la déprotonation est indispensable pour permettre une attaque nucléophile efficace sur le soufre de la fonction sulfoxyde du substrat.

Cette interprétation suggère également que la formation de l'état de transition gouvernant la cinétique de la réduction du substrat est sensible à l'ionisation du thiol de la Cys51, et que l'étape limitante au sein de ce processus se situe au niveau de ou après cette ionisation. Dans ce cadre, il est intéressant de rappeler que la réaction modèle de réduction d'un sulfoxyde par des thiols en solution est limité cinétiquement par l'ionisation du thiol (Voir Introduction, page 4).

II.2 Rôle des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans la catalyse

Afin de mettre en évidence une possible implication des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans la catalyse de l'étape de réduction de la MetSO, les variants E94D, E94Q, E94A, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F et Y82F/Y134F/E94Q de la MsrA ont été générés. Les propriétés cinétiques de ces variants ont été déterminées à l'état stationnaire et à l'état pré-stationnaire. Aucune des substitutions générées en positions 82, 94 et 134 n'a conduit à une modification significative de l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat AcMetSONHMe, exprimée par la constante $K_{\text{sulfoxyde}}$ et mesurée à l'état pré-stationnaire à pH 8,0. Ces résultats suggèrent que les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr 134 ne sont pas impliqués dans la reconnaissance et la fixation du substrat.

Par ailleurs, la suppression ou le raccourcissement de la chaîne latérale portant la fonction carboxylate en position 94 a entraîné une diminution de la vitesse de l'étape réductase respectivement d'un facteur 3.10^4 et 3.10^3 pour les variants E94A et E94D. Cette très forte diminution de la vitesse de la première étape a également conduit à un changement de la nature de l'étape cinétiquement limitante du mécanisme, associée à l'étape de réduction de la fonction sulfoxyde chez ces variants. De manière inattendue, la substitution de la fonction carboxylate en position 94 par une fonction amide n'a entraîné qu'une diminution d'un facteur 65 de la vitesse de l'étape réductase. D'autre part, le remplacement du résidu Tyr82 ou Tyr134 par une Phe n'a entraîné qu'une faible diminution de la constante $k_{\text{sulfoxyde}}$, respectivement d'un facteur 16 et 3 pour les variants Y82F et Y134F. Cependant, la substitution simultanée de ces deux Tyr a conduit à une diminution de 5.10^4 fois de la constante $k_{\text{sulfoxyde}}$. Ces résultats montrent que les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 sont impliqués de façon essentielle au niveau de la catalyse de l'étape réductase, cette interprétation étant confortée par la diminution de la constante $k_{\text{sulfoxyde}}$ d'un facteur 8.10^5 observée avec le variant triplement substitué Y82F/Y134F/E94Q. Ainsi, le résidu Glu94 semble jouer un rôle prépondérant dans la stabilisation de l'état de transition de l'étape réductase. La stabilisation de cet état de transition semble être complétée par les résidus Tyr82 et Tyr134, dans une moindre mesure cependant, la substitution des deux Tyr étant nécessaire pour observer une diminution de la constante de vitesse de la première étape.

Les études cinétiques en fonction du pH ont permis de montrer que pour chacun des sept variants générés, la vitesse de l'étape réductase dépend de la déprotonation d'un seul groupement ionisable, de manière similaire aux observations faites sur la MsrA de type sauvage. La valeur du pK_a apparent gouvernant cette ionisation est comprise entre 7,5 et 9,5

Résultats : Etude du mécanisme de l'étape réductase

suivant les substitutions générées et sont attribuées au pKa de la Cys51 dans le contexte du complexe MsrA/MetSO propre à chaque variant. Ce décalage important du pKa apparent du thiol de la Cys51 dans le complexe suggère fortement que les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 jouent un rôle essentiel dans l'abaissement du pKa de la Cys51 lors de la formation du complexe MsrA/MetSO.

II.3 Publication 3

Mathias ANTOINE, Adeline GAND, Sandrine BOSCHI-MULLER et Guy BRANLANT. Characterization of the amino-acids from *N. meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step. A soumettre.

Pages 111 à 126.

CHARACTERIZATION OF THE AMINO-ACIDS FROM *Neisseria meningitidis* MsrA INVOLVED IN THE CHEMICAL CATALYSIS OF THE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTION STEP

Mathias ANTOINE¹, Adeline GAND¹, Sandrine BOSCHI-MULLER¹ and Guy BRANLANT^{1,*}

¹: Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR CNRS-UHP 7567, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

*: corresponding author

(phone: (33) 3 83 68 43 04; fax: (33) 3 83 68 43 07; e-mail: Guy.Branlant@maem.uhp-nancy.fr)

Running title: Catalytic mechanism of MsrA reductase step

Methionine sulfoxide reductases (Msrs) are ubiquitous enzymes that reduce protein-bound methionine sulfoxide back to Met in the presence of thioredoxin. *In vivo*, the role of the Msrs is described as essential in protecting cells against oxidative damages and, to play a role in infection of cells by pathogenic bacteria. There exist two structurally-unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB, specific for the *S* and the *R* epimer of the sulfoxide function of MetSO, respectively. Both Msrs present a similar catalytic mechanism, which implies, as a first step, a reductase step that leads to the formation of a sulfenic acid on the catalytic cysteine and a concomitant release of a mole of Met. The reductase step has been previously shown to be efficient and not rate-limiting. In the present study, the amino acids involved in the catalysis of the reductase step of the *Neisseria meningitidis* MsrA have been characterized. The invariant E94 and to a lesser extent Y82 and Y134 are shown to play a major role in the stabilization of the sulfurane transition state and indirectly in the decrease of the pK_{app} of the catalytic C51. A scenario of the reductase step is proposed, in which the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized, *via* interactions with E94, Y82 and Y134 and participates *via* the -partial- positive charge borne by the sulfur of the sulfoxide to the stabilization of the catalytic Cys.

Methionine sulfoxide reductases (Msr)¹ are enzymes that catalyze the reduction of free and protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) back to Met. Two structurally-unrelated classes of Msrs have been described so far. MsrAs are stereospecific towards the *S* isomer on the sulfur of the sulfoxide function whereas MsrBs are specific towards the *R* isomer. Both classes share a similar three-step

catalytic mechanism (Scheme 1). First, the reductase step leads to formation of a sulfenic acid intermediate on the catalytic cysteine concomitantly with the release of one mole of Met per mole of Msr. Then, an intra disulfide bond is formed, *via* the attack of a second Cys (called the recycling Cys) on the sulfenic acid intermediate accompanied by release of a water molecule. Finally, the disulfide bond is reduced by thioredoxin (Trx) in the last step. Recently, the kinetics of the three steps has been investigated for MsrA and MsrB domains of the PilB protein of *Neisseria meningitidis* (1, 2). For both classes of Msrs, the rate-limiting step is associated with the Trx-recycling process, whereas the rate of formation of the intra disulfide bond is governed by that of formation of the sulfenic acid intermediate, the rate of which is fast.

The three-dimensional structures of the reduced form of MsrA from *Escherichia coli*, *Bos taurus* and *Mycobacterium tuberculosis* have been recently solved by X-ray crystallography (3-5). The active site can be represented as an opened basin readily accessible to the MetSO substrate in which the catalytic C51 is located at the entrance of the α 1 helix. In all the structures, the active site is occupied by a molecule which is covalently or non-covalently bound to the catalytic cysteine. In the case of *E. coli* MsrA, a dimethyl arsenate molecule is covalently-bound while it is a dithiothreitol molecule in *B. taurus* enzyme. In the case of *M. tuberculosis* MsrA, a methionine residue from a neighboring monomer occupies the active site. In all three structures, a water molecule is present, the position of which can mimic the oxygen atom of the sulfoxide function of MetSO. This water molecule is tightly H-bonded to three invariant amino-acid residues, i.e. Y82, E94 and Y134. All the three structures also support the involvement of invariant F52 and W53 in the substrate recognition, *via* the formation of an

hydrophobic pocket in which the ϵ methyl group of MetSO can bind.

Study of the reduction mechanism of dimethyl sulfoxide (DMSO) by methanethiol in DMSO solution has recently been investigated by quantum chemistry calculations (6). It was shown that 1) a sulfurane species is formed prior to formation of either a sulfenic acid intermediate or a disulfide species and, 2) the rate-limiting step is governed by proton transfer between the thiol and the sulfoxide functions prior to sulfurane formation. Although these conclusions are derived from studies based on a model in solution, they provide a framework for the study of the chemical reductase step occurring within the MsrA active site.

In the present study, the role of E94, Y82 and Y134 residues and how the catalytic C51 is stabilized in the reductase step of the MsrA from *N. meningitidis* have been investigated. For that, the kinetic parameters and the pH-dependence of the rate constant of the reductase step of mutated MsrAs at positions 82, 94 and 134 were determined and compared to those of the wild type. The pK_{app} of C51 in the free enzyme was also determined. The results show that C51 is activated upon substrate binding to the active site with a shift of its pK_a from 9.5 to 5.7. Substitutions at positions 82, 94 and 134 do not modify the apparent affinity for the substrate in the reductase step. In contrast, drastic decrease of the reductase step rate is observed for the E94A and Y82F/Y134F MsrAs whereas E94Q MsrA displays only a small decrease. Moreover, each mutated MsrA is characterized by a shift of the pK_{app} of its C51 to higher values compared to wild type. Taking in account all the results, a scenario for the catalysis of the sulfoxide reductase step is proposed in which E94, Y82 and Y134 stabilize the sulfurane transition state formed. In this scenario, the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized *via* interactions with the side chains of E94, Y82 and Y134 and plays a major role in stabilizing C51 *via* the positive -or partially positive- charge borne by the sulfur of the sulfoxide function.

Experimental procedures

Site-directed mutagenesis, production and purification of wild-type and mutated N. meningitidis MsrAs

The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* MsrA productions was BE002 (MG1655 *msrA::specΩ*, *msrB::α3kana*), transformed with the plasmidic construction pSKPILBMsrA containing only the coding sequence of *msrA* from *pilB*, under

the *lac* promoter (7). The BE002 strain was kindly provided by Dr F.Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli* and thus avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* MsrA by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications were realized as previously described (1). Wild-type and mutated MsrAs were pure, as checked by electrophoresis on 12.5 % SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses. Storage of the enzymes was done as previously described. The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of 26,200 M⁻¹.cm⁻¹ for wild-type and mutated MsrAs. In this paper, *N. meningitidis* MsrA amino acids numbering is based on *E. coli* MsrA sequence.

Quantification of the free cysteine content with 5,5'-Dithiobis(2-nitro)Benzoate (DTNB)

Cysteine content of MsrA was routinely determined using DTNB under non-denaturing conditions in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) as previously described (8).

pH-Dependence of MsrA thiols reactions rates with 2,2'-Dipyridyl Disulfide (2PDS)

Due to the high reactivity of Cys51 and Cys198 in MsrA, fast kinetic measurements were carried out on an Applied PhotoPhysics SX18MV-R stopped-flow apparatus. MsrA reactions with 2PDS were performed at 25°C under pseudo-first-order conditions in 30 mM acetic acid, 30 mM imidazole, 120 mM Tris/HCl buffer at constant ionic strength of 0.15 M over a pH range of 6 to 10 (polybuffer B). MsrA and 2PDS concentrations after mixing were 6.2 μM and 310 μM, respectively. The pseudo-first-order rate constants *k*_{obs} were determined at each pH by fitting the absorbance (A) at 343 nm versus time (t) to mono-exponential eq 1, where a is the burst amplitude and c is the endpoint. The second-order rate constants *k*₂ were calculated by dividing *k*_{obs} by 2PDS concentration and then fitted to the eq 2, in which *k*_{2max} represents the second rate constant for the thiolate form.

$$A = a(1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) + c \quad (\text{Eq. 1})$$

$$k_2 = \frac{k_{2\text{max}}}{1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Measurement of the thiol ionization by ultraviolet absorbance

Absorbance spectra were measured for all enzymes in 1.0-cm path-length quartz cuvettes in a SAFAS UV-VIS absorbance spectrophotometer. The proteins samples were diluted to 23 μM in the polybuffer B. Spectra were recorded at 25°C in 0.5-nm steps from 300 nm to 200 nm over a pH range 7 to 10. The buffer solution was scanned relative to air, followed by a protein solution in the same cuvette versus air. The two spectra were then subtracted and the difference converted to molar absorption coefficients at 240 nm ($\epsilon_{240 \text{ nm}}$). Data were fitted to a model derived from the Henderson-Hasselbach equation for one apparent pK_a .

$$\epsilon_{240 \text{ nm}} = \epsilon_{\text{SH}} + \frac{\epsilon_{\text{S}^{\cdot}}}{1 + 10^{(pK_a - \text{pH})}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Steady-state MsrA kinetics in the presence of the Trx recycling system

Steady-state kinetic parameters were determined with the Trx reductase recycling system (*E. coli* Trx (100 μM), *E. coli* Trx reductase (4.8 μM), NADPH (1.2 mM)) and by varying the concentrations of AcMetSONHMe. AcMetSONHMe was prepared and purified as previously described (2). Initial rate measurements were carried out at 25°C in buffer A or polybuffer B on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. Initial rate data were fitted to the Michaelis-Menten relationship using least squares analysis to determine k_{cat} and K_M for Trx. *E. coli* Trx1 and Trx reductase were prepared following experimental procedures already published (7).

Preparation of MsrA under oxidized disulfide state

MsrA oxidation was achieved by mixing 100 μM MsrA with 100 mM MetSO in buffer A. The MetSO used was DL-Met-*R,S*-SO of which only the *S* isomer is a substrate for MsrA. After 10 min of incubation at room temperature, oxidized proteins were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A. Oxidation of MsrA in the disulfide state was checked by titration with DTNB.

Fluorescence properties of wild-type and mutated MsrAs

The fluorescence excitation and emission spectra of wild-type and mutated MsrAs in their reduced and C51/C198 disulfide state, were recorded on a flx spectrofluorometer (SAFAS)

thermostated at 25°C, in buffer A with 10 μM of each protein, as previously described (1).

Determination of the rate of Met formation and of thiol loss by single turn-over quenched-flow experiments

Quenched-flow measurements were carried out at 25°C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for double-mixing and adapted to recover the quenched samples, as previously described (1). The apparatus worked in a pulsed mode. Under the conditions used, a minimum ageing time of about 25-40 ms was determined. Equal volumes (57.5 μl) of a solution containing 550 μM of E94 mutated MsrA in buffer A and a solution containing AcMetSONHMe in buffer A were mixed in the ageing loop. The mixture was then allowed to react for the desired time before being mixed with 115 μl of a quenched aqueous solution containing 2% of trifluoroacetic acid (TFA). Quenched samples were then collected in a 200 μl loop. For each ageing time, four shots were done and the four corresponding quenched samples were pooled in a volume of 700 μl and then analyzed.

After protein precipitation and centrifugation, Ac-L-Met-NHMe (AcMetNHMe) quantification in the resulting supernatant was carried out by reverse phase chromatography as previously described (2): 100 μl were injected onto a 4.6 x 250 mm Atlantis dC18 reverse phase column (Waters) on an AKTA explorer system (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrated with H₂O/0.1 % TFA. AcMetNHMe was eluted after AcMetSONHMe, with a linear gradient of acetonitrile.

The other part of the quenched samples which was not treated with 100% of TFA was used to 1) determine the protein concentration from the absorbance at 280 nm and, 2) quantify the free cysteine content, using 2PDS as a thiol probe, in the presence of urea to avoid precipitation of the protein in the cuvette. Progress curves of pyridine-2-thione production were recorded at 343 nm in 1.1 M urea, buffer A. Enzyme concentration was 6.19 μM and 2PDS concentration was 665 μM . The amount of pyridine-2-thione formed was calculated using an extinction coefficient at 343 nm of 8,080 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Data were plotted as mol of AcMetNHMe formed per mol of MsrA and as free remaining thiols per mol of MsrA, both as a function of time. The rate of Met formation was determined by fitting the curve to the mono-exponential equation (4) in which f represents the fraction of Met formed per mol of MsrA and k_{Met} , the rate constant.

$$y = a(1 - e^{-k_{\text{Met}}t}) \quad (\text{Eq. 4})$$

The rate of loss in free thiols was determined by fitting the curve to the mono-exponential equation (5) in which y_0 represents the number of free remaining thiols, a , the number of oxidized thiols and k_{SS} the rate constant.

$$y = y_0 + ae^{-k_{\text{SS}}t} \quad (\text{Eq. 5})$$

Kinetics of the formation of the C51/C198 MsrA disulfide bond in the absence of reductant by single turn-over stopped-flow experiment at pH 8

Kinetics of the W53 fluorescence variation associated with the formation of the C51/C198 disulfide bond were measured for E94Q, Y82F and Y134F MsrAs at 25°C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for fluorescence measurements, as described previously (1). The excitation wavelength was set at 284 nm and the emitted light was collected using a 320 nm cutoff filter. One syringe contained MsrA in buffer A (10 μM final concentration after mixing) and the other one contained AcMetSONHMe at various concentrations in buffer A. An average of at least six runs was recorded for each AcMetSONHMe concentration. Rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting fluorescence traces with the mono-exponential equation (6) in which c represents the endpoint, a , the amplitude of the fluorescence increase (< 0) and k_{obs} the rate constant.

$$y = ae^{-k_{\text{obs}}t} + c \quad (\text{Eq. 6})$$

Data were fitted to equation (7) using least square analysis to determine k_{max} and K_S for AcMetSONHMe. S represents the AcMetSONHMe concentration and K_S the apparent affinity constant.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{max}}S}{K_S + S} \quad (\text{Eq. 7})$$

Kinetics of the W53 fluorescence variation associated with the formation of the C51/C198 disulfide bond were measured for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs at 25°C on a flx spectrofluorometer (SAFAS). The excitation wavelength was set at 284 nm, and the fluorescence emission at 340 nm was recorded versus time after enzyme addition. Data were then treated as described above to obtain k_{obs} , k_{max} and K_S values.

pH-dependence of the reductase step rate constant

Determination of k_{max} and K_S as a function of pH was carried out for wild-type MsrA by single turn-over pre-steady-state fluorescence stopped-flow spectroscopy, using the same procedure as described in the previous section but replacing buffer A with polybuffer B. k_{obs} values for E94Q,

Y82F, Y134F, Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs were determined at saturating concentration of substrate as a function of pH. Kinetics of W53 fluorescence variation were recorded either with the stopped-flow apparatus or the spectrofluorometer depending on the mutated MsrA, as described in the previous section. The pH dependence of the reductase step rate constant for E94A and E94D MsrAs was determined under steady-state conditions using the Trx recycling system.

k_{max} (or k_{obs}) values were plotted against pH and fitted to the eq 8, deriving from a one-pKa model, where $k_{\text{max opt}}$ represent the maximum pH-independent rate constant.

$$k_{\text{max}} = \frac{k_{\text{max opt}}}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} \quad (\text{Eq. 8})$$

Results

Determination of pKapp of the Cys residues

The pKapp of both C51 and C198 were determined in the reduced free enzyme, by two methods. The first one involved determining the second-order rate constant of the reaction with the Cys-specific reactivity probe 2-PDS as a function of pH. The second one took advantage of the variation of the thiolate UV absorbance as a function of pH.

A) Kinetics of reaction of reduced wild-type, C51S and C198S MsrAs with 2PDS

Reaction of 2PDS with wild-type MsrA obeyed pseudo-first order kinetics, with formation of 2 mol of pyridine-2-thione per mol of MsrA, as determined from the absorbance change at 343 nm. This result was expected as 2 Cys are present in *N. meningitidis* MsrA, at positions 51 and 198. For all pH used, stopped-flow traces fitted to mono-exponential equation (Eq. 1), with amplitude corresponding to the release of 2 mol of pyridine-2-thione. pH - k_2 profile fitted to mono-sigmoidal equation (Eq. 2) with a pKapp value of 9.7 and $k_{2\text{max}}$ value of $(2.4 \pm 0.3) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig.1A). The product of 2PDS reaction with wild-type MsrA is the disulfide oxidized enzyme and not the thiopyridine adducts. Indeed, any release of pyridine-2-thione was observed when 10 mM of DTT was added to the purified product (data not shown).

C51S and C198S MsrAs behaved similarly to wild-type MsrA, except that only 1 mol of pyridine-2-thione per mol of MsrA was formed. pKapp value of 9.3 ± 0.1 and a $k_{2\text{max}}$ value of $(3.1 \pm 0.7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for C51, and a pKapp of 9.8 ± 0.1 and a $k_{2\text{max}}$ value

of $(2.6 \pm 0.6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for C198 were determined (Fig.1B).

Altogether, the data support a pK_{app} value of both C51 and C198 in the reduced free wild-type enzyme close to 9.5.

B) Direct thiolate UV absorbance of reduced wild-type, C51S and C198S MsrAs

The thiolate absorbance of wild-type, C51S and C198S MsrAs was monitored between pH 6 and 10. Analysis of the spectra and of the $\epsilon_{240 \text{ nm}}$ as a function of pH yielded mono-sigmoidal plots for all three MsrAs. Data fitted to pK_{app} values of 9.7, 9.8 and 9.7, associated with $\Delta\epsilon_{240 \text{ nm}}$ of $3.1 \cdot 10^4$, $2.3 \cdot 10^4$ and $2.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for wild-type, C51S and C198S MsrAs, respectively (Fig.2). These pK_{app} values of C51 and C198 in the reduced free enzyme are in good agreement with those obtained with 2PDS.

Kinetic characterization with identification of the rate-limiting step of the mutated MsrAs, at pH 8

Steady-state catalytic constants of mutated MsrAs at position 82, 94 and/or 134 were determined at pH 8, which is the optimum pH for the wild type (1). AcMetSONHMe was used instead of MetSO because MsrA displays a better affinity for AcMetSONHMe (9). As shown in Table 1, Y82F, Y134F and E94Q MsrAs exhibited slight modifications of k_{cat} compared to wild-type MsrA, with k_{cat} values from 0.9 to 2.2 s^{-1} , and a K_M increase from 0.8 to 25 mM. In contrast, E94A, E94D, Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs showed strongly decreased k_{cat} values, from $1 \cdot 10^{-3}$ to $2.5 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, and increased K_M , from 24 to 161 mM.

In the wild type, the rate of the reductase step is largely higher than the k_{cat} value (1). Therefore, to interpret the eventual kinetic consequences of the substitutions at positions 82, 94 and 134 at the level of the reductase step, it was first necessary to attain this rate. This was determined for E94Q, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs by following the variation of the W53 fluorescence intensity under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of reductant (1). In that context, it was assumed that the reductase step of the mutated MsrAs is still rate-determining in the process leading to formation of the Msr disulfide bond², as previously shown for the wild type (1). In the case of E94Q, Y82F and Y134F MsrAs, formation of the disulfide bond led to an increase in the W53 fluorescence emission similarly to that described for the wild type whereas a quenching of the fluorescence was observed for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs. Structural factors responsible for this different behaviour remain

unknown. In the presence of a saturating concentration of 300 mM of AcMetSONHMe, the variation of the fluorescence signal in function of time is of mono-exponential type for all mutated MsrAs. The kinetic parameters, k_{max} and K_S values are summarized in Table 1. No strong K_S effect was observed for any of the five mutated MsrAs (K_S values ranging from 26 to 151 mM). The k_{max} value for E94Q MsrA is still high compared to that of the wild type and is 14-fold higher than k_{cat} value that is indicative of a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step. This is also the case for Y82F and Y134F MsrAs for which the k_{max} values are 23 and 160-fold higher than k_{cat} values, respectively. In contrast, drastic effects on k_{max} *i.e.* at least $2 \cdot 10^4$ -fold decrease, were observed for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs. Moreover, k_{max} and k_{cat} values are similar, showing that the reductase step is the rate-limiting step.

The fact that the variation of the W53 fluorescence message is -for unknown reason- not of mono-exponential type for E94A and E94D MsrAs (curve not shown), led us to use another method to attain the kinetics of the reductase step for these two mutated MsrAs. This method, which was already used for the wild type, consists of following the rate of formation of AcMetNHMe and of the C51/C198 disulfide bond under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of Trx. This was done at a saturating concentration of 300 mM of AcMetSONHMe. E94D analysis required the use of a rapid-mixing apparatus, while E94A study was possible by manual mixing. Formation of 0.9 mol of AcMetNHMe/mol of enzyme was observed for both E94D and E94A MsrAs. Rate constant for AcMetNHMe formation (k_{Met}) was 0.27 s^{-1} and $2.9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ for E94D and E94A MsrAs, respectively. The free thiol content profile fitted to a mono-exponential model, with concomitant loss of C51 and C198 thiols, with rate constant (k_{SS}) of 0.31 s^{-1} and $4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ for E94D and E94A MsrAs, respectively. The fact that k_{Met} , k_{SS} and k_{cat} values are similar indicated that the reductase step is rate-limiting for both mutated MsrAs. Therefore, the K_M value determined under steady-state conditions represents the K_S value of the reductase step. As observed for the other mutated MsrAs, the K_S values are similar to that of the wild type (see table 1).

pH dependence of the kinetic parameters of the MetSO reductase step

The kinetic parameters k_{max} and K_S of the reductase step for the wild type were determined at different pH by fluorescence stopped-flow spectroscopy under single turn-over conditions, *i.e.*

in the absence of Trx. The pH- k_{\max} plot, presented in Fig.3, exhibits a mono-sigmoidal profile governed by the contribution of an ionisable group of pK_{app} 5.7 ± 0.1 that must be deprotonated for efficient MetSO reduction. This ionized species is characterized by a $k_{\max \text{ opt}}$ value of 730 s^{-1} .

For E94Q, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MrAs, the rate of the reductase step was also measured by fluorescence spectroscopy under single turn-over conditions, either on a stopped flow apparatus or a conventional spectrofluorometer, depending on the value of the rate. In the case of E94A and E94D MsrAs, the rate of the reductase step was determined under steady-state conditions. For each substituted MsrA, the observed rate constant k_{obs} of the MetSO reductase step was measured, at each pH, with only one concentration of AcMetSONHMe (300 mM). This concentration was shown to be saturating over the pH range investigated except for E94Q MsrA (data not shown). Therefore, k_{obs} value can be considered as a k_{\max} value. In the case of E94Q MsrA, 300 mM of AcMetSONHMe was not saturating at pH > 8 and consequently k_{obs} values were determined only up to pH 8. The k_{obs} profile remains mono-sigmoidal for all substituted MsrAs, with increasing k_{obs} value with increasing pH. Data fitted to a single pK_a model (see Fig.4). E94D MsrA has a pK_{app} of 6.7 with a $k_{\max \text{ opt}}$ value of 0.19 s^{-1} . E94A, E94Q, Y82F, Y134F and Y82F/Y134F MsrAs displayed a more pronounced pK_{app} shift, with values ranging from 7.5 to 8.0 and with $k_{\max \text{ opt}}$ values of 2.10^{-2} , 28, 46, 380 and 7.10^{-2} s^{-1} , respectively (see Fig.4 and table 1). It is noteworthy that substitutions of Y82 or Y134 induced a similar pK_{app} shift to 7.6 and that double substitution of these two Tyr led to a higher shift to 8.0. The triple substituted MsrA Y82F/Y134F/E94Q displayed the most highly shifted pK_{app}, with a value of 9.5 and the lowest $k_{\max \text{ opt}}$ value of $1.1.10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (see Fig.4 and table 1).

Discussion

The methionine sulfoxide reductase step of the MsrA mechanism was previously shown to be very fast (1) and postulated to imply the formation of a sulfurane transition state of bipyramidal geometry on the basis of the theoretical chemistry study (6). According to these data, the reductase step should imply 1) the formation of an enzyme-substrate complex, 2) the deprotonation of C51, 3) the involvement of an acid catalyst to protonate the sulfoxide substrate and favor the sulfurane type transition state formation and; 4) the rearrangement of the sulfurane type transition state to obtain Met

and sulfenic acid. The invariant residues E94, Y82 and Y134 are correctly positioned in the three available X-ray MsrA structures to interact *via* H-bond with a water molecule, which is located at the place of the oxygen of the sulfoxide function (Fig.5). Based on these structural features, a reasonable hypothesis supports E94 as the presumably required acid catalyst. This proposition is reinforced by the observation that no other acidic residue is present in the close proximity of the sulfoxide function. The two phenolic side chains of Y82 and Y134 could be involved in substrate binding (i.e. an affinity contribution) and/or in substrate positioning and transition state stabilization (i.e. a chemical catalysis contribution).

C51 activation within the active site

In the free wild-type enzyme, 2-PDS titration and direct thiolate UV absorbance titration revealed a single pK_{app} around 9.5 for both C51 and 198. Moreover, the 2PDS chemical reactivity of MsrA Cys is comparable to that of the thiolate of glutathione (10), arguing for two Cys residues not activated but accessible in the free wild-type MsrA. The fact that 2PDS mediates oxidation of reduced MsrA to its disulfide state with simultaneous liberation of two moles of pyridine-2-thione per enzyme, *via* an apparent one step kinetic mechanism, can be explained by a mechanism reminiscent to that of the Msr mechanism. First, the rate-limiting, reaction between one Cys and one molecule of 2PDS would lead to a transient mixed disulfide. This disulfide would be rapidly attacked by the second Cys of the enzyme, leading to the disulfide oxidized MsrA. Such a mechanism would imply that the measured pK_{app} only reflects ionization of the first Cys. It is tempting to assign C51 as this "2-PDS reactive" Cys. 2-PDS titration of C51S and C198S MsrAs supports this assignment, as C51 (C198S MsrA) exhibits a stronger reactivity than C198 (C51S MsrA) between pH 8-9 (see Fig. 1B). The measured pK_{app} values around 9.5 for C51 and C198, respectively, are significantly higher than the value of 8.8 for the model Cys of glutathione (10). As MsrA function is supposed to be widely used during oxidative stress burst, high pK_a could serve as a protection against oxidative modification of both Cys, by restricting their reactivity toward ROS or RNS. Stabilization of the thiol state of C51 could be provided by the hydrophobic character of the active site.

As stated above, C51 has to be deprotonated to allow its efficient attack on the sulfoxide function. The observed high rate constant of the reductase step at pH 8.0 implies a large, mandatory, shift in

C51 pKa, from near 9.5 to at least somewhere below 7. The pH dependency of k_{\max} displays a single pKapp of 5.7, the rate of sulfoxide reduction increasing with pH. Moreover, the E94Q and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs still show the contribution of a single pKapp of 8 and 9.5, respectively. Such results support the attribution of the pKapp of 5.7 to C51 and not to E94. Thus, formation of the MsrA/AcMetSONHMe complex provokes an activation of C51 by decreasing its pKapp by 3.8 units.

E94, Y82 and Y134 contributions in the reductase step

Substitution of E94 by Ala or Asp drastically decreased the $k_{\max \text{ opt}}$ rate of the reductase step of the MsrA mechanism, by factor of $3.6 \cdot 10^4$ and $3.8 \cdot 10^3$, respectively with no significant K_S effect at pH 8 and caused the shift of the rate-limiting step from the Trx-recycling process to the sulfoxide reduction step. These data support the implication of E94 in the catalysis of sulfoxide reduction but not in substrate binding, and identify its side chain as a critical catalyst. However, the kinetic parameters of the reductase step obtained with E94Q MsrA revealed a rather minor $k_{\max \text{ opt}}$ decrease of only 26-fold compared to that of the wild type. As Q94 cannot be a proton donor, it is tempting to conclude that E94 does not directly play a role as general acid catalyst, but likely stabilizes, *via* H-bonding, the sulfurane transition state leading to sulfenic acid formation (see last paragraph of the discussion). Indeed, substitution of Glu by Gln retains an H-bonding ability. This is reinforced by the fact that no pKapp of an acidic catalyst is observed on the pH- k_{\max} profile of the wild-type MsrA. In addition to this effect on the rate constant of the sulfoxide reduction, substitution of E94 induced an increase of the pKapp governing this step and assigned to C51. Thus, E94 is, directly or not, also involved in the activation of C51 upon substrate binding.

Substitution of Y82 and Y134, or both, by Phe did not affect K_S values. Moreover, the $k_{\max \text{ opt}}$ constant of the sulfoxide reduction was slightly decreased by the absence of one of the phenolic hydroxyl, in particular of Y134, but drastically decreased when both were removed. The fact that substitutions of both Tyr is required to observe a strong decrease of $k_{\max \text{ opt}}$, suggests that in single Tyr substituted MsrA, the remaining Tyr in the presence of E94 compensates the absence of the second phenolic hydroxyl. Similarly to E94, substitution of Y82 and/or Y134 also leads to an increase of the pKapp governing this step, assigned to C51. Importantly, in contrast to the catalytic role

of Y82 and Y134, which can be fairly well assumed by only one Tyr, C51 activation is more sensitive to the absence of one of the two phenolic side chains.

Taken together, these data strongly suggest that E94, Y82 and Y134, in addition to their role in favoring the polarized form of the sulfoxide function of the substrate-bound, are involved in the stabilization of the sulfurane transition state (see last paragraph of the discussion) which precedes the sulfenic acid formation. They also participate - directly or indirectly- in the C51 activation upon formation of the MsrA/substrate complex. As a confirmation, the triple substituted MsrA Y82F/Y134F/E94Q displays the most highly shifted pKapp, with a value of 9.5, close to the pKapp of C51 determined in the free enzyme, and the biggest reduction of $k_{\max \text{ opt}}$, by a factor of $6.6 \cdot 10^4$ compared to the wild type.

Structure/function relationships within the MsrA active site

The available X-ray structure of MsrA from *M. tuberculosis* in complex with a Met from a neighboring monomer provides a good model of the substrate/MsrA complex (3). Inspection of the structure shows that no residue bearing a positively charged side chain is present in close proximity to C51 (Fig.5). Moreover, on one hand the distance between the carboxylate of E94 and the sulfur atom of C51 (5.1 Å) is by far too large to allow a direct interaction between these two functions. On the other hand, the sulfur atom of the Met residue is positioned between one oxygen atom of the carboxylate and the thiol function of C51. Thus, stabilization of the thiolate form of C51 by the protonated form of E94 is rather unlikely. The direct implication of Y82 and Y134 is also unlikely, as the distance between their hydroxyl groups and the thiol of C51 is too large (at least 6.6 Å, Fig. 5). Therefore, the decrease in pKapp of 3.7 units of C51 in the Michaelis complex is likely due to a substrate-assisted mechanism. In the MsrA/substrate complex, the polarization of the sulfur-oxygen bond should be favored by the presence of the side chains of E94, Y82 and Y134. Such a polarization was already described for the sulfur-oxygen bond of the DMSO by using theoretical chemistry method (11,12). The close proximity of a positive -or a partially positive- charge on the sulfur of the sulfoxide function near the thiol group of C51 (3.4 Å between the sulfur of Met and the thiol of C51 in the *M. tuberculosis* binary complex MsrA-Met, Fig. 5) likely stabilizes the thiolate form of C51 and thus is believed to be the driving force that favors the shift of the C51 pKa from 9.5 to 5.7 upon substrate

binding. In the case of the E94Q MsrA, the same scenario occurs but the polarization of the sulfur-oxygen bond could be lesser developed, leading to a smaller positive partial charge on the sulfur atom and therefore to the shift of the C51 pK_{app} from 5.7 to 8. It is likely that the proton initially borne by C51 is transferred to the oxygen of the sulfoxide function *via* a concerted mechanism, concomitantly with the attack of the thiolate of C51 on the sulfoxide sulfur atom, leading to the formation of the sulfurane type transition state. In this context, a proton shift, which transfers the proton coming from the thiol of C51 to the oxygen of the sulfoxide, must occur. It is seducing to postulate that this proton transfer could be catalyzed *via* E94. However, as already mentioned, in the structure of *M. tuberculosis* MsrA, the distance of 5.1 Å between the thiol of C51 and the nearest oxygen of E94 is too far for a direct interaction, unless a shortening of this distance occurs or a water molecule is transiently present between the carboxylate and the thiol.

Proposed scenario for the sulfoxide reductase step of the MsrA mechanism

MetSO likely binds to the active site of MsrA with its sulfoxide largely in its polarized form. The spatial proximity between the sulfur of the sulfoxide function and the thiol of C51 leads to a stabilization of the thiolate form due to the presence of the positive –or partially positive- charge borne by the sulfur. Concomitantly to the substrate binding, the proton of C51 is transferred to the oxygen of the sulfoxide function and the positively -or partially-charged sulfur of MetSO undergoes a nucleophilic attack of the C51 thiolate leading to the formation of a sulfurane transition state of trigonal bipyramidal geometry which spontaneously rearranges to produce the sulfenic acid intermediate and Met (See

Scheme 2). The mechanism is likely rather concerted than stepwise. In this scenario, E94, Y82 and Y134 have two roles. First, they favor the binding of the polarized form of the sulfoxide function that is the form which is also present in solution. Second, they stabilize the sulfurane transition state. In that context, E94 has the most important contribution and probably intervenes under its carboxylate form while Y82 and Y134 form a hydrogen bond with the two lone pairs of the hydroxyl group.

However, questions remain to be addressed on the mechanism which allows the formation of a sulfenic acid of tetrahedral geometry from a sulfurane transition state of trigonal bipyramidal geometry. Indeed, recent theoretical study of the reduction mechanism of DMSO by thiols support the formation of a sulfurane transition state with the sulfur of the thiol and the OH group in apical position and the two methyl groups and the lone pair in equatorial position (6). Such a geometry is however not compatible with a direct shift of the OH group to the sulfur atom of the thiol. A possibility which has also been considered is the formation of a transition state with the sulfur of the thiol into equatorial position and the OH group into apical position. The S-S-O bond angle is thus near 90° and the shift of the OH group to the thiol group can occur. However, such a geometry necessitates higher activation energy to attain the transition state. Another question concerns the way by which the proton of the sulfur of C51 is transferred to the sulfoxide function. An evident candidate is E94. However, as already pointed out, the distance between C51 and E94 is at least 5 Å.

In this context, the studies which are underway by theoretical approaches and taking in account the structure of the MsrA active site will be of particular interest.

References

1. Antoine, M., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45352-45357.
2. Olry, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *Biochemistry* **43**, 11616-11622.
3. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4119-4126.
4. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure Fold. Des.* **8**, 1167-1178.
5. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307-13312.
6. Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2006) *J. Phys. Chem. A* **110**, 7628-7236.

7. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12016-12022.
8. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908-35913.
9. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231-238.
10. Marchal, S., and Branlant, G. (1999) *Biochemistry* **38**, 12950-12958.
11. Mrazkova, E., and Hobza, P. (2003) *J. Phys. Chem. A* **107**, 1032-1039.
12. Stener, M., and Calligaris, M. (2000) *J. Mol. Struct. (Theochem.)* **497**, 91-104.

Footnotes

*This research was supported by the CNRS, the University of Nancy I, the IFR 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 5436) and the French Ministry of Research (ACI BCMS047). Mathias Antoine and Adeline Gand gratefully thank the French Ministry of Research for financial support. We are very grateful to Pr. W. W. Cleland for helpful discussions and reading of the manuscript. We thank Dr. F. Barras for the kind gift of the BE002 *E. coli* strain, C. Gauthier and A. Kriznik for their very efficient technical help and AcMetSONHMe synthesis, G. Chevreux and Dr. S. Sanglier-Cianferani for mass spectrometry analysis and Dr. S. Sonkaria for reviewing the manuscript.

¹The abbreviations used are: 2PDS, 2,2'-dipyridyl disulfide; AcMetSONHMe, Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe; AcMetNHMe, Ac-L-Met-NHMe; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTNB, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; DTT, dithiothreitol; MetSO, methionine sulfoxide; Msr, methionine sulfoxide reductase; p*K*_{app}, apparent p*K*_a; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; TFA, trifluoroacetic acid; Trx, thioredoxin.

²For each E94 mutated MsrA, the rate constant of the reductase step was shown to be rate-determining in the two-step process leading to the formation of the disulfide bond by following the rate of AcMetNHMe and disulfide bond formation directly, by acid-quenching of the reaction followed by quantification of product and MsrA remaining free thiols (see results section for E94A and E94D MsrAs, data not shown for E94Q). For each Tyr substituted MsrAs, the rate of the reductase step was shown to be too fast at pH 8 to allow direct determination of the rate of AcMetNHMe and disulfide bond formation (data not shown).

Figures legends

Table 1: Steady-state and reductase step kinetic parameters of wild-type and mutated MsrAs, with associated p*K*_{app}. ^a Steady-state parameters were deduced from nonlinear regression of initial rates to the Michaelis-Menten relationship (see Materials and Methods). ^b Kinetic parameters of the reductase step were obtained from nonlinear regression of *k*_{obs} to eq.7 (see Materials and Methods section), except for E94A and E94D MsrAs. For these two later substituted MsrAs, *k*_{max} and *K*_S values correspond to *k*_{cat} and *K*_M values determined under steady-state conditions (see Results section). ^c Kinetic parameters, *k*_{max opt} at optimum pH and p*K*_{app} values, were deduced from nonlinear regression of *k*_{obs} to eq.8 (see also Fig. 4).

Scheme 1: Schematic representation of the catalytic mechanism of MsrA and MsrB from *N. meningitidis*. A Michaelis complex is formed between MsrA and MetSO, which precedes the nucleophilic attack of Cys-X on the sulfur atom of the sulfoxide function of MetSO (step IA). Then, a rearrangement of the tetrahedral transition state occurs which lead to formation of a sulfenic acid intermediate with a concomitant release of one mol of Met per mol of enzyme (step IB). In step II, nucleophilic attack of Cys-Y on the sulfur atom of the sulfenic acid leads to formation of a Cys-X/Cys-Y disulfide bond and a release of a water molecule which is also favored by acid-assisted catalysis. In step III, return of the active site to a fully

reduced state proceeds *via* reduction of the Msr disulfide bond by reduced Trx. RSOCH₃ and RSCH₃ represent MetSO and Met, respectively. For *N. meningitidis* MsrA, Cys-X = C51 and Cys-Y = C198.

Scheme 2: Schematic representation of the catalytic mechanism of the MetSO reductase step of MsrA from *N. meningitidis*. The four essential functional groups of C51, E94, Y82 and Y134 are represented. RSOCH₃ and RSCH₃ represent MetSO and Met, respectively. The substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized. See Discussion for more details on the mechanism.

Figure 1: pH-dependence of the second-order rate constant k_2 for the reaction of the thiol group with 2PDS of wild-type (●, panel A), C51S (□, panel B) and C198S (Δ, panel B) MsrAs. Reaction kinetics were performed at 25 °C over a pH range of 5-9 or 10 in polybuffer B. The concentration of enzymes and 2PDS were 6.2 μM and 310 μM, respectively. Values of k_{obs} were determined using nonlinear regression analysis, and second-order rate constants k_2 were fitted to eq.2 (solid line) (see also Materials and Methods). The plateau of the sigmoidal plot was not attained at the pH tested. Therefore, the pK_{app} values obtained by fitting could only be taken as estimates.

Figure 2: pH-dependence of the Cys thiol group absorbance properties of wild-type (●), C51S (Δ) and C198S (□) MsrAs. Molecular absorption coefficients at 240 nm were calculated from the absorbance spectra from 300 nm to 200 nm performed over a pH range 7 to 10 in polybuffer B. Absorption coefficients were fitted to eq.3 (solid line) (see also Materials and Methods).

Figure 3: pH-dependence of the reductase step rate constant k_{max} and AcMetSONHMe affinity constant K_S (inset) of wild-type MsrA. Kinetics of MsrA fluorescence variation were followed after excitation at 284 nm on a stopped-flow apparatus, by rapidly mixing 10 μM enzyme and various concentrations of AcMetSONHMe (50 to 800 mM) at various pH in polybuffer B. It should be noted that, below pH 5.5, disulfide bond formation is not accompanied by an increase but by a quenching of W53 fluorescence emission for an unknown reason (curve not shown). For each pH, experimental k_{obs} data obtained at each substrate concentration were analyzed by nonlinear regression against eq.7 to obtain k_{max} and K_S values (see also Materials and Methods). k_{max} values (●) were plotted against pH and fitted to eq.8 (solid line) leading to a $k_{max\ opt}$ value of 730 s⁻¹ and pK_{app} value of 5.7.

Figure 4: pH-dependence of the reductase step rate constant k_{max} of wild-type and substituted MsrAs. For wild-type MsrA, refer to Fig.3. For all substituted MsrAs, the rate of the reductase step was determined with 300 mM of AcMetSONHMe at various pH in polybuffer B. The independence of the rate constant on AcMetSONHMe concentration was verified at two extreme pH values (around 5 and 9). For E94Q, Y82F and Y134F MsrAs, the increase of W53 fluorescence intensity was followed after excitation at 284 nm on a stopped-flow apparatus. For Y82F/Y134F and E94Q/Y82F/Y134F MsrAs, variation of fluorescence emission was recorded on a spectrofluorometer, with excitation and emission wavelength set at 284 and 340 nm respectively. For E94A and E94D (○) MsrAs, the reductase step rate constant was followed using the Trx-recycling system. For each pH, experimental k_{obs} data obtained at each pH were analyzed by nonlinear regression against eq 8 to obtain $k_{max\ opt}$ and pK_{app} values (see also Materials and Methods). $k_{max\ opt}$ and pK_{app} values are presented in table 1. Experimental k_{obs} data were normalized, taking $k_{max\ opt}$ value as 100% for each enzyme, for the clarity of the representation. Symbols represent normalized data, and lines represent the fit. Panel A: wild type (●, solid line); E94A MsrA (▲, solid line); E94D MsrA (○, dotted line); E94Q MsrA (◇, dotte line); E94Q/Y82F/Y134F MsrA (■, solid line). Panel B: wild type (●, solid line); Y82F MsrA (□, solid line); Y134F MsrA (Δ, dotted line); Y82F/Y134F MsrA (◆, dotted line); E94Q/Y82F/Y134F MsrA (■, solid line).

Figure 5: Schematic representation of *M. tuberculosis* MsrA active site containing methionine 1 (M1) from a neighboring monomer (From (3)). Residues C51, E94, Y82 and Y134 are shown together with bound M1. The water molecule is also represented in the active site by a sphere. The dashed lines represent the hydrogen bonds observed between residues and the water molecule. Monitored distances between atoms are: $d(O^{E1}_{E94}-O_{H_2O}) = 2.52 \text{ \AA}$; $d(O^{E2}_{E94}-S^{\delta}_{M1}) = 3.43 \text{ \AA}$; $d(O^{E2}_{E94}-S^{\gamma}_{C51}) = 5.06 \text{ \AA}$; $d(S^{\gamma}_{C51}-S^{\delta}_{M1}) = 3.47 \text{ \AA}$;

$d(O^{\zeta}_{Y82}-O_{H_2O}) = 2.88 \text{ \AA}$; $d(O^{\zeta}_{Y82}-S^{\delta}_{M1}) = 3.57 \text{ \AA}$; $d(O^{\zeta}_{Y134}-O_{H_2O}) = 2,75 \text{ \AA}$, $d(O_{H_2O}-S^{\delta}_{M1}) = 3.33 \text{ \AA}$. ;
 $d(O^{\zeta}_{Y82}-S^{\gamma}_{C51}) = 6.61 \text{ \AA}$; $d(O^{\zeta}_{Y134}-S^{\gamma}_{C51}) = 7.16 \text{ \AA}$.

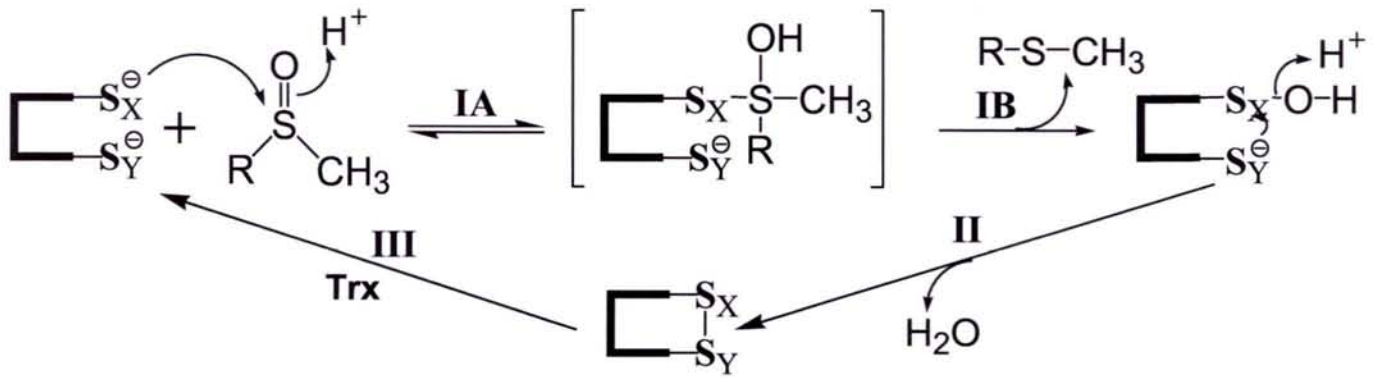
Table

Table 1

| | Steady-state ^a | | Reductase step | | | |
|-----------------|---|--------------------|--|---------------------------------|--|--------------------------------|
| | k_{cat} (s ⁻¹ , pH 8.0) | K_M (mM, pH 8.0) | k_{max} (s ⁻¹ , pH 8.0) ^b | K_S (mM, pH 8.0) ^b | $k_{\text{max opt}}$ (s ⁻¹ , optimal pH) ^c | pK_{app} ^c |
| Wild type | 3.7 ± 0.5 | 0.6 ± 0.2 | 790 ± 10 | 55 ± 2 | 730 ± 10 | 5.7 ± 0.1 |
| E94A | (1.5 ± 0.1).10 ⁻² | 119 ± 27 | (1.5 ± 0.1).10 ⁻² | 119 ± 27 | (2.0 ± 0.1).10 ⁻² | 7.5 ± 0.1 |
| E94D | 0.25 ± 0.03 | 161 ± 42 | 0.25 ± 0.03 | 161 ± 42 | 0.19 ± 0.01 | 6.7 ± 0.1 |
| E94Q | 0.88 ± 0.07 | 25 ± 6 | 12.2 ± 0.3 | 151 ± 8 | 28 ± 3 | 8.0 ± 0.1 |
| Y82F | 2.2 ± 0.1 | 3.7 ± 0.7 | 51 ± 1 | 72 ± 4 | 46 ± 1 | 7.6 ± 0.1 |
| Y134F | 1.5 ± 0.1 | 0.8 ± 0.2 | 250 ± 8 | 70 ± 10 | 380 ± 10 | 7.7 ± 0.1 |
| Y82F/Y134F | (1.5 ± 0.1).10 ⁻² | 24 ± 8 | (3.4 ± 0.1).10 ⁻² | 26 ± 2 | (7.2 ± 0.7).10 ⁻² | 8.0 ± 0.1 |
| Y82F/Y134F/E94Q | (1.0 ± 0.1).10 ⁻³ | 62 ± 22 | (1.2 ± 0.1).10 ⁻³ | 28 ± 7 | (1.1 ± 0.1).10 ⁻² | 9.5 ± 0.1 |

Figures

Scheme 1



Scheme 2

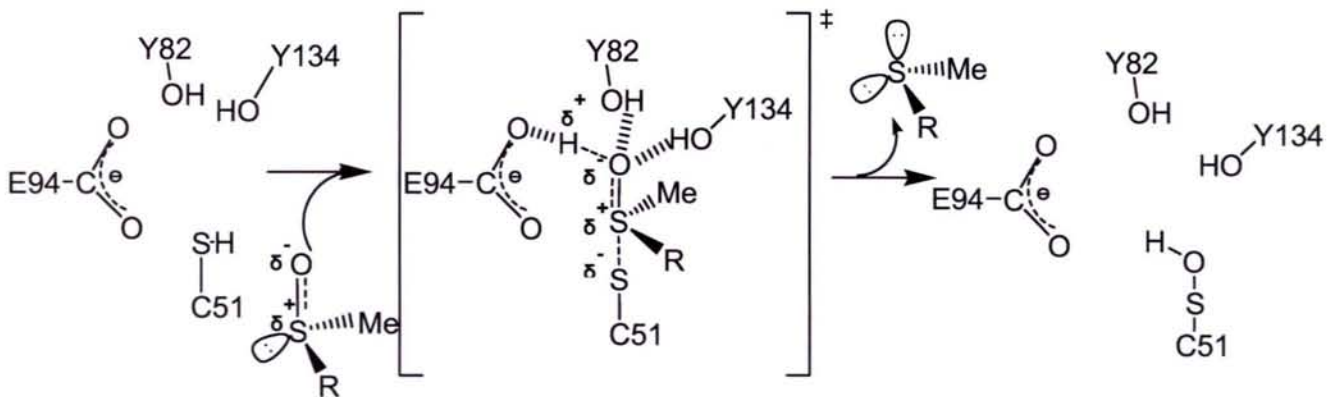


Figure 1

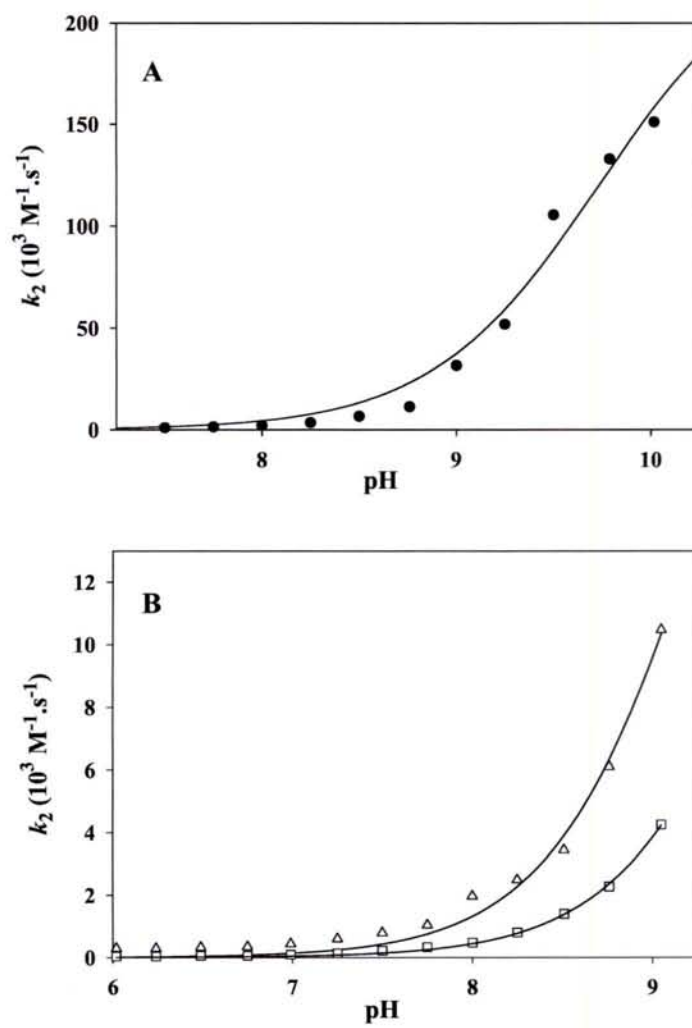


Figure 2

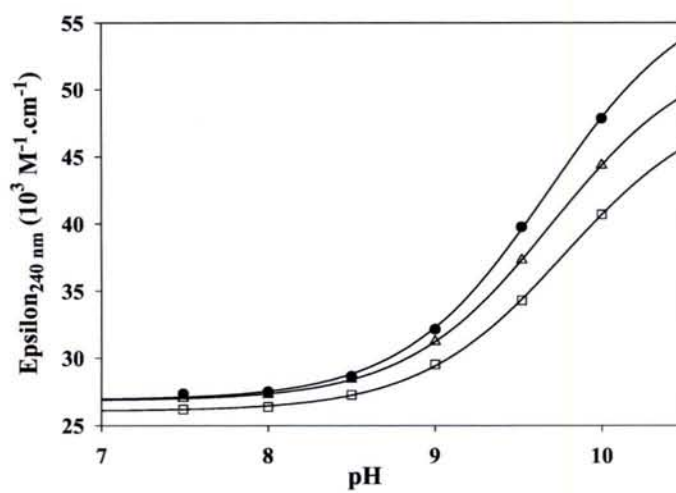


Figure 3

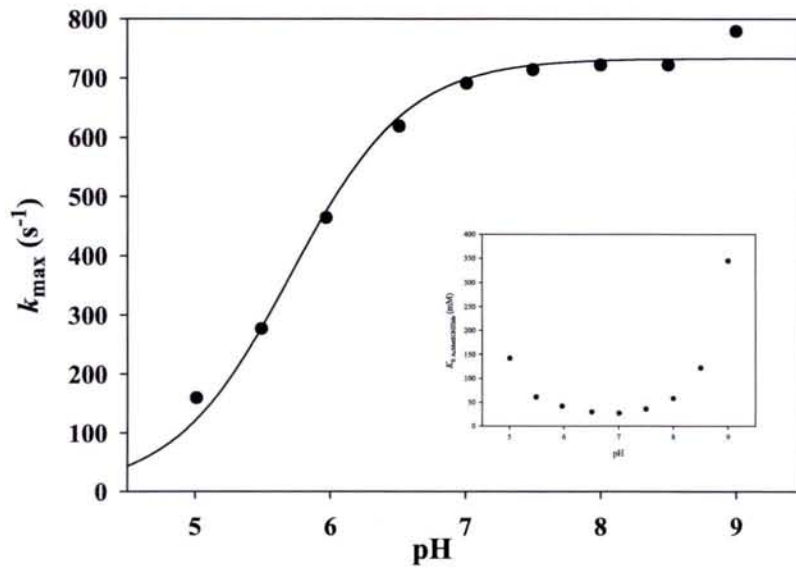


Figure 4

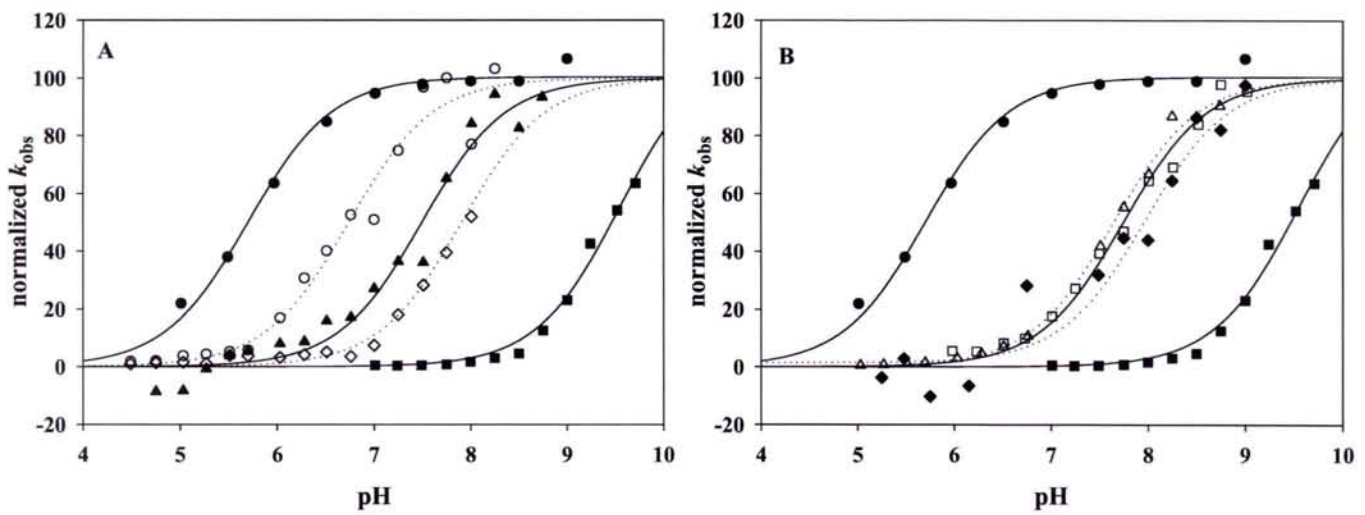
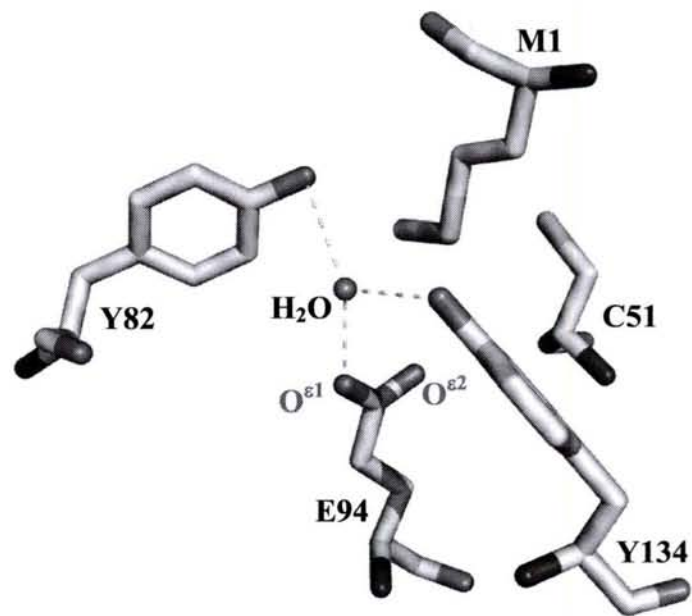


Figure 5



II.4 Etude complémentaire de l'étape réductase par spectrométrie de masse et marquage isotopique

Dans le but de démontrer sans ambiguïté la validité du mécanisme de réarrangement de l'adduit sulfurane postulé par le mécanisme proposé pour l'étape réductase, nous avons entrepris de mettre en évidence le transfert de l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde vers le groupement thiol de la Cys51 conduisant à l'intermédiaire acide sulfénique. Cette étude a été menée en collaboration avec le Dr. Jacques Bodiguel, au Laboratoire (UMR 7568 CNRS-INPL) ainsi que Guillaume Chevreux et le Dr. Noëlle Potier, au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique dirigé par Dr. Van Dorselaer (UMR 7509 CNRS-ULP).

La stratégie retenue pour mener à bien ce projet a consisté à utiliser soit un substrat dont la fonction sulfoxyde est marquée isotopiquement par un O^{18} , soit un solvant marqué H_2O^{18} . La caractérisation isotopique de la nature de l'atome d'oxygène porté par l'intermédiaire acide sulfénique est ensuite réalisée par spectrométrie de masse, sur un variant de la MsrA dont la cystéine de recyclage est remplacée par une Ser, ce qui permet d'accumuler l'intermédiaire acide sulfénique. Ainsi, si le mécanisme de réduction de la MetSO procède selon le mécanisme proposé précédemment, c'est-à-dire *via* un réarrangement de l'adduit covalent de type sulfurane, l'oxygène porté par l'acide sulfénique doit être un oxygène provenant du sulfoxyde. Si au contraire l'acide sulfénique est formé par l'attaque d'une molécule d'eau sur le soufre de la Cys51 portant l'adduit sulfurane, hypothèse que l'on ne peut pas exclure, l'oxygène porté par l'acide sulfénique doit être un oxygène provenant du solvant.

II.4.1 Synthèse et purification de l'AcMetSO¹⁸NHMe

H_2O^{18} a été choisie comme source d' O^{18} pour la synthèse du substrat AcMetSOHNMe marqué. Le protocole d'oxydation du DMS en DMSO par H_2O en présence de brome et de pyridine décrit par Okruszek, 1983 a été adapté pour l'oxydation de AcMetNHMe en AcMetSO¹⁸HNMe (Voir Matériel et Méthodes). L'adaptation du protocole et la synthèse ont été réalisés par le Dr. Jacques Bodiguel. L'oxydation par H_2O^{16} a été réalisée en parallèle comme témoin. Après deux étapes de purification par chromatographie d'échange cationique, puis par chromatographie en phase inverse, l'enrichissement isotopique du substrat a été

Résultats : Etude du mécanisme de l'étape réductase

déterminé par spectrométrie de masse (ESI-MS). Cette analyse a révélé un enrichissement isotopique du substrat AcMetSONHMe en O¹⁸ de l'ordre de 70 % (Tableau 3).

| | Masse théorique (Da) | Masse mesurée (Da) |
|----------------------------|----------------------|--------------------|
| AcMetSO ¹⁶ NHMe | 221 | 221,07 |
| AcMetSO ¹⁸ NHMe | 223 | 223,08 (70 %) |
| | | 221,07 (30 %) |

Tableau 3 : Récapitulatif des masses attendues et mesurées pour les substrats AcMetSONHMe, dont la fonction sulfoxyde a été marquée ou non par un O¹⁸.

II.4.2 Caractérisation par spectrométrie de masse de l'intermédiaire acide sulfénique

La caractérisation de l'intermédiaire acide sulfénique par spectrométrie de masse s'étant révélée impossible sur le variant C198S de la MsrA de *N. meningitidis*, elle a été réalisée sur le variant C86S/C198S/C206S de la MsrA d'*E. coli* (équivalent au variant C198S de la MsrA de *N. meningitidis*). En effet, l'analyse par spectrométrie de masse (ESI-MS en conditions dénaturantes et en conditions natives) du variant C198S de la MsrA de *N. meningitidis* après oxydation par la MetSO a révélé une population hétérogène dominée par une forme dont la masse correspond à un dimère covalent lié par une fonction thiosulfinate, probablement formée par réaction entre deux formes monomériques oxydées à l'état d'acide sulfénique. Par contre, l'analyse par ESI-MS en conditions natives du variant C86S/C198S/C206S de la MsrA d'*E. coli* après oxydation par la MetSO a montré l'existence d'une unique forme, dont la masse correspond à une MsrA monomérique oxydée par un atome d'oxygène. Ainsi, l'analyse en condition native du triple variant de la MsrA d'*E. coli* permet la caractérisation de l'intermédiaire acide sulfénique par ESI-MS. C'est donc cette enzyme qui a été utilisée pour les expériences d'oxydation par le substrat AcMetSO¹⁸NHMe.

| MsrA | | Masse théorique (Da) | Masse mesurée (Da) |
|------------------------------------|---------|----------------------|--|
| <i>N. meningitidis</i> C198S | réduite | 21880,3 | 21880,3 |
| | oxydée | 21896,3 | 43775,1 (dimère + 1 O) 21910,8 (monomère + 2 O) |
| <i>E. coli</i> C86S/C198S/C206S | réduite | 23135,6 | 23135,1 |
| | oxydée | 23151,6 | 23150,8 |

Tableau 4 : Récapitulatif des masses attendues et mesurées par ESI-MS en conditions natives des MsrA C198S de *N. meningitidis* et C86S/C198S/C206S d'*E. coli* avant et après oxydation par le substrat AcMetSONHMe.

II.4.3 Caractérisation de l'acide sulfénique par marquage isotopique de substrat ou de solvant

Trois séries d'analyses ont été réalisées avec les substrats: 1) AcMetSO¹⁶NHMe ou AcMetSO¹⁸NHMe en présence d'H₂O¹⁶, 2) AcMetSO¹⁶NHMe en présence d'H₂O¹⁶ ou d'H₂O¹⁸, et 3) AcMetSO¹⁶NHMe en présence d'H₂O¹⁸ suivi d'une dilution par H₂O¹⁸ ou H₂O¹⁶. Toutes les mesures de spectrométrie de masse ont été réalisées par Guillaume Chevreux, au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, à Strasbourg. Ces analyses ont été réalisées sur trois spectromètres différents afin de s'assurer de la précision et de la reproductibilité des spectres. Les résultats regroupés dans le tableau 5 montrent que dans tous les cas l'oxygène porté par l'intermédiaire acide sulfénique au moment de son analyse provient d'une molécule d'eau du solvant.

| MsrA <i>E. coli</i> | Substrat | Solvant | Résultats ESI-MS |
|-----------------------|----------------------------|--|--------------------------|
| C86S/C198S/C206S | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁶ | Cys51-SO ¹⁶ H |
| C86S/C198S/C206S | AcMetSO ¹⁸ NHMe | H ₂ O ¹⁶ | Cys51-SO ¹⁶ H |
| C86S/C198S/C206S | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁸ | Cys51-SO ¹⁸ H |
| C86S/C198S/C206S | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁸ , dilution H ₂ O ¹⁸ | Cys51-SO ¹⁸ H |
| C86S/C198S/C206S | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁸ , dilution H ₂ O ¹⁶ | Cys51-SO ¹⁶ H |
| C86S/C198S/C206S/E94A | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁶ | Cys51-SO ¹⁶ H |
| C86S/C198S/C206S/E94A | AcMetSO ¹⁶ NHMe | H ₂ O ¹⁸ | Cys51-SO ¹⁶ H |

Tableau 5 : Récapitulatif des conclusions des analyses de l'intermédiaire acide sulfénique des variants C86S/C198S/C206S et C86S/C198S/C206S/E94A de la MsrA d'*E. coli* obtenues par ESI-MS en conditions natives par Guillaume Chevreux.

Le fait qu'après dilution, l'acide sulfénique porte un oxygène provenant du solvant montre qu'il existe un mécanisme "continu" d'échange d'eau entre l'intermédiaire acide sulfénique et le solvant. Par ailleurs, cet échange est relativement rapide, puisqu'il se produit en quelques minutes, le temps nécessaire à effectuer la dilution et à enregistrer les spectres de masse. Ces données suggèrent l'implication d'une catalyse acide/base afin d'activer la molécule d'eau au sein du site actif de la MsrA d'*E. coli*.

La possibilité que la chaîne latérale du Glu94 soit impliquée dans une telle catalyse a été étudiée *via* l'analyse de l'acide sulfénique formé au sein du site actif du quadruple variant E94A/C86S/C198S/C206S de la MsrA d'*E. coli*. Les résultats obtenus montrent l'absence d'échange rapide en absence du Glu94, l'atome d'oxygène porté par l'acide sulfénique formé

par la réduction de AcMetSO¹⁶NHMe en présence de solvant H₂O¹⁶ ou H₂O¹⁸ étant dans les deux cas l'O¹⁶. L'ensemble de ces résultats montre d'une part que le Glu94 est capable de jouer le rôle de catalyseur acide/base pour l'échange de molécule d'eau observé sur l'intermédiaire acide sulfénique lorsqu'il s'accumule. Il conviendra de confirmer ce résultat obtenu en présence de AcMetSO¹⁶NHMe par l'analyse de l'intermédiaire acide sulfénique formé en présence AcMetSO¹⁸NHMe. Néanmoins, le fait que l'oxygène du substrat puisse être celui retrouvé sur l'intermédiaire acide sulfénique suggère fortement que le mécanisme de l'étape réductase de la MsrA de type sauvage passe bien par une étape de réarrangement d'un intermédiaire / état de transition de type sulfurane.

II.5 Scénario proposé pour la catalyse de l'étape réductase

L'ensemble des résultats obtenus montre que : 1) la Cys51 catalytique est activée dans le complexe enzyme/substrat, avec une diminution de son pKa d'au moins 4 unités, 2) aucun catalyseur acide/base ne joue de rôle majeur dans l'étape cinétiquement limitante de l'étape réductase, 3) les résidus conservés Glu94, Tyr82 et Tyr134 sont impliqués dans l'abaissement du pKa de la Cys51 et dans la stabilisation de l'état de transition, et 4) l'oxygène du substrat sulfoxyde est probablement celui qui est retrouvé sur l'intermédiaire acide sulfénique. Ces résultats, combinés à l'examen des structures connues du site actif de la MsrA, nous ont conduit à proposer un mécanisme de catalyse dans lequel le substrat MetSO présent dans le site actif jouerait un rôle majeur (Figure 56). Dans ce scénario, l'état de transition a une géométrie de type sulfurane, la fonction sulfoxyde est protonée et stabilisée par des liaisons hydrogènes avec les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134. Cette stabilisation serait la force motrice qui permettrait de diminuer le pKa de la Cys51. La fonction carboxylate du Glu94 aurait un rôle majeur dans la stabilisation de la fonction sulfoxyde *via* d'une part une liaison hydrogène avec l'oxygène protoné de la fonction sulfoxyde et d'autre part une interaction charge / charge avec la charge partielle positive portée par l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde (Voir paragraphe I, pages 150 à 154 de la partie Discussion et Perspectives pour plus de détails).

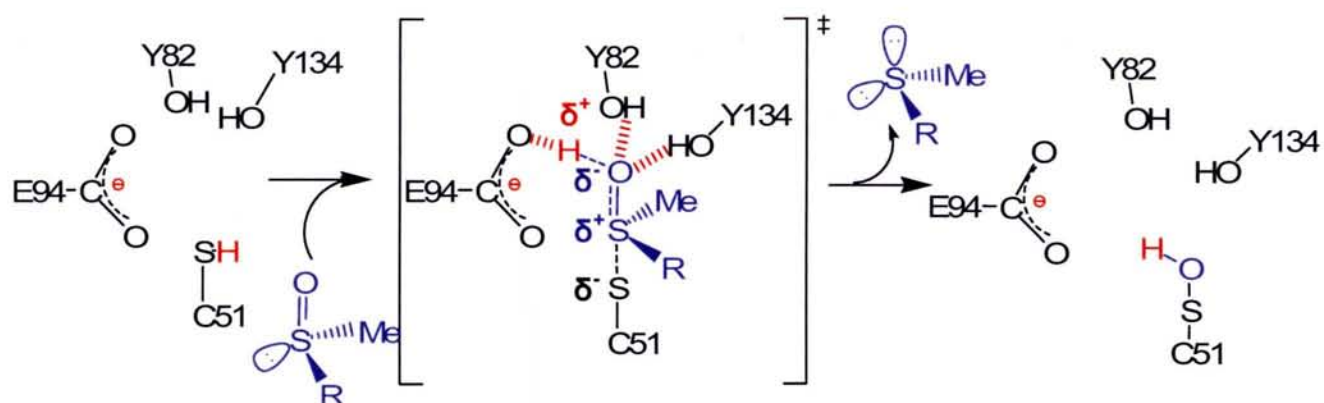


Figure 56 : Représentation schématique du mécanisme catalytique proposé pour l'étape réductase de la MsrA de *N. meningitidis*.

Partie III : Interaction Msr/Trx : identification du pont disulfure intermoléculaire transitoire formé lors de la réduction de la MsrA de *N. meningitidis* par la Trx

Les études cinétiques présentées dans la partie I montrent qu'il doit exister une reconnaissance spécifique, localisée entre les Msr sous forme oxydée et la Trx sous forme réduite. La Trx est une protéine monomérique ubiquitaire d'environ 110 acides aminés, jouant un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires, pour la plupart *via* son activité disulfure oxydo-réductase. La Trx est donc capable d'interagir avec de nombreux partenaires et il est intéressant de noter qu'il n'existe aucune séquence ou motif conservé de reconnaissance parmi la population très hétérogène des cibles réduites par la Trx. Dans ce cadre, les MsrA et MsrB représentent un modèle d'étude de l'interaction entre la Trx et deux cibles structurellement distinctes.

Plusieurs approches expérimentales peuvent être utilisées afin d'obtenir des informations structurales sur la nature des interactions qui existent entre les deux partenaires, parmi lesquelles la détermination de la structure d'un complexe Msr/Trx par radiocristallographie. Un pré-requis à une telle étude consiste à pouvoir isoler un complexe homogène et stable entre Msr et Trx. Compte tenu de la valeur élevée de la constante d'affinité apparente entre Msr_{ox} et Trx_{réd} et de la vitesse de l'étape d'échange de pont disulfure qui suit la formation du complexe entre les deux partenaires, il est impossible d'obtenir un complexe non covalent Msr_{ox}/Trx_{réd} stable. Dans ce contexte, la stratégie consiste à pouvoir isoler un complexe covalent correspondant à l'intermédiaire Msr_{ox}/Trx_{réd} transitoire formé lors de l'établissement du pont disulfure intermoléculaire (Figure 57).

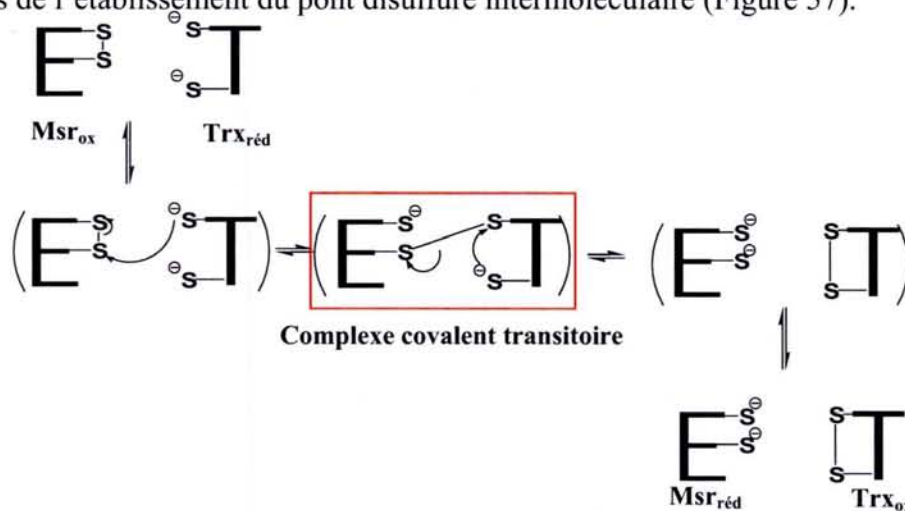


Figure 57 : Représentation schématique du mécanisme de réduction d'une protéine oxydée sous forme de pont disulfure par la Trx. Ce mécanisme reprend le modèle présenté précédemment au paragraphe I.3.1 page 89, et développe l'échange de pont disulfure entre les deux protéines pour faire apparaître le complexe covalent transitoire, encadré en rouge.

Un tel complexe covalent peut facilement être généré de manière artificielle et en quantité importante à partir de variants protéiques de Msr et de Trx ne possédant plus qu'une seule Cys, à la condition d'avoir au préalable identifié la Cys de chaque partenaire impliquée dans le pont disulfure intermoléculaire qui se forme transitoirement. Cependant, à l'inverse de la Trx où la Cys nucléophile a été clairement identifiée comme étant la Cys32 (Kallis et Holmgren, 1980), l'identité de la Cys des Msr impliquée dans le pont disulfure intermoléculaire (qui peut être soit la Cys catalytique soit la Cys de recyclage) n'était pas connue. Afin d'identifier la Cys de la MsrA de *N. meningitidis* engagée dans le pont disulfure mixte avec la Cys32 de la Trx, nous avons utilisé deux approches différentes : l'une couramment employée et basée sur des critères cinétiques indirects et l'autre basée sur l'identification directe du pont disulfure par spectrométrie de masse. Cette dernière approche est une méthode concluante permettant l'identification non ambiguë du pont disulfure intermoléculaire formé (Voir paragraphe III.3, page 133). Ces travaux sont présentés dans la publication 4, pages 135 à 149, travaux qui vont être soumis à *J. Biol. Chem.*

III.1. Caractérisation cinétique

Cette approche utilise des Msr activées à l'aide de TNB⁻ et le variant C35S de la Trx (Figure 58). Pour cela, deux variants de Msr, chacun ne possédant plus qu'une Cys, la seconde étant remplacée par une Ser, ont été traités avec un excès de DTNB conduisant à la formation d'adduits Msr-TNB. Après purification des Msr activées, la vitesse de formation de chacun des complexes covalents entre chacune des Msr activées et la Trx C35S a été mesurée en suivant spectrophotométriquement la libération du TNB⁻.

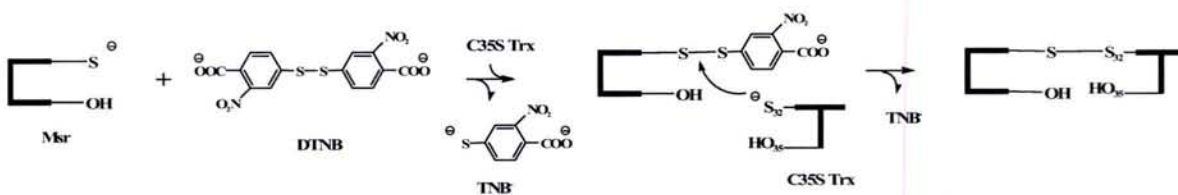


Figure 58 : Représentation schématique de l'activation chimique des Msr et de la formation d'un complexe covalent artificiel Msr/Trx C35S. L'ajout de DTNB permet l'activation chimique de l'unique Cys de Msr *via* la formation de l'adduit Cys-TNB. Après l'isolement de l'adduit, la formation du complexe artificiel Msr/Trx C35S est suivie par la libération concomitante du TNB⁻.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une reconnaissance entre les partenaires Trx C35S et MsrA C198S ou MsrA C51S. De plus, l'adduit MsrA C198-TNB est 10⁴ fois plus réactif que l'adduit MsrA C51-TNB vis-à-vis de la Trx C35S. Ce critère cinétique

suggère très fortement que la Cys de recyclage (Cys198) est la Cys qui forme le pont disulfure transitoire avec la Trx lors de la réduction de MsrA_{ox}.

III.2 Caractérisation par spectrométrie de masse

La deuxième approche est basée sur l'identification de la Cys impliquée dans la formation du pont disulfure mixte avec la Trx, par analyse par spectrométrie de masse du complexe covalent formé entre MsrA_{ox} et Trx C35S. L'utilisation de ce variant Trx ne possédant que la Cys32 nucléophile est indispensable pour ne pas aller au terme de la réaction, c'est-à-dire à la formation de Trx_{ox} et Msr_{réd}. L'ajout d'iodoacétamide (IAM), en alkylant la Cys de la MsrA non impliquée dans la formation du pont disulfure mixte intermoléculaire, permet d'avoir un complexe covalent chimiquement stable Msr / Trx et donc de pouvoir l'analyser par spectrométrie de masse (Figure 59).

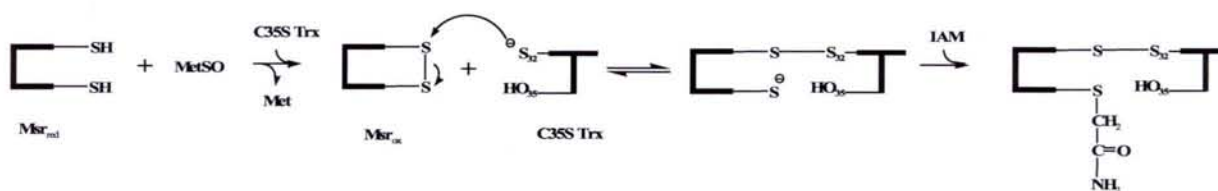


Figure 59 : Représentation schématique de la formation et de l'alkylation du complexe covalent MsrA_{ox} / Trx C35S. La Msr est oxydée en présence de MetSO. Après dessalage, la Msr_{ox} est incubée en présence de Trx C35S puis un excès d'IAM est ajouté au mélange afin de stabiliser le complexe covalent formé et de marquer la Cys non engagée dans le pont disulfure mixte.

Après purification par filtration sur gel, le complexe covalent alkylé a été analysé par spectrométrie de masse après protéolyse par AspN. Le protocole mis en place permet d'identifier directement à la fois la Cys alkylée et la Cys formant un pont disulfure avec la Trx. Les analyses de spectrométrie de masse ont été mises au point et réalisées par Guillaume Chevreux, Noëlle Potier et Sarah Sanglier, au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique à Strasbourg.

L'analyse par MALDI-MS des peptides de MsrA issus de la protéolyse du complexe a mis en évidence un bon recouvrement de séquence ($\approx 80\%$) et a permis d'identifier un unique peptide alkylé par l'IAM. Il s'agit du peptide 40-62, portant la Cys51. La Trx n'étant pas clivée par AspN, l'analyse par ESI-MS a mis en évidence la Trx C35S liée covalentement *via* un pont disulfure au peptide correspondant au fragment 188-205 de MsrA, portant la Cys198. Ainsi, les résultats montrent clairement que, dans le cas de la MsrA de *N. meningitidis*, la Cys32 de Trx forme un pont disulfure transitoire avec la Cys de recyclage C198 de la MsrA_{ox}.

III.3 Conclusion

Les données obtenues par l'approche cinétique appliquée à la formation des complexes artificiels et par l'approche par spectrométrie de masse ont permis d'identifier la Cys198 comme étant la Cys engagée dans le pont disulfure intermoléculaire transitoire avec la Trx. L'étude en parallèle, réalisée par Alexandre Olry sur la MsrB de *N. meningitidis*, a montré que l'approche cinétique ne permettait pas de discriminer entre les deux Cys de la MsrB, les deux adduits formés avec le TNB⁻ présentant la même réactivité en terme de k_2 vis-à-vis de C35S Trx. Par contre, l'approche par spectrométrie de masse a permis d'identifier la Cys catalytique C117 comme étant la Cys formant un pont disulfure transitoire avec Cys32 de la Trx.

Les résultats obtenus sur la MsrB par l'approche cinétique classique avec activation par TNB⁻ montrent que cette approche ne garantit pas dans tous les cas l'obtention de résultats concluants. De plus, cette approche est basée sur la comparaison des valeurs des constantes cinétiques k_2 de deuxième ordre. Or, cette valeur dépend non seulement de la réactivité de la Cys de la cible mais aussi de la reconnaissance entre les deux partenaires, qui peut être affectée par la présence du groupement TNB. C'est le cas pour la MsrB où on ne peut atteindre de saturation de la cinétique et donc une constante d'affinité. Pour les deux variants MsrB, des valeurs faibles et semblables de k_2 sont mesurées, suggérant un effet d'encombrement stérique du TNB⁻, qui est vraisemblablement la cause de la très faible affinité de la Trx. Dans ce contexte, la seconde méthode développée ici en s'appuyant sur l'outil spectrométrie de masse, partant de la forme Msr_{ox} qui est la forme reconnue par Trx_{réd} et qui de ce fait évite tout problème d'encombrement stérique dû à la présence de TNB⁻ est d'application générale.

Nos résultats montrent que pour la MsrA, la Cys de recyclage, située dans une boucle, est impliquée dans la formation du pont disulfure transitoire avec la Trx, alors que c'est la Cys catalytique, située dans un brin β , qui est impliquée dans la MsrB. Comment peut-on alors expliquer ces résultats différents en termes de Cys impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire avec la Trx ? Pour les deux Msr, il a été montré que la cystéine catalytique, lors de la formation du complexe michaelien avec la MetSO, voit son pKa fortement abaissé permettant, *via* sa forme thiolate, la formation de l'intermédiaire acide sulfénique avec une vitesse efficace. Il est donc probable que dans la forme disulfure des deux Msr reconnue par la Trx, la cystéine catalytique soit aussi un bon groupement partant. Le fait que, dans la MsrB, la Cys 117 catalytique forme le pont disulfure intermoléculaire suggère que les critères de réactivité et de meilleur groupement partant ne sont pas les seuls critères à

prendre en considération mais que le critère positionnement relatif de la Cys32 de la Trx vis à vis du pont disulfure des Msr_{ox} dans les complexes formés entre les deux partenaires soit, dans le cas des Msr, le facteur déterminant. Cette conclusion pourrait être généralisable à l'ensemble des ponts disulfures des protéines réduits par la Trx.

III.4 Publication 4

M. ANTOINE, A. OLRY, G. CHEVREUX, A. GAND, S. BOSCHI-MULLER, S. SANGLIER, N. POTIER, A VAN DORSSELAER, G. BRANLANT. The recycling of Methionine Sulfoxide Reductases A and B by Thioredoxin differs in the nature of the transient intermolecular disulfide species. A soumettre à J. Biol. Chem.

Pages 137 à 151.

THE RECYCLING OF METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASES A AND B BY THIOREDOXIN DIFFERS IN THE NATURE OF THE TRANSIENT INTERMOLECULAR DISULFIDE SPECIES

Mathias ANTOINE¹, Alexandre OLR^Y¹, Guillaume CHEVREUX², Adeline GAND¹, Sandrine BOSCHI-MULLER¹, Sarah SANGLIER-CIANFERANI², Noelle POTIER², Alain VAN DORSSELAER² and Guy BRANLANT^{1*}

¹ UMR CNRS-UHP 7567 - Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire - Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

² UMR CNRS 7509, Spectrométrie de Masse Bio-Organique – Université Louis Pasteur, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, Cedex 2, France

* corresponding author: phone: (33) 3 83 68 43 04; fax: (33) 3 83 68 43 07; e-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr

Running Title: Msr/Trx transient disulfide species

Keywords: Msr, Trx, mixed disulfide complex, mass spectrometry, kinetics.

Methionine sulfoxides are stereospecifically reduced by two structurally unrelated classes of methionine sulfoxide reductases (Msr). Both MsrA and MsrB share a similar three-step catalytic mechanism which includes formation of an intra disulfide bond between the catalytic and the recycling cysteines then reduces by thioredoxin (Trx). Because of the low affinity between Msrs and Trx, characterization of the structural factors involved in their recognition can be only done on a covalent Msr/Trx complex. Thus, a prerequisite is to identify the Msr Cys engaged in the transient intermolecular disulfide bond with Trx C32. The usual Cys chemical activation procedure followed by kinetic analysis of formation of the covalent complexes was not conclusive in the case of MsrB. Another method which consists of forming a stable covalent intermediate between the oxidized Msrs and C35S Trx and then to identify the intermolecular disulfide bond by mass spectrometry gave conclusive results. Surprisingly, it revealed that the recycling C198 in MsrA is engaged in the mixed disulfide bond with Trx whereas it is the catalytic C117 in MsrB. These results suggest that the positioning of the Trx C32 relative to that of the Msr disulfide bonds within the binary complex is the major factor that governs the nature of the transient interdisulfide bond formed in Msrs

Oxidation of methionine into methionine sulfoxide (MetSO) is associated with many pathologies and is described to exert regulatory effects on protein functions (1, 2 for review). Methionine sulfoxide reductases (Msr) are a family of enzymes that catalyzes the reduction of protein-MetSO back to Met (3, 4 for review). Two classes of Msrs, named MsrA and MsrB, are described so far that are specific for the *S* and the *R* isomer at the sulfur of MetSO, respectively (5, 6, 7, 8). They share a similar catalytic mechanism that proceeds *via* the sulfenic acid chemistry and includes at least three chemical steps (8, 9) with 1) formation of a sulfenic acid intermediate on the catalytic Cys with a concomitant release of one mole of Met per mole of Msr, 2) formation of an intra disulfide bond *via* the attack of the recycling Cys on the sulfenic acid intermediate; and 3) reduction of the disulfide bond by thioredoxin (Trx), the rate of which is rate-limiting in the overall mechanism (10, 11). Observation of saturating kinetics in the Trx-recycling process demonstrates the formation of a complex between oxidized MsrA/B¹ under disulfide state and reduced Trx and therefore the existence of specific interactions between the two partners.

Inspection of the X-ray structures of MsrA and MsrB shows that the two classes are structurally-unrelated. MsrAs are composed of a central core which can be described as a rolled mixed β sheet flanked by three α -helices (12, 13, 14) while the fold of MsrBs consists of antiparallel

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

β -strands organized in two sheets that face each other and form a barrel-like core (15). The active sites of MsrA/B are both exposed solvent exposed and in all the structures are occupied by molecules that can mimic either the transition state or the substrate. What is particularly striking is that the catalytic MsrA C51 is located next to the N-terminal end of an α -helix whereas the catalytic MsrB C117 is positioned in the middle of a β -strand. Concerning the recycling Cys, i.e. C198/C206 in MsrA and C63/C31 in MsrB, they are both located in a loop that, by its potential flexibility, could favour an efficient formation of the intra-disulfide bond i.e. C51/C198 or C198/C206 in MsrA; C117/C63 or C117/C31 in MsrB. It is these disulfide bonds within their three-dimensional context that are specifically reduced by Trx.

Trx is a small ubiquitous protein which, by its involvement in many essential cellular processes, interacts with a large number of target proteins (16). In most of its functions, Trx acts as a disulfide oxido-reductase, due to the presence of the conserved WC₃₂GPC₃₅ motif. A striking feature is that the Trx targets present neither sequence and/or structural homologies nor conserved binding motifs.

One way to characterize, at the molecular level, the interactions between Trx and its targets – when the affinity between the two partners is low – is to form a stable covalent complex representative of the transient inter-disulfide complex that occurs upon the Trx-recycling process and then to determine its three-dimensional structure. The usual method consists of substituting a serine residue for one of the two cysteines in both partners i.e. C35 in Trx and the one in the target which is not involved in the transient inter-disulfide bond and then to form the inter disulfide bond between the non-substituted cysteines by activation of the cysteine of the target by dithionitrobenzoate (DTNB).

However, a prerequisite to applying this strategy is to know which of the two cysteines in the target forms the transient inter disulfide bond with C32 of Trx. Usually, it is assumed that the target cysteine which forms the transient intermediate with Trx corresponds to the one that displays the highest reactivity –under a TNB activated form– with C35S Trx. Such an assumption implies that 1) the structure of the mutated target protein, activated by a TNB molecule, is representative of that of the oxidized

form of the target, the form of which is the substrate of the reduced Trx and, 2) the measured second order kinetic rate constant which includes an affinity (K_{Trx}) contribution is indeed representative of the reactivity of the cysteine target and is not perturbed by the presence of a TNB molecule.

In the present study, two methods were applied to identify the cysteine of the MsrA/B from *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) that forms the transient inter-disulfide bond with Cys32 of Trx¹² from *Escherichia coli* (*E. coli*).

The first method, which is briefly described above and used a Msr form activated by DTNB, is based on kinetic criteria. The second one is based on the analysis by mass spectrometry (MS) of the disulfide complex formed between Msr_{ox} and C35S Trx, chemically stabilized by alkylation of the remaining Msr cysteine not engaged in the intermolecular disulfide bond. A similar approach has been applied on trypanredoxin peroxidase / trypanredoxin complex (17) (Budde, 2003), APS reductase / Trx complex (18) and Tpx / Trx complex (19).

MS analyses support a Trx-recycling process in which the MsrA recycling C198 forms the transient inter-disulfide bond with Trx in contrast to MsrB in which the catalytic C117 is involved. These conclusions are compared with those from the alternative method which was not conclusive for MsrB and are discussed in relation to the current known structures of the active sites of the MsrA and MsrB.

Experimental procedures

Site-directed mutagenesis, production and purification of wild type and mutated N. meningitidis MsrA and MsrB and E. coli Trx1.

MsrA, MsrB and Trx site-directed mutageneses were performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Production and purification of C35S Trx1 were realized as previously described for wild-type Trx1 from *E. coli* (18). The MsrA and MsrB correspond to the central and the C-terminal domain of *N. meningitidis* PilB, respectively (8). All Msrs were produced with the BE002 *E. coli* strain (MG1655 msrA::spec Ω , msrB:: α 3kana), transformed with the plasmidic construction pSKPILBmsrA or pSKPILBmsrB containing the coding sequence of msrA or msrB under the lac promoter. The BE002

strain was kindly provided by Dr F. Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli*. Purifications of Msrs and MsrBs were realized as previously described (8, 10).

Purity of all proteins were checked by electrophoresis on 12.5% (Msr) or 15 % (Trx) SDS-PAGE gel, followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Molecular masses of proteins were determined by electrospray ionization mass spectrometry analyses. Storage of the enzymes was done as previously described (8). The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of 26,200 M⁻¹ cm⁻¹, 17,330 M⁻¹ cm⁻¹ and 14,500 M⁻¹ cm⁻¹ for Msrs, MsrBs and Trx, respectively. In this paper, *N. meningitidis* MsrA and MsrB amino acid numbering is based on the amino acids numbering of *E. coli* MsrA and MsrB, respectively (Fig. 5, panel A and B) (9, 19). Cys content of MsrA, MsrB and Trx was determined using DTNB under native conditions in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) as previously described (9).

Activation of Msrs by DTNB and preparation of Msrs_{ox}

C51S and C198S Msrs and C63S and C117S MsrBs were activated under their TNB disulfide form, referred to as Msr-TNB. Activation was carried out by mixing 100 μM mutated Msr with 500 μM DTNB in buffer A. After 30 min of incubation at room temperature, each activated Msr-TNB was passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A, in order to remove TNB⁻ and excess DTNB (see Fig.1A).

MsrA_{ox} and MsrB_{ox} were prepared by mixing 100 μM of each Msr with 100 mM DL-Met-*R,S*-SO in buffer A. Only the *S* isomer is a substrate for MsrA while it is the *R* isomer for MsrB. After 10 min of incubation at room temperature, each Msr_{ox} was passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column equilibrated with buffer A. Oxidation state of the Msrs was checked by titration with DTNB.

Formation and purification of the covalent complexes between C35S Trx and, Msr-TNB and Msrs_{ox}, respectively

The two MsrA/B /C35S Trx complexes formed *via* the DTNB activation process were obtained by mixing 50 μM MsrA-TNB or MsrB-TNB, in which one of the two Cys is substituted by

a serine, with 150 μM C35S Trx in buffer A (Fig. 1A).

The two Msr/Trx complexes formed between MsrA/B_{ox} and C35S Trx, were obtained by incubating 50 μM of Msr_{ox} A/B and 150 μM of C35S Trx at 25°C for 10 to 30 min in buffer A. Then, 10 mM iodoacetamide (IAM) was added for 30 min (Fig.1B).

Formation of the complexes was checked on non-reducing 12.5 % SDS-PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. 3.33 μL of each mixture were loaded on the gel, representing 0.17 nmole of Msr and 0.5 nmole of Trx. Purification of the covalent complexes formed between Msr_{ox} and C35S Trx was carried out by analytical gel filtration, using a Superdex 75 column fitted on an ÄKTA explorer system (Amersham Bioscience). Flow rate was 0.4 ml/min and the column was equilibrated with buffer A containing 300 mM KCl. Protein elution was followed by UV absorbance at 280 and 260 nm.

Kinetics of complex formation between C35S Trx and Msr-TNB

The rate of formation of the intermolecular disulfide bond between Msr-TNB and C35S Trx was measured spectrophotometrically by monitoring the release of TNB⁻ at 412 nm, using extinction coefficient of 13,600 M⁻¹.cm⁻¹. Experiments were carried out at 25°C on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer for the C198S MsrA. For the two mutated MsrBs and the MsrA C51S, the rate of the reaction was measured at 25°C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for absorbance. In all cases, kinetics were measured with 7.35 μM Msr-TNB and increasing concentration of C35S Trx (from 50 to 900 μM) in buffer A. Rate constants, *k*_{obs}, were obtained by fitting absorbance traces with the mono exponential Equation 1 in which *c* represents the endpoint, *a*, the amplitude of the absorbance increase and *k*_{obs} the rate constant.

$$y = a e^{-k_{obs} t} + c \quad (1)$$

Data were fit to Equation 2 using least squares analysis to determine *k*_{obs max} and *K* for C35S Trx. *S* represents the C35S Trx concentration and *K*_{Trx} the apparent affinity constant.

$$k_{obs} = k_{obs max} S / K_{Trx} + S \quad (2)$$

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

Msr/Trx complexes digestion and mass spectrometry analyses

Digestion of the Msr/C35S Trx complexes, which were formed with the Msr-TNB and Msr_{ox} was performed in solution with Asp-N (Roche, Indianapolis, USA) in 25 mM Ammonium Carbonate (Sigma, St. Louis, USA) using an enzyme concentration ratio of 1/50 (overnight, 37°C).

ESI-MS measurements were performed on an ESI-TOF (LCT, Waters, Massachusetts, USA). Nitrogen gas was used for both nebulisation and desolvation gas. Samples were continuously infused into the ESI ion source at a flow rate of 3 µl/min. Both gas and source temperature were set to 353 K. External calibration of the spectra was achieved in the positive ion mode using multiply charge ions of horse heart myoglobin (Sigma Aldrich). Samples were desalted before ESI-MS analysis using Zip Tip C₄ (Millipore, Bedford, USA) in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid.

MALDI-MS mass measurements were carried out on UltraflexTM TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 25 kV in positive ion mode and was operated in reflectron mode allowing an accuracy better than 50 ppm. The samples were prepared by standard dried droplet preparation on stainless steel MALDI targets using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix. The external calibration of MALDI mass spectra was carried out using singly charged monoisotopic peaks of a mixture of bradykinin 1-7 ($m/z=757.400$), human angiotensin II ($m/z=1046.542$), human angiotensin I ($m/z=1296.685$), substance P ($m/z=1347.735$), bombesin ($m/z=1619.822$), renin ($m/z=1758.933$), ACTH 1-17 ($m/z=2093.087$) and ACTH 18-39 ($m/z=2465.199$). Monoisotopic peptide masses were automatically annotated using Flexanalysis 2.0. Peptides were desalted before MALDI-MS mass fingerprint using Zip Tip C₁₈ (Millipore, Bedford, USA) in a 1:1 water-acetonitrile mixture (v/v) acidified with 1% formic acid.

Results

Kinetics of covalent Msr/C35S Trx formation via the DTNB activation

A prerequisite to determine the kinetics of formation of the Msr/C35S Trx complexes was to

activate Msrs under TNB form (Fig. 1A). For that, each of the Msrs in which one of the two Cys is substituted by a serine was treated by an excess of DTNB. In all cases, formation of a mixed disulfide with TNB was quantitative, as shown by spectroscopic titration which indicated a release of one mole of TNB⁻ per mole of Msr. TNB⁻ and DTNB were subsequently removed by gel-filtration. Kinetics of formation of the complex between Msrs-TNB and C35S Trx were then determined under single turn-over conditions by following the rate of TNB⁻ release at 412 nm under pseudo-first order conditions i.e. with an excess of C35S Trx relative to Msrs. An increase of OD at 412 nm corresponding to the release of one mol of TNB⁻ / mol of Msr was observed with all C35S Trx concentrations used. All the curves fitted to monoexponential Equation 1. Increasing the C35S Trx concentration up to 800 µM led to a slight kinetic saturation effect (see comments in legend of Fig. 2) for the activated MsrAs-TNB. From the curve, k_{obs} versus C35S Trx concentration, $k_{obs max}$ values of 510 and $2.1 \cdot 10^{-2} s^{-1}$ and K_{Trx} values of 1.7 and 1.0 mM corresponding to second order rate constant values (k_2) of $3 \cdot 10^5$ and $21 M^{-1} \cdot s^{-1}$ were deduced for C51S and C198S MsrA-TNB, respectively (Fig. 2, panels A and B). In the case of the C117S and C63S MsrB-TNB, no kinetic saturation effect was observed up to 900 µM C35S Trx. The slope of the curve, k_{obs} versus C35S Trx concentration, provided k_2 values of 9.4 and $13.5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ for C63S and C117S MsrB-TNB, respectively (Fig. 2, panels C and D).

Isolation of the Msr/Trx complexes formed from Msr_{ox} and C35S Trx

Prior to MS analysis, it was necessary to isolate in a pure form the covalent Msr/Trx complexes (Fig. 1B). For MsrA/Trx complex, a three-fold excess of C35S Trx relative to MsrA_{ox} was sufficient to shift 100% of MsrA under covalent complex. After 10 minutes of incubation, IAM was added to alkylate the MsrA Cys, which is liberated after formation of the MsrA/Trx complex, in order to prevent a reversal of the complex into MsrA_{ox} and C35S Trx. Addition of DTT released free MsrA and C35S Trx as shown on SDS-PAGE (Fig. 3, panel A, lanes 6 and 8). For MsrB, the same experimental conditions led to formation of a smaller amount of complex (18 % of the total MsrB, see Fig. 3, panel B, lanes 5 and 7, as estimated from densitometry analysis). Addition of SDS prior to IAM alkylation, increased incubation

time before IAM addition or working in anaerobic conditions (in a glove box under nitrogen atmosphere) did not significantly increase the amount of covalent complex (gels not shown). The lower yield of MsrB/C35S Trx complex formation compared to that of MsrA/Trx remains to be explained. It is possible that the equilibrium of the reaction favors the MsrB_{ox} form and C35S Trx rather than the interdisulfide form. As shown on the SDS-PAGE profile, migrating bands with an apparent molecular weight higher than the MsrB/Trx complex were observed, (Fig. 3, panel B, lanes 5 and 7). The fact that 1) the use of higher MsrB concentration led to an increase of the covalent MsrB/Trx complex but also of these higher molecular species (gels not shown) and, 2) after DTT addition, only two bands corresponding to free MsrB and Trx were visualized (Fig. 3, panel B, lanes 6 and 8), indicated that these heavier forms, whose nature remains to be characterized, are by-products of the reaction linked by disulfide bonds.

Gel-filtration chromatography was used to separate free Msr, free Trx and Msr/Trx complexes (Fig. 4). Elution profile of the Msr/Trx complexes formed by the DTNB activation process served as reference to identify the peak corresponding to the Msr/Trx complexes. This was particularly useful to isolate the MsrB/Trx complex formed from MsrB_{ox}. Indeed, as mentioned above, it was formed in a small amount and in a mixture containing protein species with higher molecular weights. An aliquot of each collected fractions were analyzed on SDS-PAGE. The fractions whose migration profile was similar to that of the MsrB/Trx complexes obtained *via* the DTNB process were pooled (gels not shown). The molecular mass of the Msr/trx complexes was then determined by ESI-MS and the values were shown to be those expected (Table 1).

AspN digestion, MS analysis and identification of the Msr's Cys which is involved in the inter disulfide bond formation between Msr_{ox} and C35S Trx

Msr/Trx complexes formed between Msr_{ox} and C35S Trx were subjected to Asp-N digestion. The digestion products were then analyzed both by MALDI- and ESI-MS, in order to identify a) the Msr_{ox} Cys engaged in the interdisulfide bond with Trx C32 and, as an additional evidence, b) the Msr_{ox} Cys alkylated by IAM (see Fig. 5D for more details).

Proteolytic cleavage was done with Asp-N enzyme, which is known to cleave before aspartic acid. The choice of Asp-N instead of other proteases was based on the fact that the masses of the predicted generated peptides were expected to easily differentiate which Msr Cys would either be alkylated by IAM or engaged in the inter-disulfide bond with Trx. The so-generated peptides were first analyzed by MALDI-MS. For MsrA and MsrB complexes, very good sequence coverage was obtained for MsrA or MsrB and only one peptide with a +57 Da adduct was detected for each Msrs, indicating an IAM alkylation. The masses of 2766.3 Da and 2346.1 Da correspond to MsrA peptide 40-62 and MsrB peptide 60-80, respectively (see Table 1, and also the control experiments which are described in the last paragraph). These data were consistent with the IAM alkylation of MsrA C51 and MsrB C63 (Fig. 5 and Table 1). Consequently, this strongly supported the formation of a mixed disulfide bond between Trx C32 and, MsrA C198 and MsrB C117 respectively.

No Msr peptide linked to a Trx peptide *via* an inter disulfide bond and no Trx peptide was detected. Such results suggested that, under the experimental conditions used, Trx is resistant to Asp-N digestion. This assumption was confirmed by the fact that, under similar experimental conditions, Trx alone, which contains 11 aspartate residues, is not sensitive to proteolysis by Asp-N (data not shown). Therefore, to characterize the intermolecular disulfide bond formed in the Msr-Trx complex, it was necessary to analyze the Asp-N digests by ESI-MS. Masses of 13791.0 Da and 14111.8 Da were determined for MsrA and MsrB, respectively which correspond to intact Trx linked to peptide 188-205 *via* a disulfide bond between Trx C32 and MsrA C198 and to intact Trx linked to peptide 107-131 *via* a disulfide bond between Trx C32 and MsrB C117, respectively (see Table 1 and also the control experiments which are described in the last paragraph). Therefore, altogether the results demonstrate the formation of an intermolecular disulfide bond between Trx C32 and, MsrA C198 and MsrB C117. It should be also noted that for MsrA and MsrB, the Msr peptides linked to Trx still contain one aspartate residue. This miss-cleavage is likely due to steric hindrance caused by linked Trx that might decrease the accessibility of Asp-N to MsrA/B peptides.

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

An additional control was carried out to validate the MS data obtained above. For that, ESI-MS and MALDI-MS analyses after Asp-N digestion were done on the two MsrA/B / Trx complexes bound *via* intermolecular disulfide bond between Trx C32 and either the Msr catalytic or the recycling Cys and obtained from the DTNB activation process. As summarized in table 1, only the complexes bounded *via* Trx C32/MsrA C198 and Trx C32/MsrB C117 intermolecular disulfide bonds showed masses in agreement with the masses determined from the MsrA/B /Trx complexes formed with MsrA/B_{ox} (see preceding paragraph), i.e. 13791.1 and 2693.3³ for MsrA and, 14111.6 and 2273.1³ for MsrB. (see Table 1).

Discussion

In previous studies, it was shown that the recycling process of Msrs by Trx includes formation of a binary complex between Msr_{ox} and Trx_{red}, followed by a two-electron chemical exchange and then dissociation of the Msr_{red} / Trx_{ox} complex, the rate of which is rate-limiting in the overall Msr mechanism (10, 11, 19). The fact that a Msr_{ox}/Trx_{red} complex is formed and precedes the two-electron transfer indicated the existence of specific interactions between Msr_{ox} and Trx_{red}. To characterize these interactions by structural approaches, it is necessary to form a stable covalent complex, because the apparent low affinity between both partners (10, 11) precludes the isolation of a non covalent complex. In that context, a prerequisite is to know which Cys in the Msrs A and MsrB is involved in the formation of the transient interdisulfide bond with Trx C32.

Usually, the nature of the target Cys which forms the transient interdisulfide bond with C32 of Trx is predicted from kinetic criteria. Generally, an assumption that relies on Cys activation by DTNB considers the most reactive Cys after activation as the target Cys. The k_2 value is 1.4.10⁴ fold-higher for the activated C198 in C51S MsrA than for C51 in C198S MsrA. In contrast, no significant difference on the k_2 values –whose in both cases are low, see comments later in the Discussion – was observed between C63 in C117S MsrB and C117 in C63S MsrB. Therefore, while prediction of the nature of the target Cys in MsrA seems straightforward, this is not the case for MsrB.

Therefore, another method based on biochemical criteria and MS analyses was used. The approach is based on the formation of the

covalent intermolecular disulfide complex between Msr_{ox} and C35S Trx followed by its stabilization by IAM alkylation. This approach has the advantage of using Msr_{ox}, which is the Msr form recognized and reduced by Trx, instead of using a TNB-activated Msr. The MS analyses of peptides and peptide-Trx complexes clearly support a Trx recycling mechanism in which the recycling C198 in MsrA is involved in formation of the transient interdisulfide bond with Trx, whereas it is the catalytic C117 one in MsrB. These conclusions are based on the fact that 1) the Msr Cys engaged in the mixed disulfide bond with Trx C32 is shown by ESI-MS analyses to be the recycling C198 and the catalytic C117 for MsrA and MsrB, respectively and, 2) the Msr Cys alkylated by IAM is shown by MALDI-MS analyses to be the catalytic C51 in MsrA and the recycling C63 in MsrB.

As shown in the Results section, a lower yield of covalent complex between MsrB_{ox} and C35S Trx. Inspection of the X-ray structures of the reduced form of MsrA and MsrB in complex with a molecule that mimicks the substrate or a covalent intermediate shows a distance of ~ 8-13 Å between the catalytic C51 and the recycling C198 in MsrA and ~ 3 Å between the catalytic C117 and the recycling C63 in MsrB, respectively. The accumulation of the covalent C51S MsrA/C35S Trx complex in a high yield is probably the consequence of a shift of the equilibrium in favor of the covalent complex provoked by a flip of the interdisulfide bond MsrA C198-Trx C32 due to the location of C198 in a loop that would therefore prevent the reverse reaction to occur i.e. the formation of the MsrA_{ox} and C35S Trx. In contrast, both the low distance between C117 and C63 in MsrB and the location of C117 on a β-strand would permit the reverse reaction to occur i.e. the formation of MsrB_{ox}. The equilibrium is likely such that only 20% of the covalent MsrB/trx complex is formed. Such an interpretation is validated by the fact that a MsrA with a recycling Cys located on an α-helix at position 54 and therefore close to C51 (as it is the case for the MsrA from *Bacillus subtilis*) gives low yield of MsrA/C35S Trx covalent complex similar to that observed with MsrB (Antoine, unpublished results) and under the same experimental conditions that gave high yield with MsrA with a recycling Cys at position 198.

For both mutated MsrAs, the apparent affinity values of the TNB-activated form for C35S

Trx are in the mM range and are similar to those determined from previous kinetic studies carried out on MsrA_{ox} (10, 21). The first-order rate constant of TNB⁻ released from the MsrA C198/Trx C32 complex is however $2.4 \cdot 10^4$ fold-higher than that from the MsrA C51/Trx C32 complex. Inspection of the active site of MsrA either with a dimethyl arsenate adduct (12) or in complex with a Met residue (14) shows an active site located on the surface and accessible, in particular the two Cys residues, C51 and C198. It is in agreement with the fact that C51 and C198 are highly reactive towards a second-order Cys kinetic probe as 2,2'-dipyridyldisulfide (Antoine, unpublished results). Thus, it is reasonable to expect that the catalytic and recycling Cys under disulfide state are also accessible. Therefore, the choice of the Trx target Cys in MsrA_{ox} is likely governed by the positioning of the Trx C32 relative to that of the disulfide bond within the binary complex, which favours kinetically the attack on only one of the two Cys. This is reinforced by recent data obtained with TNB-activated C198 MsrA and C32S Trx used instead of C35S Trx. In that case, a binary complex between the MsrA and C32S Trx is also formed with an apparent K_{Trx} constant for C32S Trx similar to that found for C35S Trx. But, the first order rate constant of TNB⁻ released upon formation of the complex is $6 \cdot 10^4$ fold lower when compared to MsrA C198/Trx C32 complex (Antoine, unpublished results). Such data support a non efficient positioning of the Trx C35 relative to that of the MsrA disulfide bond and are also in accord with the fact that Trx C35 is known to be less accessible and reactive than Trx C32 (22).

In the case of MsrB, no Trx-saturating concentration effect was observed when MsrB is activated by DTNB on either C117 or C63. Moreover, the second-order rate constant, k_2 , is very low i.e. $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, at least three orders of magnitude smaller than that of MsrA activated by DTNB on C198. This indicates that the presence of a TNB molecule on MsrB prevents formation of an efficient binary complex with Trx. Thus, the MsrB-TNB are not representative of the MsrB_{ox} form that interacts with Trx. This is supported by

previous kinetic studies which showed that the affinity constant of MsrB_{ox} for Trx is $440 \mu\text{M}$ and the rate constant of the disulfide exchange is 5.2 s^{-1} (11) that is three orders of magnitude higher than that of MsrB activated by DTNB on C117.

The present results show that the kinetic method based on DTNB activation should be handled with caution. Firstly, the kinetic k_2 value which is used as a probe of the reactivity of the Cys target includes a K_{Trx} contribution and therefore is not necessarily representative of the reactivity of the target Cys. Secondly, the presence of the TNB molecule covalently bound on the target can decrease accessibility and perturb the positioning of the target relative to the C32 of Trx. This is clearly the case for MsrB. In this context, the other method used in this study and relying on MS analysis appears to be more confident and of general application. It has also the advantage to form a Trx/target interdisulfide complex with the oxidized form of the target which is the form recognized and reduced by Trx.

The fact that it is the recycling Cys in MsrA which is involved in the intermolecular disulfide bond with Trx C32 whereas it is the catalytic one in MsrB, rules out any simplistic prediction of the Cys attacked by Trx C32. Indeed, the catalytic Cys of MsrA and MsrB has to strongly decrease its pK_a in order to efficiently attack the sulfoxide function of the substrate within the Michaelis complex (data to be published). Consequently, it is reasonable to postulate that the catalytic Cys within the Msr disulfide bond would be a better leaving group than the recycling one. Thus, if the Cys chemical reactivity is the major factor governing the nature of the transient interdisulfide bond formed with Trx C32, the recycling Cys will be the one involved. This is not the case for MsrB. Therefore, the three dimensional context within the binary complex, in particular the positioning of the Trx C32 relative to that of the Msr disulfide bonds is likely the major factor that governs the nature of the transient interdisulfide bond formed. In this context, determination of the 3D structure of covalent Msr/Trx complexes will be of interest.

References

1. Schoneich, C. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 111-119
2. Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N.B., and Levine, R.L. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 135-140
3. Moskovitz, J. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 213-219

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

4. Weissbach, H., Resnick, L., and Brot, N. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 203-212
5. Sharov, V. S., Ferrington, D. A., Squier, T. C., and Schoneich, C. (1999) *FEBS Lett.* **455**, 247-250
6. Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., and Stadtman, E. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14167-14172
7. Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., and Barras, F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48915-48920
8. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12016-12022
9. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908-35913
10. Antoine, M., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45352-45357
11. Olry, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *Biochemistry* **43**, 11616-11622
12. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure Fold. Des.* **8**, 1167-1178
13. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307-13312
14. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4119-4126
15. Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Matthews, B. W. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 348-352
16. Arner, E. S., and Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109
17. Budde, H., Flohe, L., Hofmann, B., and Nimtz, M. (2003) *Biol. Chem.* **384**, 1305-1309
18. Kim, S. K., Rahman, A., Mason, J. T., Hirasawa, M., Conover, R. C., Johnson, M. K., Miginiac-Maslow, M., Keryer, E., Knaff, D. B., Leustek, T. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* **1710**, 103-112
19. Trujillo, M., Mauri, P., Benazzi, L., Comini, M., De Palma, A., Flohe, L., Radi, R., Stehr, M., Singh, M., Ursini, F., Jaeger, T. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 20555-20566
20. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233-1244
21. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231-238
22. Kallis, G. B., and Holmgren, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 10261-10265

Footnotes

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Henri Poincaré, Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant ARC N° 4393), the Ministère délégué à la Recherche (ACI BCMS047) and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie. Guillaume Chevreux gratefully thanks the Centre National de la Recherche Scientifique and Sanofi-Aventis for financial support. We also thank Dr S. Sonkaria for the careful reading of the manuscript.

The abbreviations used are : MetSO, methionine sulfoxide ; Msr, MsrA, and MsrB, methionine sulfoxide reductase, methionine sulfoxide reductase A, methionine sulfoxide reductase B, respectively ; Msr_{ox} and Msr_{red}, oxidized and reduced Msr, respectively ; Trx, thioredoxin ; Trx_{ox} and Trx_{red}, oxidized and reduced Trx, respectively ; DTT, dithiothreitol ; SDS, sodium dodecyl sulphate ; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis ; DTNB, dithionitrobenzoate ; TNB⁻, thionitrobenzoate ; IAM, iodoacetamide ; ESI-MS and ESI-TOF, electrospray ionization-mass spectrometry and electrospray ionization-time of flight, respectively ; MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

¹: Oxidized MsrA/B means Msr form under disulfide state and is noted as Msr_{ox} in the manuscript. By homology, reduced Msr is noted Msr_{red}.

²: Trx from *N. meningitidis* displays similar kinetic efficiency in the reduction of MsrA/B_{ox} from *Neisseria meningitidis* than the *E. coli* Trx (data not shown). In the present study, the *E. coli* Trx was used because larger amount was available.

³: The MALDI-MS analyses show a mass difference of 73 Da between the Msr peptides containing the alkylated Cys and the equivalent Msr peptides containing a Ser instead of the Cys. Such a mass difference correspond to that expected between an IAM alkylated Cys and a Ser.

Tables

| | ESI-MS of complexes before digestion | | ESI-MS of complexes after digestion | | MALDI-MS of complexes after digestion (*) | |
|--|--------------------------------------|---------------|---|-------------------------------|---|----------------------------|
| | Theoretical mass | Measured mass | Theoretical mass | Measured mass | Theoretical mass | Measured mass |
| MsrA/C35S Trx after IAM alkylation (obtained with MsrA _{ox}) | 33610.7 | 33610.8 | Trx + ¹⁸⁸ DYLIKPNPGY ^C ₁₉₈ HIDIRKA ₂₀₅ | 13790.8 13791.0 | ⁴⁰ MNTRTIYLAGGC ^{Cam} ₅₁ FWGLEAYFQRI ₆₂ | 2766.3 2766.3 |
| MsrB/C35S Trx after IAM alkylation (obtained with MsrA _{ox}) | 28088.6 | 28089.4 | Trx + ⁴⁰ MNTRTIYLAGGC ^S ₅₁ FWGLEAYFQRI ₆₂ | 14368.5 14111.3 14111.8 | ¹⁸⁸ DYLIKPNPGY ^{Cam} ₁₉₈ HIDIRKA ₂₀₅ | 2206.4 2346.1 2346.1 |
| | | | Trx + ¹⁰⁷ DGPRDKGGLRY ^C ₁₁₇ INGASLKFIPLQ ^M ₁₃₁ | | ⁶⁰ DSGC ^{Cam} ₆₃ GWPSFTRPIAKSVTEH ₈₀ | |
| | | | Trx + ⁶⁰ DSGC ^S ₆₃ GWPSFTRPIAKSVTEH ₈₀ | 13947.9 | ¹⁰⁷ DGPRDKGGLRY ^{Cam} ₁₁₇ INGASLKFIPLQ ^M ₁₃₁ | 2952.5 |
| C198S MsrA/C35S Trx formed by DTNB activation | 33537.7 | 33537.7 | Trx + ⁴⁰ MNTRTIYLAGGC ^S ₅₁ FWGLEAYFQRI ₆₂ | 14368.5 14368.4 | ¹⁸⁸ DYLIKPNPGY ^S ₁₉₈ HIDIRKA ₂₀₅ | 2132.1 not identified |
| C51S MsrA/C35S Trx formed by DTNB activation | 33537.7 | 33538.0 | Trx + ¹⁸⁸ DYLIKPNPGY ^C ₁₉₈ HIDIRKA ₂₀₅ | 13790.8 13791.1 | ⁴⁰ MNTRTIYLAGGC ^S ₅₁ FWGLEAYFQRI ₆₂ | 2693.3 2693.3 |
| C117S MsrB/C35S Trx formed by DTNB activation | 28015.5 | 28015.7 | Trx + ⁶⁰ DSGC ^S ₆₃ GWPSFTRPIAKSVTEH ₈₀ | 13947.9 13948.1 | ¹⁰⁷ DGPRDKGGLRY ^S ₁₁₇ INGASLKFIPLQ ^M ₁₃₁ | 2436.3 2436.2 |
| C63S MsrB/C35S Trx formed by DTNB activation | 28015.5 | 28015.6 | Trx + ¹⁰⁷ DGPRDKGGLRY ^C ₁₁₇ INGASLKFIPLQ ^M ₁₃₁ | 14111.3 14111.6 | ⁶⁰ DSGC ^S ₆₃ GWPSFTRPIAKSVTEH ₈₀ | 2273.1 2273.1 |

Table 1: MS analysis of Msr/C35S Trx complexes before and after Asp-N digestion.

ESI and MALDI-MS data for Msr/C35S Trx complexes obtained *via* the DTNB activation procedure or from the Msr_{ox} form were determined as described under "Experimental procedures". Sequences of the predicted peptides generated after Asp-N digestion are indicated. Molecular masses are expressed in daltons. Msr and Trx sequences and schematic representation of the MS analyses are depicted in Fig. 5. ESI-MS analyses of the complexes before Asp-N proteolysis showed a mass difference of 73 Da between the Msr/C35S Trx alkylated complexes and complexes containing Cys to Ser substituted Msr. Such a mass difference correspond to that expected between an IAM alkylated Cys and a Ser. Cam abbreviation refers to amidified Cys after IAM addition.

*: For clarity, only the masses of Msr peptides containing an alkylated Cys or a substituted Ser are shown from the total MALDI-MS data.

Figures

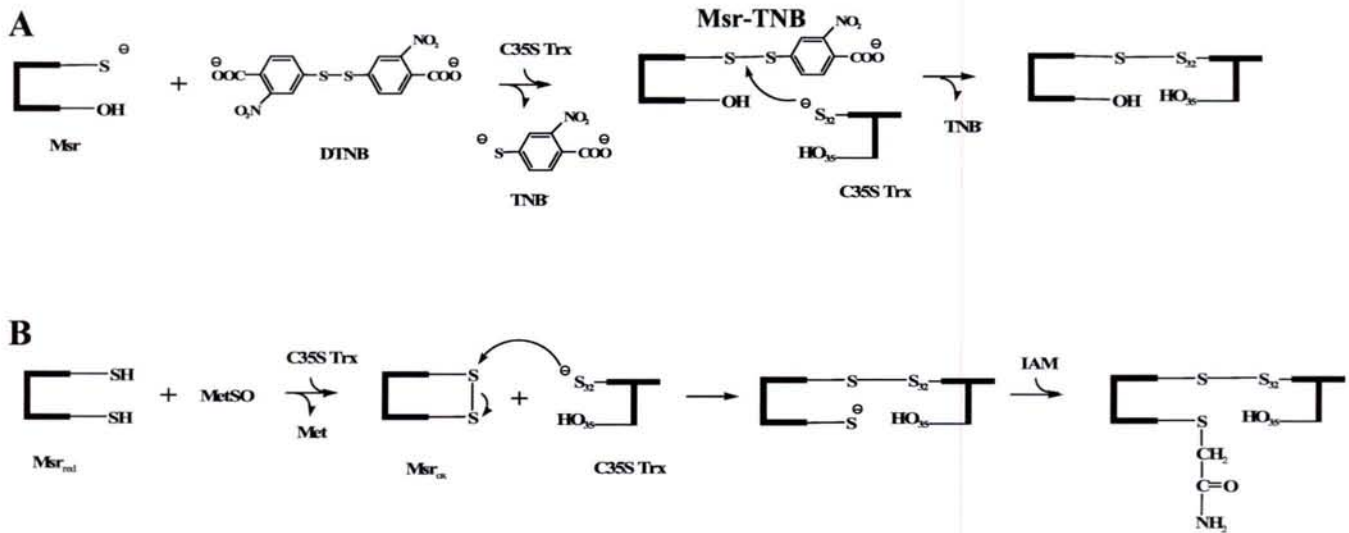


Fig. 1: Schematic representation of the formation of the Msr/C35S Trx complexes.

Panel A: Formation of the Msr/C35S Trx complexes *via* the DTNB activation procedure. The strategy consists of activating a singly Cys to Ser substituted Msr by DTNB. The resulting activated Msr is then reacting with C35S Trx.

Panel B: Formation of the Msr/C35S Trx complexes from the Msr_{ox}. The strategy consists of mixing Msr_{ox} and C35S Trx. The resulting complex is then chemically stabilized by addition of IAM which reacts with the Msr Cys not engaged in the interdisulfide bond.

For C35S Trx, S₃₂ and HO₃₅ refer to the sulfur of C32 and the hydroxyl of S35, respectively.

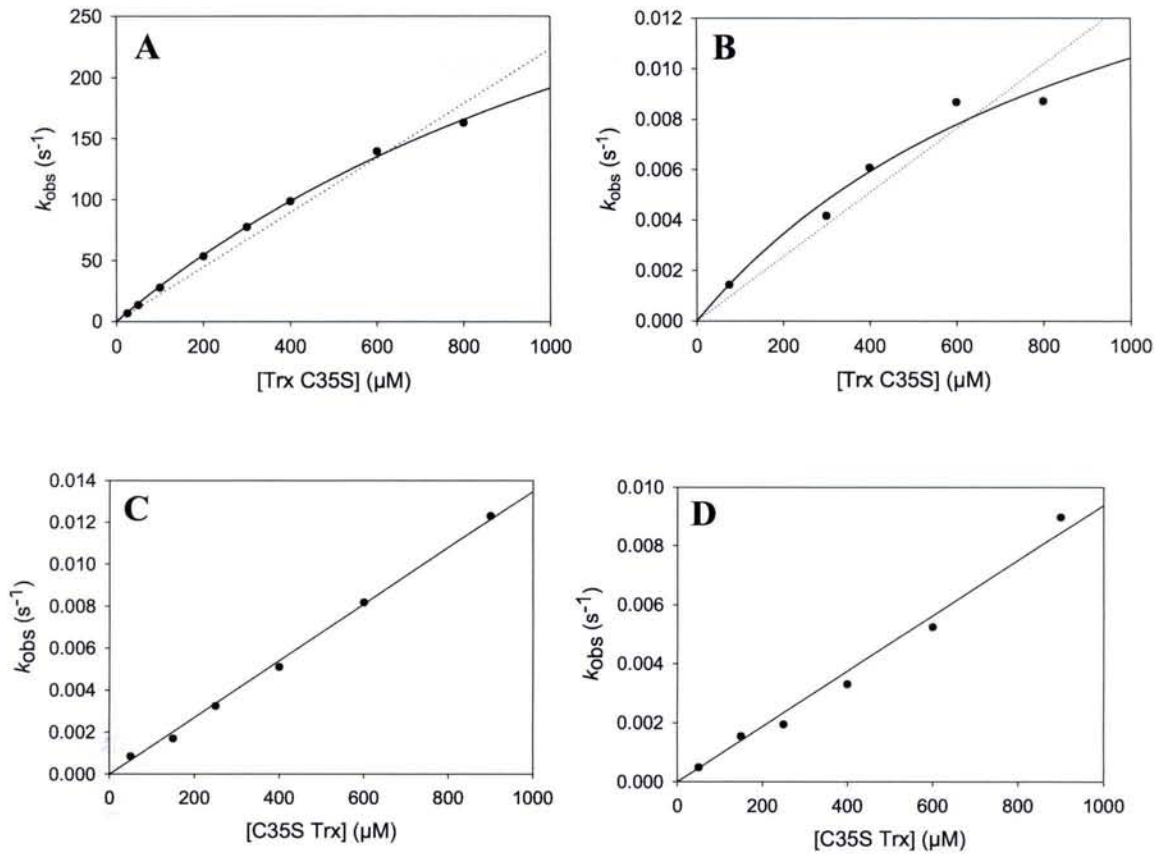


Fig. 2: Kinetics of formation of MsrA/C35S Trx and of MsrB/C35S Trx complexes with Msr activated by the DTNB procedure.

Panel A: Formation of C51S MsrA /C35S Trx complex; Panel B: Formation of C198S MsrA/C35S Trx complex. Panel C: Formation of C117S MsrB/C35S Trx complex; Panel D: Formation of C63S MsrB/C35S Trx complex.

For MsrA/C35S Trx complex formation, the best fit was clearly observed using Eq.2 (solid line) compared to linear regression analyses (dotted line). Fitting the data to Eq. 2 by least square regression gave $k_{obs\ max}$ and K_{Trx} constants of 510 and $2.1.10^{-2} s^{-1}$ and 1.7 and 1.0 mM for C51S MsrA/C35S Trx and C198S MsrA/C35S Trx complexes, respectively. For MsrB/C35S Trx complexes formation, data were fit to a linear relationship which gave k_2 constant of 13.5 and $9.4 M^{-1}.s^{-1}$ for C117S MsrB/C35S Trx and C63S MsrB/C35S Trx complexes, respectively. Experimental data are shown as symbols (●), best fit is shown as a solid line.

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

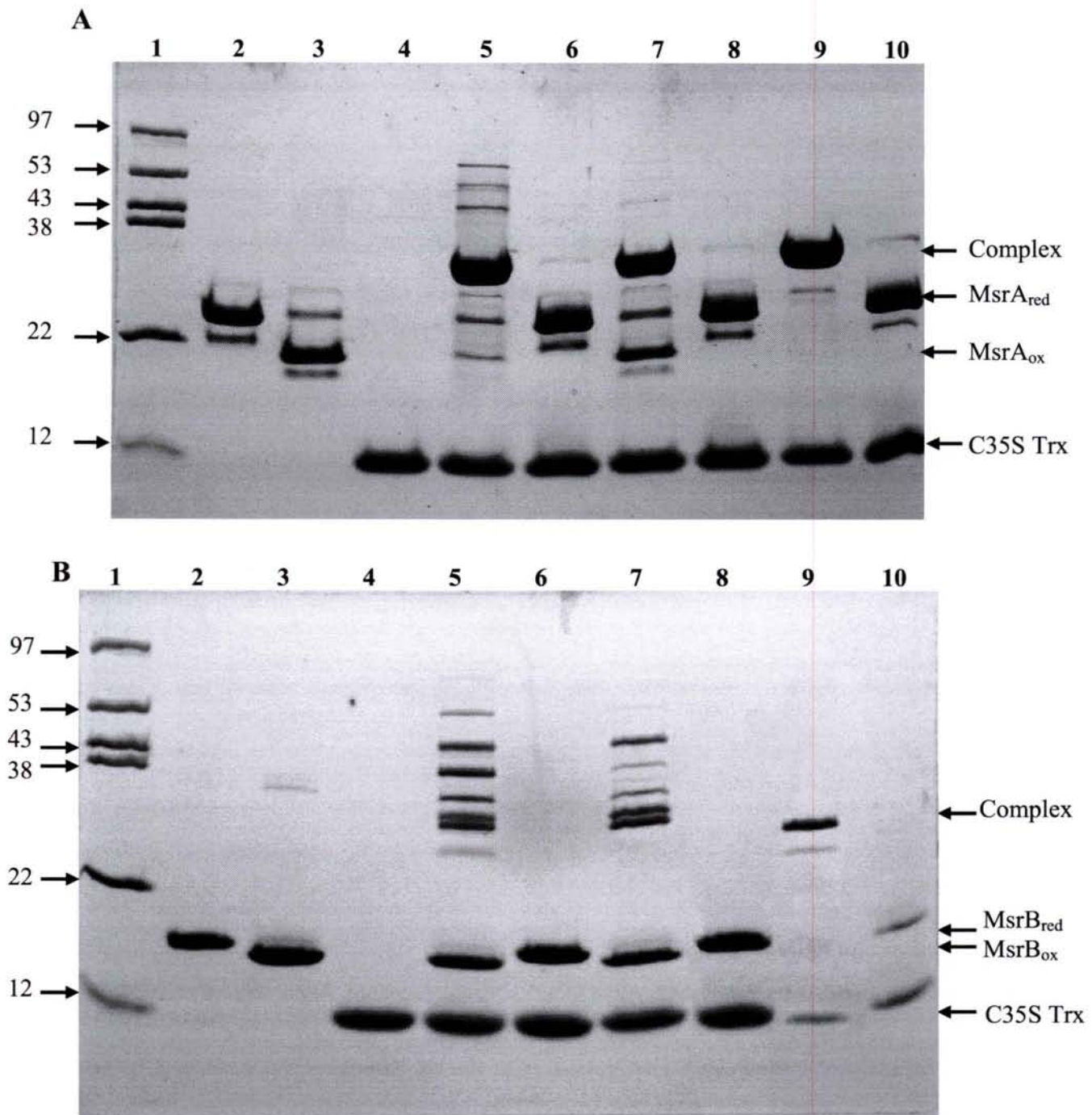


Fig. 3: SDS-PAGE analyses of MsrA/C35S Trx (A) and MsrB/C35S Trx (B) complexes.

Msr_{ox} (50 μ M) (lane 3) were incubated with a 3-fold excess of C35S Trx (lane 4) for 30 min (lane 5) and then alkylated with IAM (lane 7). Covalent Msr/Trx complexes obtained *via* DTNB activation of Msrs were used as references (lane 9). Samples in lanes 2, 6, 8 and 10 corresponded to samples 3, 5, 7 and 9, respectively, after incubation with 50 mM DTT. The positions at which reduced Msrs, Msr_{ox}, C35S Trx and Msr/Trx complexes migrate are indicated by arrows on the right. The position of the markers proteins (lane 1) are indicated on the left in kDa.

In each sample, the quantity of total proteins was 0.17 nmol of Msr and/or 0.5 nmol of Trx, except for the C63S MsrB/C35S Trx complex (panel B, lanes 9 and 10) where the quantity was 5 time smaller. The quantity of Msr/Trx complexes formed has been estimated by densitometry analyses and expressed as the percentage of Msr present in the complex relative to the total amount of Msr initially present.

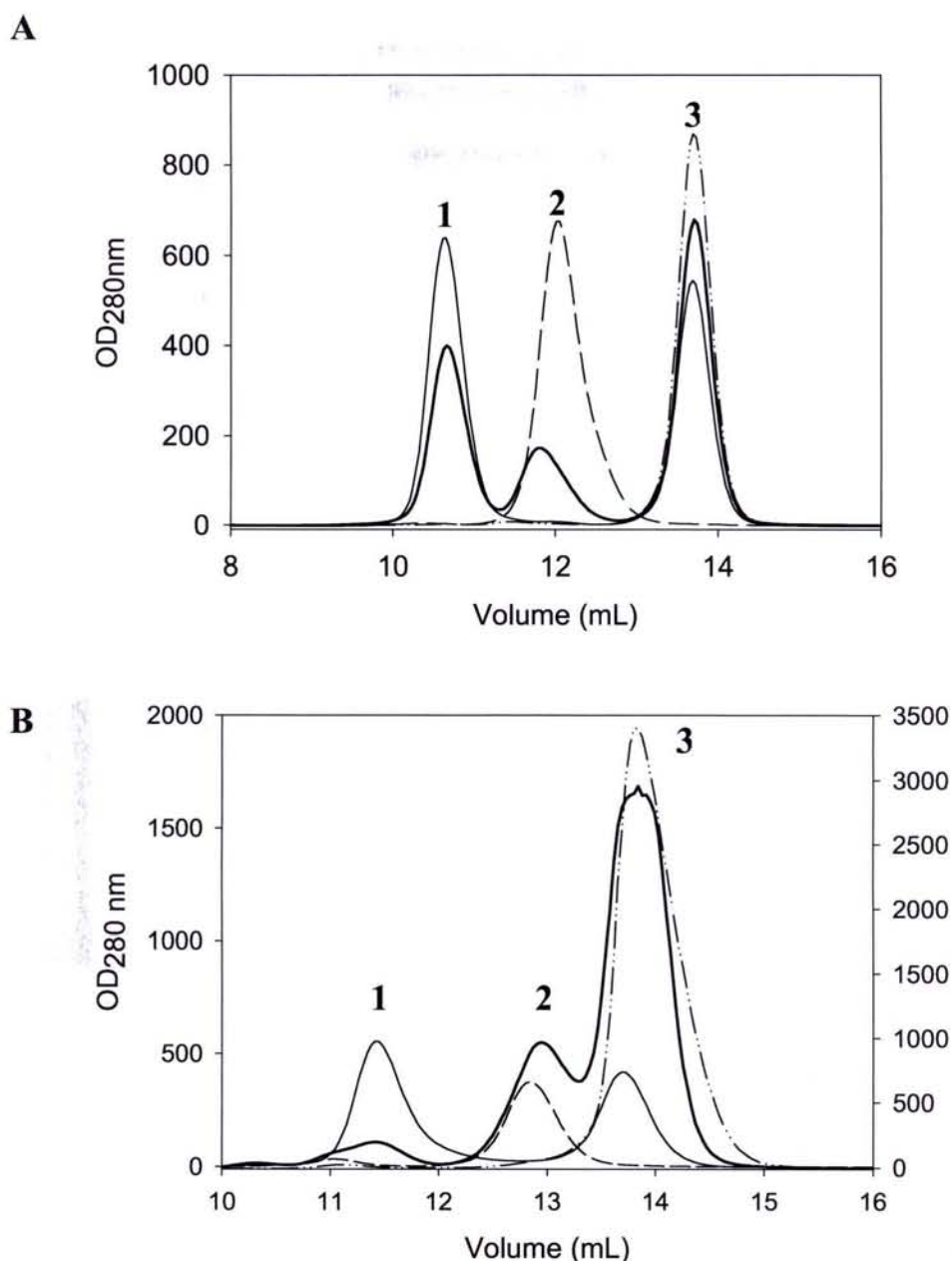


Fig. 4: Chromatographic elution profile at 280 nm of MsrA/C35S Trx (A) and MsrB/C35S Trx (B) complexes.

Reaction mixtures containing Msr/C35S Trx complexes formed from Msr_{ox} were loaded on a Superdex 75 gel-filtration column. Msr_{ox} (peak 2), C35S Trx (peak 3), and Cys to Ser substituted Msr/C35S Trx complexes (peak 1) with excess of Trx were used as references.

Panel A: Bold solid line: reaction mixture with MsrA ; thin solid line : C51S MsrA/C35S Trx complex with C35S Trx in excess; thin dashed line : MsrA_{ox}; thin dashed dotted line : C35S Trx.

Panel B: Bold solid line: reaction mixture with MsrB ; thin solid line : C63S MsrB/C35S Trx complex with C35S Trx in excess ; thin dashed line : MsrB_{ox}; thin dashed dotted line : C35S Trx. Right scale refers to MsrB/C35S Trx complex profile, left scale refers to the profile of the protein references.

Résultats : Etude de l'interaction MsrA/Trx

A)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110

E. coli MSLFDK KHLVSPADALPGRNTPMPVATLHAVNGHSMTNVPDGM EIAIFAMGCFWGVVERLFWQLPGVYSTAAGYTG GYTPNPTYREVCSGDTGHAEAVRIVYDPSVISYEQLLQVFWENH

N. meningitidis MNTRTIYLAGGCFWGLEAYFQRIDGVVDAVSGYANGTKNPSYEDVSYRHTGHAETVKVITYDADKLSLDDILQYFFRVV

MsrA 40-62 peptide

120 130 140 150 160 170 180 190 200 210

E. coli DPAQGM RQGNHDGTQYRS AIYPLTPEQDAAARASLERFQAAMLAADDDRHITTEIANATPFYYAEDDHQOYLHKNPYGYCGIGGIGVCLPPEA

N. meningitidis DPTSLNKQGN DTGTQYRSGVYYTDPAEKAVIAAALKREQQKYQLP-----

LVVENEPLKNFYDAEEYHQDYLIKPNNGYCHIDIRKAD EPLPGKTKTAPQGGFDAATYKKPSDAELKR

MsrA 188-205 peptide

B)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90

E. coli MANKPSAEELKKNLSEMQFYVTQNHGTEPPFTGRLLHNKR DGVYHCLICDAPLFHSQTKYDSGCGWPSFYEPVSEESIRYIKDLSHGMQR IEIRCGNCDA

N. meningitidis MTYKKPSDAELKRTLTEEQYQVTQNSATEYAFSHEYDHLFKPGIYVDVVSGEPLFSSADKYDSGCGWPSFTRPIDAKSVTEHDDFSYNMR RTEVRSHAADS

MsrB 60-80 peptide

100 110 120 130

E. coli HLGHVFPDGPDPGPTG-ERYCVNSASLRFTDGENGEEING

N. meningitidis HLGHVFPDGPDPGPRDKGGLRYCINGASLKFIPL EQM DAAGYGALKSKVK

MsrB 107-131 peptide

C)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

E. coli MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIP TLLLLFKNGEVAATKVGALS KGLKEFLDANLA

Discussion
Perspectives

Les études de biochimie et d'enzymologie menées au laboratoire sur les Msr de classe A et de classe B avaient démontré, avant que je ne débute mon projet de thèse, un mécanisme de réduction des sulfoxydes impliquant la chimie de l'acide sulfénique, la régénération de la cystéine catalytique se faisant *via* la formation d'un intermédiaire pont disulfure intramoléculaire réduit par la Trx (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002).

Les résultats présentés dans le cadre de mon mémoire ont permis 1) de montrer que dans le processus enzymatique à 3 étapes, l'étape cinétiquement limitante était associée au processus de régénération par la Trx, la vitesse de l'étape de formation du pont disulfure étant limitée par celle conduisant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, 2) de proposer un scénario original de l'étape réductase où le substrat sulfoxyde fortement polarisé dans le site actif participe à l'activation de la Cys catalytique et ; 3) d'identifier la cystéine impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire avec la Trx.

De ces résultats, découlent et restent posées de nombreuses questions sur 1) la nature de l'état de transition/intermédiaire de l'étape réductase et comment conduit-il à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, 2) la nature des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance du substrat MetSO par la MsrA et, de la MsrA_{ox} par la Trx et, 3) le mécanisme catalytique conduisant à la formation du pont disulfure intramoléculaire.

Ces différents points vont maintenant être discutés en intégrant les données structurales et les résultats de chimie théorique obtenus en collaboration avec l'équipe de Biocristallographie dirigée par le Dr. A. Aubry (UMR 7036 CNRS-UHP), l'équipe Biostructures dirigée par le Dr. M.T. Cung (UMR 7568 CNRS-INPL) et, l'équipe de Chimie et Biochimie Théorique dirigée par le Dr. M. Ruiz-Lopez (UMR 7565 CNRS-UHP).

Partie I : Formation de l'intermédiaire acide sulfénique

Les résultats obtenus en combinant l'utilisation de techniques de cinétiques rapides et de mutagenèse dirigée et en s'appuyant sur les données structurales disponibles au début et au cours de ma thèse sont en faveur d'un mécanisme avec 1) une attaque de la Cys51, activée par la fixation du substrat, sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde protonée et, 2) la formation d'un intermédiaire/état de transition de type sulfurane, le résidu Glu94 jouant probablement un rôle essentiel dans l'activation de la Cys51 et la stabilisation de l'état de transition, les résidus Tyr82 et 134 étant également impliqués.

Lors de la formation du complexe MsrA/MetSO, le pK_{app} de la fonction thiol de la Cys51 passe d'une valeur de 9,5 dans l'enzyme libre à 5,7. Cette activation de la Cys51 requiert la stabilisation du thiolate lors de la formation du complexe michaélien. La stabilisation d'un thiolate au sein d'un site actif est souvent assurée par la formation d'une paire d'ions avec une charge positive pouvant provenir du noyau imidazole d'une His, du groupement guanidino d'une Arg, ou encore d'un cofacteur fixé à proximité comme par exemple NAD ou NADP. Les dipôles générés par les liaisons peptidiques ou par une hélice α peuvent également être impliqués. Enfin, la formation d'un thiolate peut être favorisée par une base comme un glutamate, éventuellement *via* une molécule d'eau. L'examen des structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, *B. taurus* et *M. tuberculosis* ne révèle pas la présence de chaînes latérales chargées positivement, à proximité de la Cys51 catalytique. L'examen de la structure d'un complexe non covalent entre le substrat AcMetSONHMe et le variant inactif C51S de la MsrA de *N. meningitidis*, résolue récemment (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle), confirme cette constatation. Bien que la Cys51 soit positionnée à l'extrémité N-terminale d'une hélice α , son pK_a reste élevé dans la forme libre. Par ailleurs, nos résultats montrent l'implication des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans le mécanisme d'activation du thiol de la Cys51. En effet, le remplacement de ces résidus entraîne une augmentation du pK_a du thiol, qui passe de 5,7 dans le complexe enzyme sauvage/substrat à 9,5 lorsque les trois résidus sont substitués, une valeur comparable à celle du pK_a du même thiol dans l'enzyme libre. Les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 semblent donc impliqués, de façon directe ou indirecte, dans la stabilisation de la forme thiolate de la Cys51 dans le complexe MsrA/AcMetSONHMe. Une interaction directe entre les chaînes latérales des résidus Cys51 et Glu94 *via* l'établissement d'une paire Cys-S⁻/Glu-COOH semble cependant exclue aussi bien dans l'enzyme libre que dans le complexe C51S MsrA/AcMetSONHMe. En effet, l'examen des structures du site actif de la MsrA sous forme réduite récemment obtenues par RMN pour la MsrA d'*E. coli* (Coudeville *et al.*, Annexe 3, page 180) et par radiocristallographie pour la MsrA de *N. meningitidis* (M. Ranaivoson et F. Tête Favier, communication personnelle) montre une distance entre la fonction carboxylate du Glu94 et la fonction thiol de la Cys51 d'au moins 4,4 Å, trop importante pour permettre une interaction, même en prenant en compte la flexibilité observée par RMN de ses deux chaînes latérales. De plus, l'examen de la structure du complexe inactif MsrA/AcMetSONHMe résolue par radiocristallographie montre, d'une part, que la distance de 4,5 Å entre la fonction carboxylate du Glu94 et la position qu'occuperait l'atome de soufre de la fonction thiol de la Cys51 dans l'enzyme sauvage est aussi trop grande et, d'autre part, que le soufre de la fonction sulfoxyde

vient se placer entre l'un des deux oxygènes de la fonction carboxylate du Glu94 et la position qu'occuperait la fonction thiol de la Cys51. Un tel positionnement du substrat, en particulier de sa fonction sulfoxyde, exclut toute interaction directe entre les chaînes latérales du Glu94 et de la Cys51 (Figure 60). Sur la base de ces données, un mécanisme impliquant la déprotonation du thiol de la Cys51 par le Glu94 peut être écarté. L'implication directe des deux résidus Tyr peut également être exclue. En effet, les distances entre les oxygènes des résidus Tyr82 et Tyr134 et le soufre du résidu Cys51 dans la structure tridimensionnelle de la MsrA libre, ou la position équivalente de l'oxygène de la Ser dans le complexe MsrA/MetSO, sont de l'ordre de 6 à 7 Å.

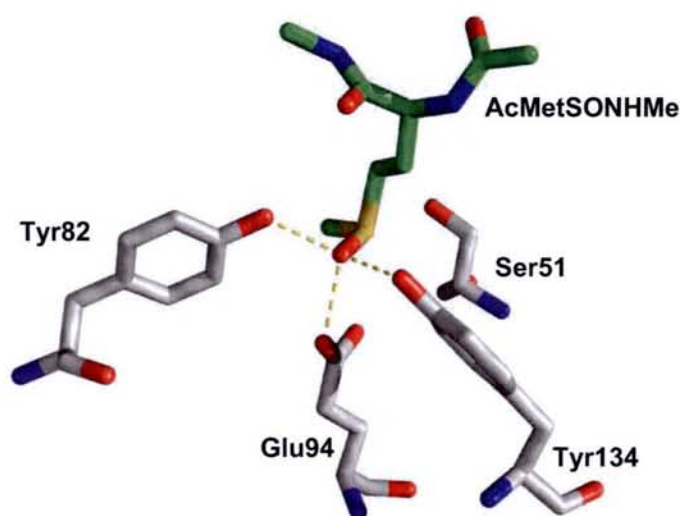


Figure 60 : Représentation schématique du complexe non covalent entre la MsrA C51S de *N. meningitidis* et le substrat synthétique AcMetSONHMe (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle). La fonction sulfoxyde du substrat se place entre la Ser51 et le Glu94.

Aussi, la présence de la fonction sulfoxyde semble être déterminante dans l'abaissement du pKa de la Cys51 de la MsrA. Des calculs de chimie quantique basés sur la théorie de la densité fonctionnelle (DFT) ont estimé les charges portées par la fonction sulfoxyde du DMSO à + 0,59 pour l'atome de soufre et -0,64 pour l'atome d'oxygène, dans le vide. La protonation de l'oxygène du sulfoxyde conduit à l'augmentation de la charge positive portée par le soufre adjacent, qui passe de + 0,59 à + 0,80, la charge de l'oxygène passant de -0,64 à -0,55 (charges de Mulliken ; Stener et Calligaris, 2000). Une autre approche de chimie quantique basée sur la théorie AIM a conclu à une charge de -1,20 portée par l'oxygène et de +1,20 portée par le soufre du DMSO (charges de Bader, Dobado *et al.*, 1999). Enfin, une étude associant des calculs de dynamique moléculaire et de chimie quantique *ab initio* a montré que la formation de trois liaisons H entre trois molécules d'eau et l'atome d'oxygène

de la fonction sulfoxyde est suffisante pour obtenir l'allongement maximal de la liaison S-O du DMSO dans un solvant aqueux, la longueur moyenne de la liaison passant de 1,492 Å à 1,513 Å (Mrazkova et Hobza, 2003, Calligaris, 2004). Aussi, est-il probable qu'au sein du site actif de la MsrA, la fixation du sulfoxyde avec l'établissement de trois liaisons H entre l'oxygène du substrat et les chaînes latérales de Glu94, Tyr82 et Tyr134 favorise aussi la polarisation de la liaison soufre-oxygène avec le développement d'une charge partielle positive sur l'atome de soufre, *via* la délocalisation des électrons vers les orbitales non liantes de l'oxygène (Mrazkova et Hobza, 2003). Enfin, l'examen de la structure du complexe MsrA C51S/AcMetSONHMe montre que le soufre de la fonction sulfoxyde se trouve à une distance de 3,3 Å par rapport à la position occupée dans l'enzyme sauvage par la fonction thiol de la Cys51 (Figure 60). La proximité des deux atomes de soufre est également observée dans le complexe MsrA *M. tuberculosis*/Met. Aussi, notre hypothèse est que l'activation de la Cys51 se fasse *via* la fonction sulfoxyde du substrat, la charge positive partielle portée par le soufre de la fonction sulfoxyde stabilisant la forme thiolate de la Cys51.

L'ensemble des données expérimentales présentées ci-dessus est donc en faveur d'un mécanisme d'activation de la Cys51 assistée par la fixation du substrat, la fonction sulfoxyde étant fortement polarisée via des interactions entre son oxygène et les chaînes latérales de Glu94, Tyr82 et Tyr134. De plus, la courte distance de 2,5 Å mesurée dans le complexe inactif MsrA/AcMetSONHMe entre l'un des oxygènes de Glu94 et l'oxygène du sulfoxyde est en faveur d'une forte liaison H entre ces deux atomes, ce qui pourrait suggérer que la fonction sulfoxyde soit protonée et stabilisée par la forme carboxylate du Glu94. Dans le contexte du site actif de MsrA, il est vraisemblable que ce mécanisme soit concerté, la déprotonation du thiol étant concomitante à la protonation du sulfoxyde. La contribution des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans la catalyse de l'étape de réduction de la MetSO a été clairement mise en évidence par la caractérisation cinétique de plusieurs variants protéiques de ces positions. En particulier, le rôle majeur du Glu 94 a été clairement démontré. L'observation que sa substitution par un résidu Gln ne conduise qu'à une faible diminution de la constante $k_{\text{sulfoxyde}}$ suggère fortement que le résidu Glu94 ne jouerait pas un rôle de catalyseur acide/base, mais permettrait, sous forme carboxylate, de stabiliser l'état de transition. En prenant également en considération le fait que cette substitution conduise également à une forte augmentation du pKa de la Cys51 dans le complexe MsrA/MetSO, l'ensemble de ces résultats suggère que le Glu 94 peut jouer deux rôles : il stabiliserait d'un côté, la forme OH du sulfoxyde, indispensable pour la formation puis le réarrangement du sulfurane et de l'autre, la charge positive portée par le soufre de la fonction sulfoxyde,

permettant indirectement l'activation du thiol de la Cys51 *via* le substrat. En présence d'une Gln en position 94, la fonction amide pourrait stabiliser une forme moins polarisée du sulfoxyde, la charge positive partielle du soufre du sulfoxyde serait alors moindre, ce qui entraînerait l'augmentation du pKa du thiol de la Cys51 par rapport à celui de l'enzyme sauvage. Dans ce contexte, la résolution de la structure tridimensionnelle du complexe inactif MsrA C51S/E94Q/AcMetSONHMe pourrait se révéler informative, notamment au niveau du positionnement relatif de la chaîne latérale de la Gln par rapport à la fonction sulfoxyde.

Se pose alors la question du devenir du proton cédé par la fonction thiol de la Cys51 et de la provenance du proton porté par la fonction sulfoxyde. Il est raisonnable de postuler que le proton de la fonction thiol soit transféré à la fonction sulfoxyde. Comme discuté précédemment, les données structurales disponibles ne sont pas en faveur d'un rôle direct de Glu94. L'implication d'une molécule d'eau relais entre la fonction thiol et la fonction carboxylate est difficilement envisageable sur la base des données structurales, qui ne montrent pas de molécule d'eau en position adéquate. Une possibilité, que l'on ne peut pas exclure, est l'implication du doublet libre de l'atome de soufre dans le transfert du proton, la géométrie du sulfoxyde dans le complexe montrant une orientation du doublet vers le thiol de la Cys51.

Reste posée la question du chemin réactionnel conduisant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, de géométrie tétraédrique, à partir d'un sulfoxyde, lui aussi de géométrie tétraédrique. Trois mécanismes peuvent être proposés : 1) un mécanisme passant par la formation d'un intermédiaire ou état de transition de type sulfurane (Wallace et Mahon, 1964) suivie d'un réarrangement conduisant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique avait été proposé par notre équipe (Boschi-Muller *et al.*, 2000), 2) un mécanisme alternatif passant toujours par un sulfurane dans lequel une molécule d'eau activée dans le site actif viendrait attaquer le soufre de la Cys51 du sulfurane peut également être avancé (Balta *et al.*, Annexe 1, page 167) (Figure 61) et, 3) une dernière possibilité consiste en une attaque directe de la Cys51 sur l'oxygène de la fonction sulfoxyde.

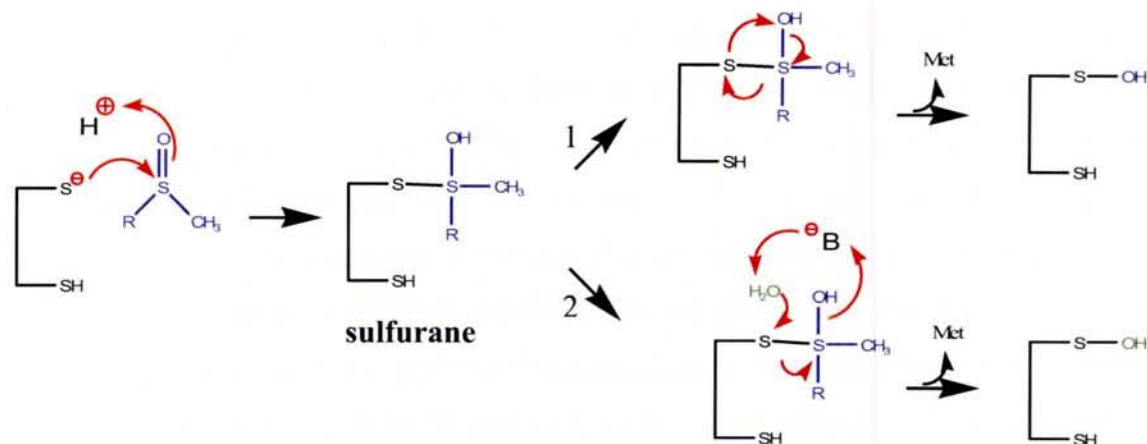


Figure 61 : Schéma des deux mécanismes envisageables pour la formation de l'intermédiaire acide sulfénique à partir du sulfurane. Dans le mécanisme 1, un réarrangement direct du sulfurane est proposé. Dans le mécanisme 2, une molécule d'eau supplémentaire intervient, attaquant le soufre de la Cys51 du sulfurane, la molécule d'eau devant être activée par un catalyseur basique noté B.

D'où le travail de collaboration que nous avons entrepris d'une part avec l'équipe du Dr. M. Ruiz-Lopez à Nancy (UMR 7565 CNRS-UHP) à l'aide des méthodes de la chimie quantique et de la modélisation moléculaire en vue de décrire en particulier la nature de(s) état(s) de transition/intermédiaire(s) formé(s), et d'autre part avec l'équipe du Dr A. Van Dorsselaer à Strasbourg (UMR 7509 CNRS-ULP) et le Dr J. Bodiguel à Nancy (UMR 7568 CNRS-INPL) en vue de caractériser la provenance de l'oxygène de l'intermédiaire acide sulfénique (voir partie II des résultats).

Dans une première approche, une étude théorique d'une réaction modèle de réduction du DMSO par le méthanethiol a été entreprise et a montré l'existence d'un mécanisme à deux étapes (Balta *et al.*, Annexe 1, page 167): 1) l'ionisation du système par transfert de proton du thiol vers le DMSO et la formation d'un intermédiaire de type sulfurane de géométrie bipyramide trigonale et ; 2) la décomposition du sulfurane, favorisée par une catalyse acide assistée par les thiols en solution, pour former, soit un acide sulfénique, soit un disulfure, celui-ci étant thermodynamiquement plus stable. Les énergies d'activation de ces deux étapes sont similaires, proches de 20 kcal/mol (Fig. 62).

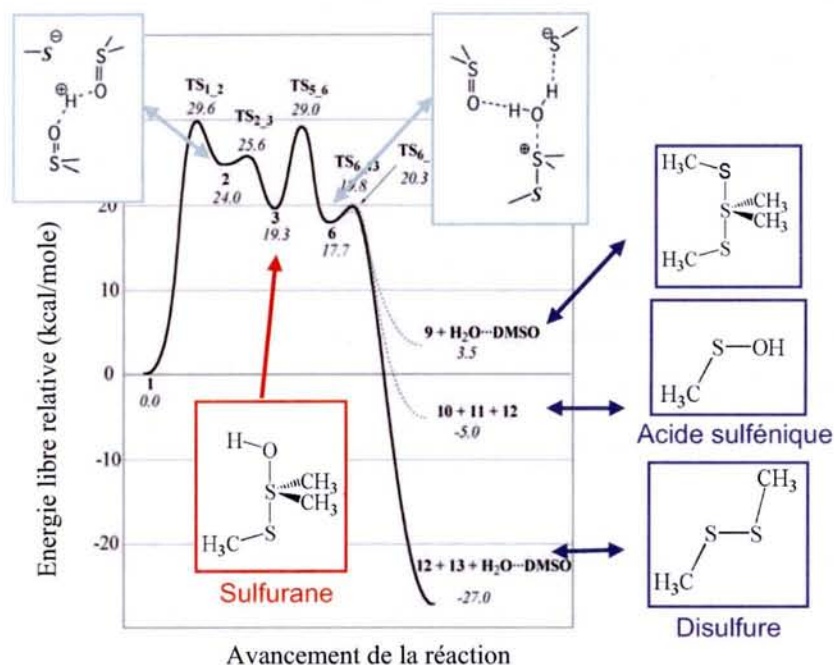


Figure 62 : Profil énergétique de la réduction du DMSO par le méthanethiol. La variation de l'énergie libre du système est représentée en fonction de l'avancement de la réaction (d'après Balta *et al.*, 2006).

Cette étude a également montré qu'en solution, la possibilité d'un transfert direct de l'atome d'oxygène du sulfoxyde sur l'atome de soufre de la fonction thiol, sans passer par un sulfurane, est très défavorable d'un point de vue énergétique par rapport au mécanisme passant par la formation d'un sulfurane ($\Delta E = 46,3$ kcal/mole contre $\Delta E = 20,4$ kcal/mole). Ceci est renforcé par l'examen de la structure du complexe MsrA C51S/AcMetSONHMe qui montre que la géométrie et le positionnement relatif de la fonction sulfoxyde par rapport au groupement thiol de la Cys51 dans le site actif de la MsrA ne sont pas compatibles avec un tel mécanisme de transfert direct (Figure 60). Les résultats de chimie théorique et l'inspection des structures 3D disponibles sont donc en faveur d'un chemin réactionnel passant par la formation d'un sulfurane, mais ne préjugent cependant en rien du mécanisme conduisant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique au sein du site actif de la MsrA. Deux mécanismes passant par un sulfurane sont donc envisageables, soit *via* un réarrangement, soit *via* l'addition d'une molécule d'eau (Figure 61). L'utilisation de substrat ou d' H_2O marqué à l' O^{18} a permis de montrer que l'oxygène de l'intermédiaire acide sulfénique peut être celui initialement présent sur le substrat sulfoxyde, suggérant que le mécanisme de réarrangement du sulfurane pourrait être celui privilégié dans le site actif de la MsrA.

Reste à définir comment l'intermédiaire acide sulfénique se forme dans le site actif de l'enzyme; passe-t-on par un intermédiaire sulfurane de géométrie bipyramide trigonale ou a-t-on un seul état de transition de géométrie bipyramide trigonale. De plus, comment passe-t-on

d'une géométrie bipyramide trigonale avec le thiol de C51 et le OH du sulfurane en position apicale à l'intermédiaire acide sulfénique de géométrie tétraédrique ? Les études de chimie théorique et expérimentale sur le modèle DMSO en solution suggèrent que le processus limitant la réaction globale est associé à l'ionisation du thiol et du sulfoxyde. Qu'en est-il dans le site actif, sachant que la fixation du substrat amène à une diminution de 4 unités du pK_{app} de Cys51 ? C'est pour répondre à ces questions que l'étude de l'étape réductase des MsrA, à partir des structures tridimensionnelles connues à ce jour, a été récemment entreprise par l'équipe du Dr M. Ruiz-Lopez (E. Thiriot et G. Monard) par des méthodes mixtes de chimie théorique de type QM/MM, compte tenu de la taille des systèmes enzymatiques à traiter.

Peut-on extrapoler les résultats cinétiques obtenus sur l'étape réductase de la MsrA de *N. meningitidis* et les interprétations qui en ont été données à la MsrB ? Comme déjà indiqué, le mécanisme catalytique de l'étape réductase de la MsrA et de la MsrB passe par le même intermédiaire acide sulfénique. Dans les MsrB, un résidu Glu équivalent au Glu94 des MsrA n'existe pas. Par contre, existe un résidu His103 invariant qui pourrait jouer un rôle équivalent au Glu94. Cependant, la forme catalytiquement active des MsrB est une forme thiolate/imidazolium présente dans le complexe MsrB/MetSO (Alexandre Olry et Fabrice Neiers, communication personnelle). A l'inverse de Glu94 dans les MsrA qui est postulé être toujours sous forme carboxylate, His103 doit être protonée pour que la MsrB soit active. Dans ce contexte, le mécanisme de l'étape réductase des MsrB impliquerait un transfert du proton de la Cys catalytique sur His103, indirect vu le positionnement relatif dans le site actif des deux résidus. Le proton pourrait être ensuite transféré sur la fonction sulfoxyde *via* un mécanisme concerté pour donner la forme protonée, cette forme étant stabilisée par d'autres interactions n'impliquant pas des résidus équivalents aux résidus Tyr82 et Tyr 134. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner en terme d'évolution que le mécanisme de l'étape réductase des deux classes de Msr, qui sont structurellement différentes, passe dans les deux cas par un intermédiaire acide sulfénique mais diffère par la nature des résidus participant à la catalyse.

La comparaison des mécanismes catalytiques de réduction d'un sulfoxyde par les Msr et les DMSO réductases met en évidence deux voies de réduction des sulfoxydes retenues au cours de l'évolution. La première voie est basée sur la réactivité des Cys, associée à la chimie de l'acide sulfénique ; c'est le cas des Msr. La deuxième voie est basée quant à elle sur l'utilisation des propriétés redox du cofacteur MGD et de l'atome de molybdène ; c'est le cas des DMSOR. Néanmoins, malgré ces différences, les deux mécanisme de réduction ont en

commun l'activation de la fonction sulfoxyde, soit *via* la protonation de l'oxygène de cette fonction comme chez les Msr, soit *via* sa coordination à un atome de Mo comme chez les DMSOR. Dans les deux cas, la fonction sulfoxyde du substrat fixé est fortement polarisée, facilitant ainsi le transfert de l'atome d'oxygène et la réduction de la fonction sulfoxyde.

Partie II : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance du substrat

L'examen des trois structures tridimensionnelles de MsrA disponibles (*E. coli*, *B. taurus* et *M. tuberculosis*) suggérait l'implication de trois sites de reconnaissance dans la fixation du substrat (voir partie Introduction page 76) : 1) une poche hydrophobe constituée des résidus invariants Phe52 et Trp53, 2) un site de reconnaissance de la chaîne principale du substrat constitué des résidus invariants Asp129 et Tyr197 et 3) une poche pour la fixation de l'oxygène de la fonction sulfoxyde constituée des résidus invariants Tyr82, Glu94 et Tyr134.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de montrer que les résidus Tyr82, Glu94 et Tyr134 n'interviennent pas dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde, la constante d'affinité $K_{\text{sulfoxyde}}$ mesurée à pH 8,0 n'étant pas modifiée par leur substitution par d'autres acides aminés. Concernant le rôle des résidus Trp53, Phe52, Asp129 et Tyr197, j'ai initié leur caractérisation *in vitro* par une approche de relations structure fonction. Cette étude est actuellement poursuivie au laboratoire par Adeline Gand qui est en deuxième année de thèse. Les résultats obtenus montrent que 1) la poche hydrophobe constituée de Phe52 et Trp53 joue un rôle majeur dans la fixation du substrat au niveau de son méthyle ϵ , 2) les résidus His186 et Tyr189 sont impliqués dans le positionnement du noyau indole du Trp53 *via* la formation d'une liaison H entre les noyaux imidazole et indole et une interaction hydrophobe π - π entre les noyaux phénol et indole et, 3) les résidus Tyr197 et Asp129 contribuent à la fixation de la chaîne principale du substrat *via* la formation d'une part d'une liaison H entre un atome d'oxygène de la fonction carboxylate du résidu Asp129 et le groupement NH de la chaîne principale du substrat, et d'autre part une interaction π - π entre le noyau phényl de la Tyr197 et la liaison peptidique entre la MetSO et le résidu du côté N-terminal. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un mode de fixation du substrat principalement basé sur la reconnaissance du groupement méthyle ϵ et la liaison peptidique entre la MetSO et le résidu du côté N-terminal (Figure 63).

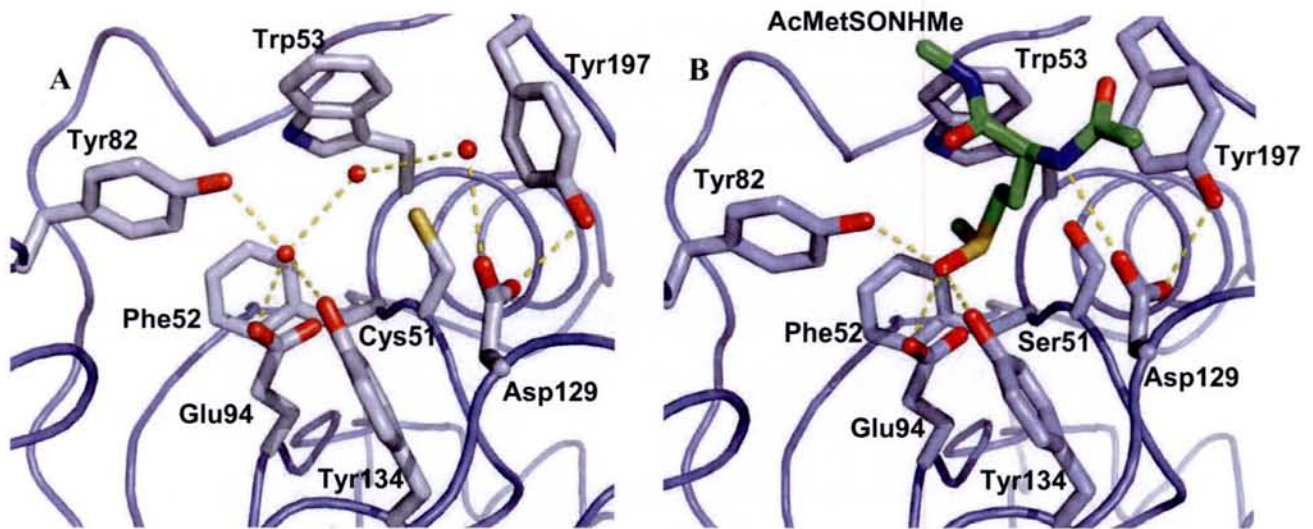


Figure 63 : Représentation de la structure du site actif de la MsrA réduite de type sauvage de *N. meningitidis* et du complexe non covalent entre la MsrA C51S de *N. meningitidis* et le substrat synthétique AcMetSONHMe. (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle). A) Site actif de la MsrA réduite, en absence de ligand, contenant trois molécules d'eau. B) Site actif du variant inactif C51S de la MsrA complexé avec une molécule d'AcMetSONHMe, représentée en vert. Les liaisons H possibles sont représentées en pointillés jaunes.

Reste posée la question de la meilleure affinité apparente observée pour AcMetSONHMe par rapport à la MetSO. L'ensemble des données structurales et enzymatiques actuellement disponibles suggère que cette meilleure affinité serait liée à l'absence de charge au niveau du groupement carboxylate de la MetSO. Par ailleurs, reste l'observation surprenante que la MsrA ne présente peu ou pas d'affinité pour la méthionine. En effet, le produit AcMetNHMe n'est pas un inhibiteur de l'étape réductase jusqu'à une concentration de 400 mM, montrant qu'il ne se fixe pas dans le site actif de la MsrA dans les gammes de concentration utilisées. Ceci suggère que la reconnaissance de l'oxygène de la fonction sulfoxyde serait un élément discriminant pour la fixation du substrat, ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus avec les variants des positions 82, 94 et 134 pour lesquels aucun effet significatif n'est observé sur la constante d'affinité. L'interprétation serait que le facteur discriminant MetSO et Met soit lié aux charges partielles différentes portées par le soufre de la Met et de la MetSO. En effet, le soufre de fonction sulfoxyde porte une charge partielle positive alors que dans la Met, la densité électronique du soufre est importante, pouvant conduire à une charge partielle négative.

Partie III : Formation de l'intermédiaire pont disulfure

Comme décrit précédemment, les études cinétiques réalisées ont montré que la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique limite celle de l'étape de formation du pont disulfure empêchant toute étude cinétique de l'étape de formation du pont disulfure. Néanmoins, vu que la vitesse associée à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique est rapide, la vitesse de l'étape de formation du pont disulfure doit elle aussi être rapide. Une telle efficacité cinétique implique qu'un catalyseur acide/base doit intervenir afin de déprotoner le thiol de la Cys198 et de faciliter le départ d' OH^- sous forme d'une molécule d'eau. Ce catalyseur reste à identifier.

La résolution récente de la structure tridimensionnelle de l'intermédiaire acide sulfénique de la MsrA de *N. meningitidis* (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle), après diffusion de DMSO dans des cristaux de la MsrA C198S montre une architecture du site actif non modifiée par rapport à la forme réduite, et l'absence d'interactions directes entre la fonction acide sulfénique et les chaînes latérales des résidus du site actif. Deux liaisons H semblent possibles avec deux molécules d'eau, dont une est stabilisée par liaison H avec les trois résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134. De plus, contrairement aux Npx, Nox ou Prx pour lesquelles l'intermédiaire acide sulfénique est stabilisé sous forme sulfénate *via* une interaction avec une charge positive, aucune charge positive n'est présente à proximité de l'acide sulfénique dans le site actif de la MsrA. Il semble donc que le site actif de la MsrA favorise plutôt la forme acide sulfénique que la forme sulfénate (Figure 64).

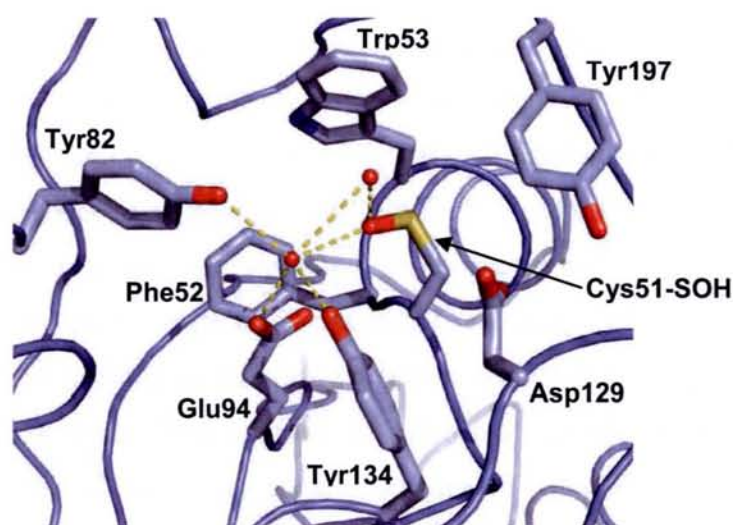


Figure 64 : Représentation du site actif de la MsrA C198S de *N. meningitidis* oxydée sous forme acide sulfénique (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle).

Il est vraisemblable que le proton du groupement thiol de la Cys de recyclage se retrouve sur la molécule d'eau éliminée à partir de l'acide sulfénique. L'examen des structures de MsrA disponibles à ce jour montre que la chaîne latérale de la Cys198 est mal positionnée pour attaquer l'atome de soufre de l'intermédiaire acide sulfénique, même dans la structure de la forme acide sulfénique. Dans toutes les structures, d'une part, la distance entre l'atome de soufre de la Cys51 et celui de la Cys198 est de l'ordre de 8 Å et d'autre part, la chaîne latérale de la Cys198 pointe à l'opposé du site actif. Cette orientation de la chaîne latérale de la Cys198 est contrainte par le positionnement de la chaîne latérale du résidu Tyr197. En effet, en absence de ligand fixé, la chaîne latérale de la Tyr197 établit une liaison H avec la chaîne latérale du résidu Asp129, cette interaction étant conservée dans le complexe enzyme/substrat. L'étude structurale et dynamique par RMN de la MsrA d'*E. coli*, réalisée par Nicolas Coudevylle et Dr. Mahn Tong Cung (Coudevylle *et al.*, Annexe 3, page 180), montre que la structure en solution de la MsrA réduite est très proche de la structure observée par RX de la MsrA réduite cristallisée, et que les chaînes polypeptidiques 123/132 et 195/204 présentent une certaine flexibilité. Cette flexibilité de l'extrémité C-terminale observée en solution n'est néanmoins pas d'amplitude suffisante pour permettre la formation du pont disulfure Cys51-Cys198.

L'inspection de la structure tridimensionnelle de l'intermédiaire acide sulfénique de la MsrA de *N. meningitidis* (Figure 64), montre que la chaîne principale 123/132 et la partie C-terminale contenant la Cys198 de recyclage n'ont pas subi de changement de conformation significatif par rapport aux structures de MsrA réduite ou complexée (Figure 65). Comment peut-on alors expliquer la formation du pont disulfure intramoléculaire ? Il est envisageable que la structure de l'extrémité C-terminale observée dans la forme acide sulfénique de la MsrA cristallisée ne soit pas représentative de sa structure en solution. Par exemple, des contraintes liées à l'empilement cristallin pourraient empêcher un changement conformationnel de l'extrémité C-terminale de la protéine. Cependant l'examen de l'empilement cristallin semble réfuter cette hypothèse. Le fait d'avoir utilisé du DMSO pourrait également être la cause de l'absence de réorganisation structurale. En effet, l'interaction entre Asp129 et le NH de la chaîne principale du substrat MetSO ne peut exister avec le DMSO. Il est possible que le départ de la Met qui doit se faire de façon concomitante ou consécutive à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique favorise le basculement de la chaîne polypeptidique 123-132, et donc la cassure de la liaison H entre Asp129 et Tyr197, ce que ne pourrait pas faire le diméthyle sulfure.

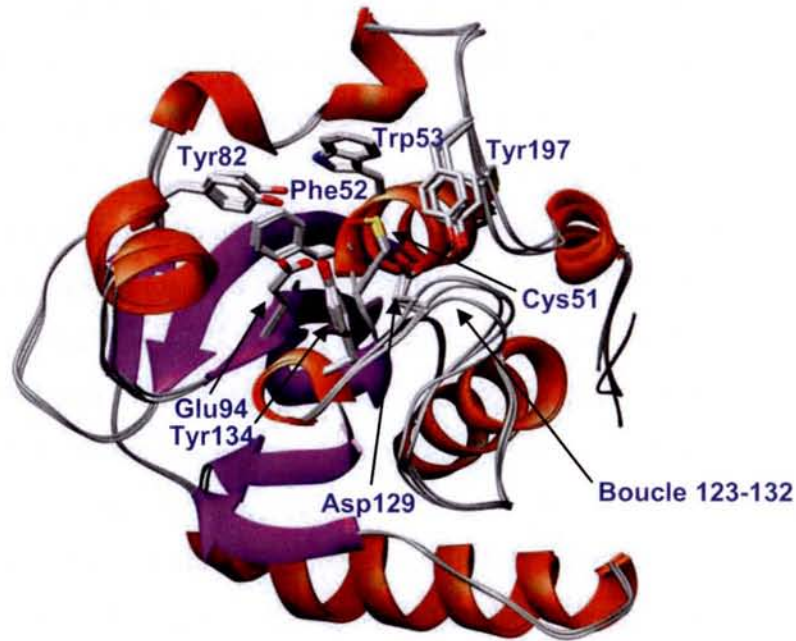


Figure 65 : Superposition des structures RX de la MsrA de *N. meningitidis* sous forme réduite, complexée avec le substrat AcMetSONHMe et oxydée sous forme acide sulfénique. Aucun changement conformationnel des chaînes polypeptidiques 123/132 et 195/204 n'est observé entre les trois structures. La superposition a été réalisée avec le logiciel Chimera. (M. Ranaivoson et F. Tête-Favier, communication personnelle).

Partie IV : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans l'interaction entre MsrA et Trx.

La Trx est une protéine ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus biologiques et qui réduit des ponts disulfures de cibles protéiques de structures très variées, dont les Msr. Peu d'informations sont actuellement disponibles concernant les interactions entre la Trx et ses cibles, et clairement, aucune signature d'acides aminés particulière n'est retrouvée. Les études d'enzymologie sur la MsrA de *N. meningitidis* présentées dans la partie Résultats ont montré que le processus global cinétiquement limitant de la réaction est associé à la dissociation entre la Trx_{ox} et la MsrA_{red} et non au processus de transfert de deux électrons de la Trx_{red} vers la MsrA_{ox}. De plus, le fait que : 1) l'étape cinétiquement limitante soit associée au relargage de la Trx_{ox} pour les différentes sous-classes de MsrA et de MsrB dépendantes de la Trx et, 2) la Trx réduise efficacement les ponts disulfures de différentes sous-classes de MsrA et de MsrB, localisés dans des environnements protéiques différents, suggère qu'il doit exister une reconnaissance spécifique mais très localisée entre les Msr_{ox} et la Trx_{red}.

Différentes approches peuvent être utilisées afin d'obtenir des informations structurales relatives à l'interaction MsrA_{ox}/Trx_{réd} : d'une part, la résolution de la structure tridimensionnelle de la forme oxydée de la MsrA, dans le but de l'utiliser pour des calculs de docking avec la Trx_{réd}, d'autre part, la résolution de la structure tridimensionnelle d'un complexe covalent entre la MsrA et la Trx.

L'obtention récente de la structure tridimensionnelle de la forme oxydée sous forme pont disulfure Cys51/Cys198 des MsrA C86S/C206S d'*E. coli* et sauvage de *N. meningitidis*, respectivement par RMN par N. Coudeville et Dr. M. T. Cung (Coudeville *et al.* Annexe 3, page 180) et par radiocristallographie par B. Kauffmann et F. Tête-Favier (communication personnelle) (Figure 66) montre un basculement vers le solvant de la chaîne polypeptidique 123/132, contenant notamment le résidu Asp129, avec la rupture de la liaison H entre l'Asp129 et la Tyr197 (Figure 66). Ces informations structurales, combinées à celles obtenues sur les formes libres et complexées suggèrent que ces changements conformationnels ont lieu de façon concomitante à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique et de la Met ou lors du relargage de la Met.

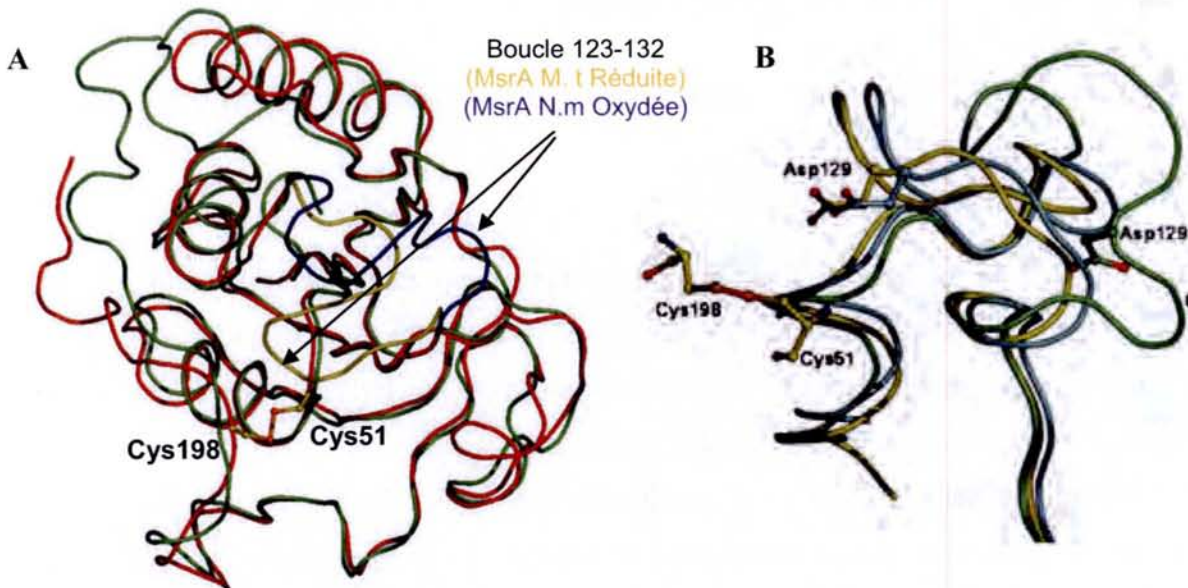


Figure 66 : Mise en évidence du changement de conformation de la boucle 123-132 accompagnant la formation du pont disulfure Cys51/Cys198 dans la MsrA de *N. meningitidis*. A) Superposition des structures cristallographiques de la forme réduite (vert) et oxydée (rouge), respectivement des MsrA de *M. tuberculosis* et *N. meningitidis*. B) Structure de la boucle 123-132 : superposition des structures des MsrA réduites d'*E. coli* (jaune) et *M. tuberculosis* (bleu) et de la MsrA oxydée de *N. meningitidis* (vert) (B. Kauffmann et F. Tête-Favier, communication personnelle).

Le changement de conformation de la chaîne polypeptidique 123-132 a pour conséquence d'exposer la surface à caractère hydrophobe du site actif et ainsi permettre éventuellement l'établissement d'interactions hydrophobes avec la Trx lors de l'étape de régénération de l'activité réductase (Figure 67). Ceci est en accord avec les propositions faites par de nombreux auteurs suggérant que le site actif de la Trx présente lui aussi une large surface hydrophobe, qui jouerait un rôle important lors de l'interaction avec ses partenaires (Eklund *et al.*, 1984 ; Himawan et Richardson, 1996).

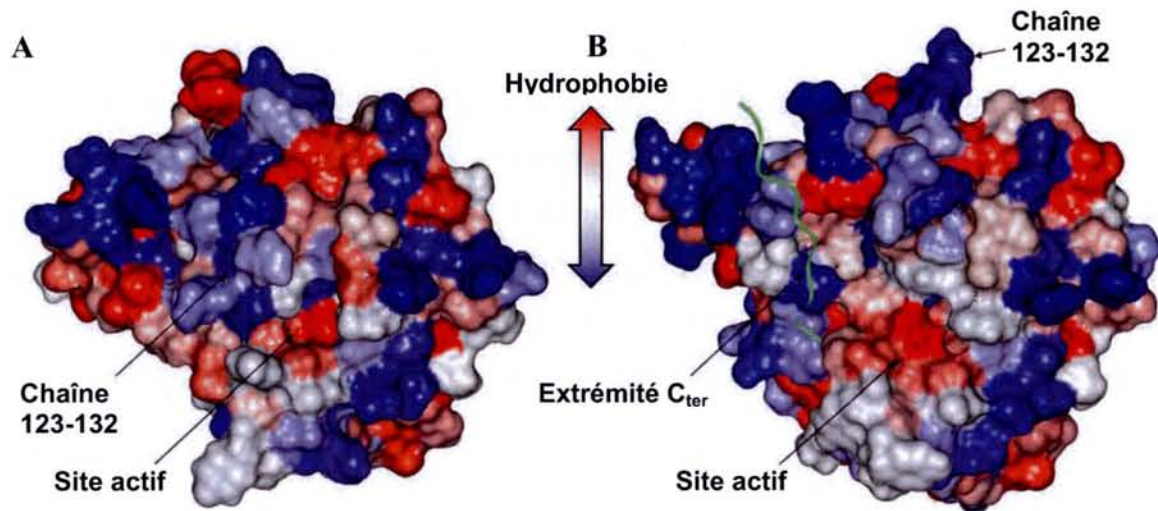


Figure 67 : Mise en évidence de la modification de la surface moléculaire consécutive à la formation du pont disulfure Cys51-Cys198 au sein du site actif de la MsrA C86S/C206S d'*E. coli*. La surface moléculaire est colorée en fonction de l'hydrophobie des chaînes latérales la composant. A) Surface de la MsrA réduite. B) Surface de la MsrA oxydée à l'état pont disulfure Cys51-Cys198. (D'après Coudeville *et al.*, Annexe 3).

De plus, dans le cas des MsrA à deux cystéine de recyclage (telle que la MsrA d'*E. coli*), l'exposition de la surface hydrophobe du site actif pourrait favoriser la formation du pont disulfure 198/206 de l'extrémité C-terminale, cette dernière possédant un fort caractère hydrophobe dû à la présence de nombreux résidus hydrophobes (Ile200, Ile203, Val205 et Leu207). Une telle hypothèse est confortée par les mouvements d'une amplitude beaucoup plus importante observés pour cette partie C-terminale dans la forme oxydée 51/198 par rapport à la forme réduite (voir papier Coudeville *et al.* Annexe 3, page 180).

Compte tenu de la faible affinité entre les deux partenaires, et en vue de caractériser les interactions entre la MsrA_{ox} et la Trx_{red}, seule la caractérisation structurale d'un intermédiaire covalent stable Msr/Trx était envisageable soit par RX ou par RMN. En effet, l'utilisation des techniques biophysicochimiques, comme la microcalorimétrie (ITC) et la résonance plasmonique de surface, n'a pas permis de déterminer les paramètres thermodynamiques et

cinétiques de l'association, sans doute à cause des faibles affinités existantes entre les partenaires. Un préalable à la caractérisation structurale d'un intermédiaire covalent stable Msr/Trx était de connaître la nature du pont disulfure intermoléculaire formé entre les deux partenaires. La nature du pont disulfure intermoléculaire ayant été déterminée, impliquant la Cys de recyclage, la détermination par radiocristallographie ou par RMN de la structure tridimensionnelle d'un complexe covalent entre la MsrA C51S et la Trx C35S va pouvoir être entreprise afin de caractériser les zones spécifiques d'interaction. Reste que le modèle MsrA de *N. meningitidis* n'est peut-être pas le meilleur modèle en vue d'étudier les zones d'interactions avec la Trx. En effet, la Cys 198, qui forme le pont disulfure intermoléculaire avec la Cys32 de la Trx, se trouve dans l'extrémité C-terminale peu structurée qui ne contient pas de structure secondaire régulière. Il est donc possible que le positionnement relatif entre les deux partenaires dans le complexe covalent MsrA C51S / Trx C35S ne soit pas représentatif de celui formé lors de l'échange de pont disulfure entre la MsrA_{ox} et la Trx_{réd}. Dans ce contexte, une étude avec la MsrA de *Bacillus subtilis* serait préférable dans la mesure où la Cys54 de recyclage est située dans l'hélice α qui sous-tend la Cys51 catalytique.

Annexes

Annexe 1

B. BALTA, G. MONARD, M.F. RUIZ-LOPEZ, M. ANTOINE, A. GAND, S. BOSCHI-MULLER et G. BRANLANT. (2006) Theoretical Study of the Reduction Mechanism of Sulfoxides by Thiols. *J. Phys. Chem. A*, 110, 7628-7636.

Pages 169 à 177.

Annexe 2

N. COUDEVYLLE, M. ANTOINE, S. BOSCHI-MULLER, G. BRANLANT et M.T. CUNG. (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of an oxidized form (Cys₅₁-Cys₁₉₈) of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Escherichia coli*. *J. Biomol. NMR*, publié en ligne.

Pages 178 à 181.

Annexe 3

N. COUDEVYLLE, M. ANTOINE, S. BOUGUET-BONNET, P. MUTZENHARDT, S. BOSCHI-MULLER, G. BRANLANT et M.T. CUNG. Solution structure and backbone dynamic of the reduced form and an oxidized form of *E. coli* Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA): structural insight of the MsrA catalytic cycle. A soumettre.

Pages 182 à 207.

Theoretical Study of the Reduction Mechanism of Sulfoxides by Thiols

B. Balta, G. Monard, and M. F. Ruiz-López*

UMR CNRS-UHP 7565, Equipe de Chimie et Biochimie Théoriques, Université Henri Poincaré - Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller, and G. Branlant*

UMR CNRS-UHP 7567, Equipe Enzymologie Moléculaire, Université Henri Poincaré - Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received: December 14, 2005; In Final Form: April 6, 2006

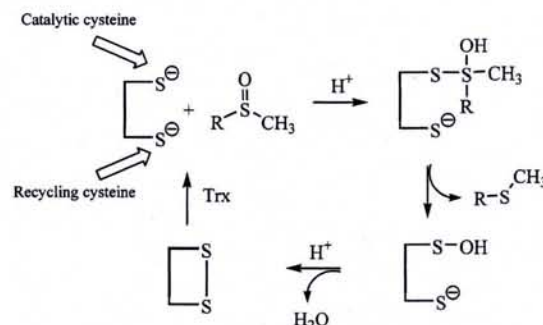
Theoretical computations have been carried out to investigate the reaction mechanism of the sulfoxide reduction by thiols in solution. This reaction is a suitable model for enzymatic processes involving methionine sulfoxide reductases (Msrs). Recent investigations on the Msr mechanism have clearly shown that a sulfenic acid intermediate is formed on the catalytic cysteine of the active site concomitantly to the methionine product. In contrast, experimental studies for the reaction of a number of thiols and sulfoxides in solution did not observe sulfenic acid formation. Only, a disulfide was identified as the final product of the process. The present study has been carried out at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p)//B3LYP/6-311G(d,p) level of theory. The solvent effect in DMSO has been incorporated using a discrete–continuum model. The calculations provide a basic mechanistic framework that allows discussion on the apparent discrepancy existing between experimental data in solution and in the enzymes. They show that, in the early steps of the process in solution, a sulfurane intermediate is formed the rate of which is limiting. Then, a proton transfer from a second thiol molecule to the sulfurane leads to the formation of either a sulfenic acid or a disulfide though the latter is much more stable than the former. If a sulfenic acid is formed in solution, it should react with a thiol molecule making its experimental detection difficult or even unfeasible.

Introduction

The reduction reaction of sulfoxides by thiols is of considerable biochemical interest because it can be viewed as the simplest model for enzymatic reactions involving the methionine sulfoxide reductases (Msr).^{1–17} Msrs are repair enzymes that reduce free or protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) oxidized by reactive oxygen or nitrogen species. The enzymatic reaction mechanism has recently been investigated. The overall reaction is depicted in Scheme 1.^{4,17} The catalytic cysteine reacts with MetSO to yield a sulfenic acid intermediate which has been evidenced by chemical and spectroscopic methods.^{4,8} At this stage, the reduced substrate is released. Then, the enzymatic reaction proceeds through formation of an intra-disulfide bond upon the attack of the recycling cysteine to the sulfenic acid intermediate. Finally, the oxidized form of Msrs is recycled by thioredoxin. In some Msrs, like MsrA in *E. coli*, a third cysteine could be involved in the recycling process.¹⁷ In all Msrs studied so far, the limiting step is associated to the thioredoxin-recycling process, whereas the rate of formation of the intra disulfide bond is governed by that of the sulfenic acid intermediate.¹⁷

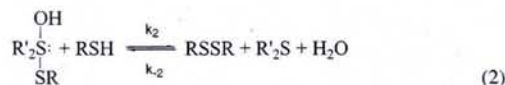
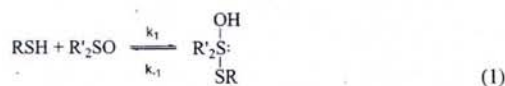
The reduction of sulfoxides by thiols is also interesting from the point of view of synthetic chemistry. It has attracted attention

SCHEME 1



since many decades because of high yields, mild experimental conditions, the ease of purification and the use of the sulfoxide (namely, dimethyl sulfoxide, DMSO) also as the solvent.^{21–28} Both acids and bases, in particular aliphatic amines, catalyze the reaction.^{24,26} Catalytic effects by halogen–hydrogen halides,²⁶ metals,^{29–31} and alumina³² have also been investigated. Early kinetic studies by Wallace²² and Wallace and Mahon²³ indicated that the activation energy correlated with the pK_a of the thiol. Moreover, while the reaction was found to be overall second order, in the excess of one of the reagents, pseudo-first-order kinetics was observed. On the basis of these findings, the authors proposed a reaction mechanism that involves initial formation of a thiol–sulfoxide adduct of sulfurane type followed by reaction of this intermediate with a second thiol molecule according to eqs 1–2.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manuel.Ruiz@cbl.uhp-nancy.fr (M.R.); Guy.Branlant@maem.uhp-nancy.fr (G.B.). Phone: +33 383684378 (M.R.); +33 383684304 (G.B.). Fax: +33 383684371 (M.R.); +33 383684307 (G.B.).



It was also shown that k_{-2} is negligible and that $k_2 \gg k_{-1}$.

The proposed mechanism raises questions since (1) the assignment of a sulfurane intermediate was based on kinetic studies but not on direct structural information, and (2) it excludes the formation of a sulfenic acid intermediate in contrast to recent conclusions derived from enzymatic reaction studies.

Sulfenic acid intermediate, if formed, should react with methanethiol in the medium making their experimental detection difficult. Indeed, sulfenic acids^{33–39} are highly reactive species and only a few sulfenic acids could be isolated and identified. In particular, they can be detected when they are part of a large molecule,^{38,39} such as a protein,^{40,41} which hinders their accessibility. Sulfenic acids may however be stabilized in a number of ways (see for instance ref 42), namely, by conversion into a sulfenate or a thiosulfinate, after reacting with another sulfenic acid.

To get a deeper insight on the mechanism of this reaction, quantum chemistry calculations may be particularly useful. The aim of the present work is to make such a theoretical investigation for a model process in DMSO solution. Specifically, this paper considers the following aspects: (1) the potential energy surface of the chemical system is explored in deep detail, (2) the structures of possible reaction intermediates and transition structures are described, (3) the energetics of all possible reaction pathways are compared, and (4) the role of the solvent is analyzed. Though the mechanisms of acid-, base-, and enzyme-catalyzed reactions have not been considered in this study, the results reported for model compounds in DMSO solution provide a basic framework to interpret experimental data. For the sake of clarity, the nomenclature of sulfur compounds is summarized in a glossary at the end of the manuscript.

Computations, Methods, and Models

To keep the computational time within reasonable limits, we have investigated the model reaction methanethiol + DMSO in DMSO solution. Though there is no available experimental data for methanethiol, comparison with experiment can be made with thiols exhibiting a similar pK_a value since this property is well correlated with the reaction kinetic constant.²³ In particular, methanethiol and α -toluenethiol, for which experimental results are available, have close pK_a s in water (10.3 and 10.5, respectively).^{23,43}

The solvent has been modeled using a discrete–continuum model. The initial chemical system consists of one thiol molecule and two solvent molecules. Explicit inclusion of two DMSO solvent molecules was found to be important because the solvent can form strong hydrogen bonds with some reaction intermediates influencing in a crucial way their chemical properties. Moreover, being a proton acceptor, DMSO can participate to the reaction coordinate in proton-transfer processes. In the course of the reaction, a further thiol molecule has been incorporated to the system (see below). The polarizable continuum method developed in our laboratory^{44–47} has been used (dielectric constant $\epsilon = 46.7$). We assume a molecular-shaped cavity and a multicentric multipole development of the reaction-field potential (up to 4th order). The cavity is defined by a scaled van der Waals surface with Bondi radii multiplied

by a factor 1.308. All the geometries have been fully optimized at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.^{48,49} Harmonic frequencies have been computed at the same level for identifying the stationary points as minima or transition structures (TS). Besides, minima connected by the TSs have been verified via intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations. Zero-point energies, thermal contributions to the enthalpy, and entropic terms have been computed in the usual way using the ideal gas approximation. Gibbs free energies are given relative to the initial complex after adding an empirical correction, as explained below.

To improve the accuracy on computed electronic energies, we have carried out MP2 single-point energy calculations on B3LYP optimized geometries. In that case, we use the extended basis set 6-311+G(3d2f,2df,2p) that is employed in the MP2 step of the CBS-QB3 method.⁵⁰ Unfortunately, in a few cases, this large basis set leads to solvation energy convergence problems. To avoid this difficulty and for the sake of homogeneity, MP2 calculations in solution have been done at the MP2/6-311G(d,p) level corrected by computations in gas phase at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) level according to

$$E_s(\text{B}) = E_s(\text{A}) + [E_g(\text{B}) - E_g(\text{A})] \quad (3)$$

where E_g (E_s) represents the electronic energy in gas-phase (solution) and A or B means MP2/6-311G(d,p) or MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) levels. This approximation has been tested in the case of the sulfurane intermediate described below, which plays a main role in the process, and shows the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energy to be very close to the approximated value obtained from eq 3 (difference 1 kcal/mol).

The approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies are used along the text and figures, unless otherwise stated. Corrections for basis set superposition error (BSSE) are not included in the energies presented below because with such a large basis set; BSSE has been found to represent a minor correction.

Electronic populations have been described in terms of a natural population analysis (NPA)⁵¹ and Mayer bond orders.⁵² All the calculations have been carried out using the Gaussian98 package.⁵³

Results

As mentioned above, Wallace and Mahon²³ showed that the reaction in DMSO is pseudo-first order in thiol concentration. Since the whole process, as it is proposed, involves two thiol molecules, one may conclude that each thiol molecule concerns a different reaction step. This has been assumed in our calculations. For clarity of the presentation, the results will be separated in four parts devoted to: (1) the reaction of a thiol molecule with DMSO and the formation of a sulfurane reaction intermediate, (2) the analysis of the properties of the sulfurane intermediate, (3) the activation of the reaction intermediate OH group by a second thiol molecule, and (4) the formation of the products.

Only a few geometrical parameters for the main structures will be presented below. Cartesian coordinates are available as Supporting Information as well as a full description of the transition vectors in transition structures.

Methanethiol Reaction with DMSO. Though experimental measurements suggest that a sulfurane intermediate is formed at this reaction step, we have envisaged the formation of both a sulfurane and a sulfenic acid. In principle, these compounds might be obtained through concerted or stepwise processes. In

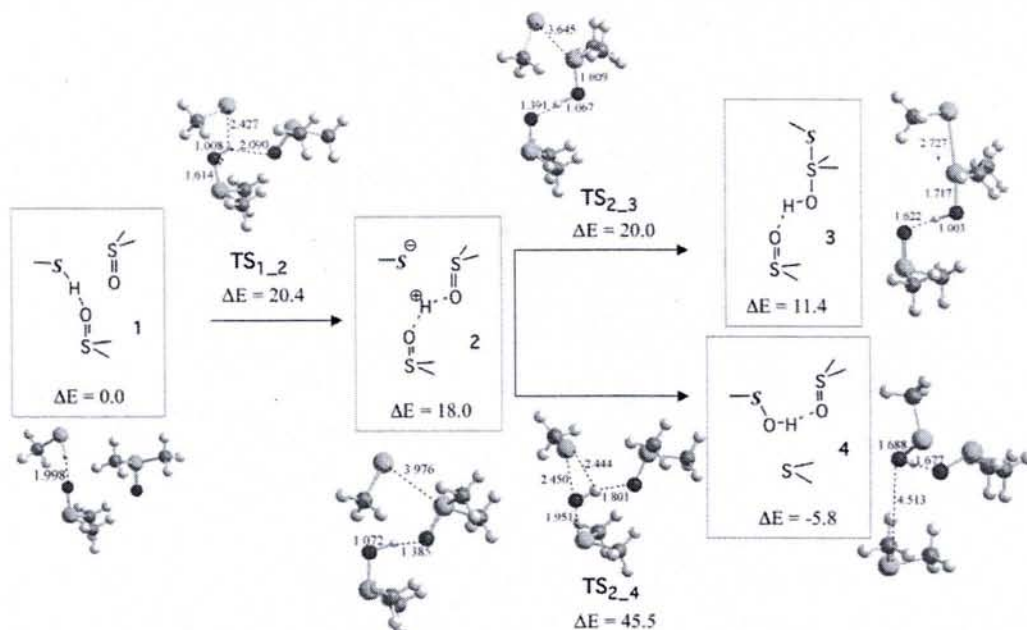


Figure 1. Schematic representation of the chemical species involved in stepwise reactions of methanethiol and DMSO and optimized structures at the B3LYP/6-311G** level (reactants, intermediates, transition structures) and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies in DMSO solution. ΔE includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to complex 1. Values are in angstroms and kcal/mol.

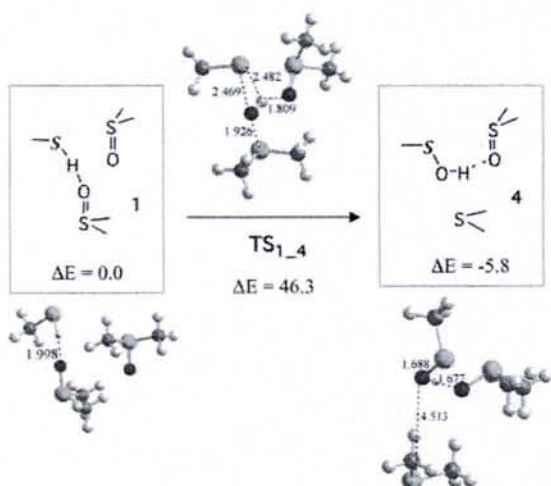


Figure 2. Schematic representation of the chemical species involved in the concerted reaction of methanethiol and DMSO to yield a sulfenic acid and optimized structures at the B3LYP/6-311G** level (reactants, intermediates, transition structures) and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies in DMSO solution. ΔE includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to complex 1. Values are in angstroms and kcal/mol.

the stepwise process, an ion pair should initially be formed through proton transfer from the thiol to DMSO. In our computations, the reactants are described by a hydrogen-bonded complex involving methanethiol and two DMSO molecules. We then explore the potential energy surface of the complex looking for stationary points. Stepwise processes leading to either the sulfurane or the sulfenic acid have been obtained and are shown in Figure 1. A concerted process leading to sulfenic acid has also been identified and is represented in Figure 2. However, any transition structure for a direct formation of a sulfurane intermediate 3 from 1 could be located. Figures 1 and 2 include some optimized geometrical parameters as well as the predicted values for relative energies. Note that various conformations for the ion pair 2 have been obtained lying in a narrow energy range. For simplicity, we do not describe them in detail.

The predicted energies clearly suggest that formation of the sulfenic acid at this reaction step is very unlikely, the energies of $TS_{1\rightarrow4}$ or $TS_{2\rightarrow4}$ being quite high (both TSs exhibit similar energies). Rather, the sulfurane intermediate should be formed in a stepwise process $1\rightarrow2\rightarrow3$ that involves an activation energy of 20.4 kcal/mol in the first step and a fast recombination of the ions in 2 to form the adduct 3.

Since polar species are present, one may expect the solvent to play a crucial role in the process. Indeed, long-range electrostatic interactions are fundamental to stabilize the ion pair. Moreover, the analysis of the results shows that hydrogen bonds with the discrete DMSO molecule are very important too. This can be illustrated by looking at the geometries of intermediates 2, 3, and 4 in Figure 1. Structure 2 shows that the hydrogen bond distance between the transferred proton and the oxygen atom of the solvating DMSO is very short (1.385 Å) in agreement with the work by Fu et al.⁵⁴ Hydrogen-bond distances in 3 and 4 are larger (1.622 and 1.677 Å, respectively) but still correspond to strong interactions.

Hydrogen bonds in transition structures are also noticeable. $TS_{1\rightarrow2}$ merits some specific comments. As shown, proton transfer has already taken place in this transition structure. IRC calculations confirm that the reaction coordinate at the TS basically corresponds to a rearrangement of the DMSO solvent molecule that is necessary to stabilize the charge separation. Another interesting result concerns the reaction $1\rightarrow3$. A TS may be located in gas phase, whereas in solution, computations systematically lead to $TS_{1\rightarrow2}$ and show that, to a large extent, this is due to interactions with the explicit solvent DMSO molecule.

Properties of the Sulfurane Reaction Intermediate. We describe here some properties of the sulfurane molecule $CH_3S-S(CH_3)_2-OH$, which is present in complex 3. For the sake of comparison, we have carried out further calculations for the sulfurane species in gas phase. Results in solution correspond to the discrete-continuum model.

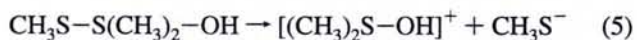
Sulfuranos⁵⁵⁻⁷⁶ are intermediates in various oxidation-reduction reactions of sulfur compounds.^{28,55,56,68} They bear a

tetravalent sulfur in the center of a trigonal bipyramidal structure with the more electronegative ligands at the apical positions.^{59–62} The simplest sulfurane SH_4 seems to be an exception, calculations predicting a square pyramidal geometry.⁶³ The electronic structure of sulfuranes has been the subject of a number of theoretical studies.^{64–66,75} In a very simplified approach, the S atom is supposed to be sp^2 hybridized. The remaining p orbital and the orbitals of the apical ligands combine to give an occupied bonding, an occupied nonbonding, and an empty antibonding molecular orbitals. Sulfur d orbitals are not needed for a qualitative description of the bonding, but their inclusion improves the results (e.g., bond orders^{72,76}).

In the case of $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$, d orbitals have a significant influence on the results. For instance, when full geometry optimization is carried out without d orbitals, the apical bond lengths become significantly longer (by about 0.15 Å). Indeed, in that case, the electronic structure agrees with a 3-center 4-electron bonding scheme. The apical ligands are, as expected, the most electronegative ones, i.e., $-\text{OH}$ and $-\text{SCH}_3$. Other arrangements of the sulfurane ligands have been envisaged. In most cases, geometry optimization leads either to the most stable structure or to system dissociation. Only one energy minimum involving an exchange between the apical $-\text{SCH}_3$ and the equatorial $-\text{CH}_3$ groups has been obtained though it is much less stable than 3 (by 21.2 kcal/mol).

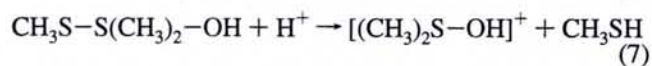
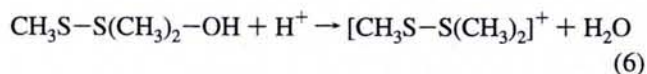
It is noteworthy that solvent effects on the geometry of the sulfurane are quite large. The computed S–O and S–S distances in the gas phase are 1.905 and 2.410 Å, respectively. In DMSO solution, the S–O bond shortens to 1.717 Å and the S–S bond lengthens to 2.727 Å, indicating a marked tendency of the solvent to favor dissociation of 3 into $(\text{OH})(\text{CH}_3)_2\text{S}^+$ and CH_3S^- . This is confirmed by the analysis of net atomic charges and bond orders in Table 1.

The S–S bond order is much weaker than the S–O bond, especially in solution. Most of the reactions of sulfuranes involves the cleavage of an apical bond yielding a sulfonium cation, $\text{RR}'\text{R}''\text{S}^+$.^{61,69,71} In the case of $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$, departure of the apical thiolate ligand seems more plausible than departure of the hydroxyl one. Indeed, if one compares the two dissociation processes



the second one is found to be favored by about 14 kcal/mol in DMSO solution (reaction free energies are 16.9 and 2.7 kcal/mol, respectively, using the discrete–continuum model and assuming the DMSO discrete solvent molecule interacting with the cations).

However, this scheme may be reversed when interactions with a proton donor are allowed due to the larger basicity of the hydroxyl compared to that of the thiolate. Thus, if one compares the processes

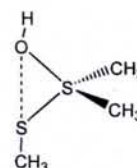


one finds that the first one is preferred by about 7 kcal/mol (reaction free energies are -21.3 and -14.1 kcal/mol, respectively, using the discrete–continuum model and the experi-

TABLE 1: NPA Atomic Charges (q) and Mayer Bond Orders (B) Computed for the Sulfurane $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$ at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) level

| | gas | DMSO solution |
|--------------------------------|----------|---------------|
| $q_{\text{S}(\text{central})}$ | 0.885 | 1.085 |
| q_{O} | -0.974 | -0.929 |
| $q_{\text{S}(\text{apical})}$ | -0.214 | -0.586 |
| $B_{\text{S}-\text{O}}$ | 0.931 | 1.243 |
| $B_{\text{S}-\text{S}}$ | 0.628 | 0.220 |

SCHEME 2



mental⁴³ solvation energy of a proton in DMSO; besides the DMSO discrete solvent molecule is assumed to interact with the cations).

According to these results, one can expect a marked pH influence on the sulfurane intermediate stability. Here, we are assuming a neutral medium, but proton transfer from a thiol molecule to the sulfurane is likely to occur and therefore such a process will be considered below. One should keep in mind however that in the process catalyzed by Msr enzymes, sulfenic acid formation occurs prior to participation of a second cysteine residue (see Scheme 1). The involvement of other residues able to stabilize the leaving hydroxyl group cannot be excluded but needs further investigation. In this paper, we have envisaged the possibility for the sulfurane species to lead to a sulfenic acid directly, i.e., without protonation of the hydroxyl group. Examination of the potential energy surface for structures of the type shown in Scheme 2 leads to location of a transition state exhibiting high activation energy (40.6 kcal/mol above intermediate 3). Thus, it is likely not operative in the chemical process.

Activation of the Sulfurane OH Group by a Second Methanethiol Molecule. Reaction of a second thiol molecule with the sulfurane is schematized in Figure 3. The pre-reactive hydrogen-bonded complex 5 formed by 3, and CH_3SH is slightly bound. From 5, the reaction proceeds by a low-barrier proton transfer from methanethiol to the sulfurane $-\text{OH}$ group. This activates the cleavage of the sulfurane S–O bond, leading to the ion-pair complex 6. The latter may dissociate to the separated ions, thiosulfonium 7 and thiolate 8, plus a water molecule but, as shown in the next section, the ions may also react prior to dissociation. We have not tried to locate transition structures for the association/dissociation processes $3 + \text{CH}_3\text{SH} \rightarrow 5$ and $6 \rightarrow 7 + 8 + \text{H}_2\text{O}$ since the continuum model is not well adapted for such calculations. The hypothetical TSs are expected not to play a significant role anyway.

Formation of Products. The envisaged processes from 6 are summarized in Figure 4. In the products of these reactions, the explicit solvent DMSO molecule is assumed to interact with the water molecule or with the sulfenic acid because these species form the strongest hydrogen bonds.

Compound 9 (top reaction in Figure 4) is easily formed by the attack of the negatively charged sulfur atom of the thiolate on the positively charged sulfur atom of the thiosulfonium. We have not been able to locate the TS for this reaction. Indeed, our calculations suggest that the ion-pair complex 6 is metastable with the water molecule stabilizing the charge separation. A small perturbation of the system provokes the anion–cation

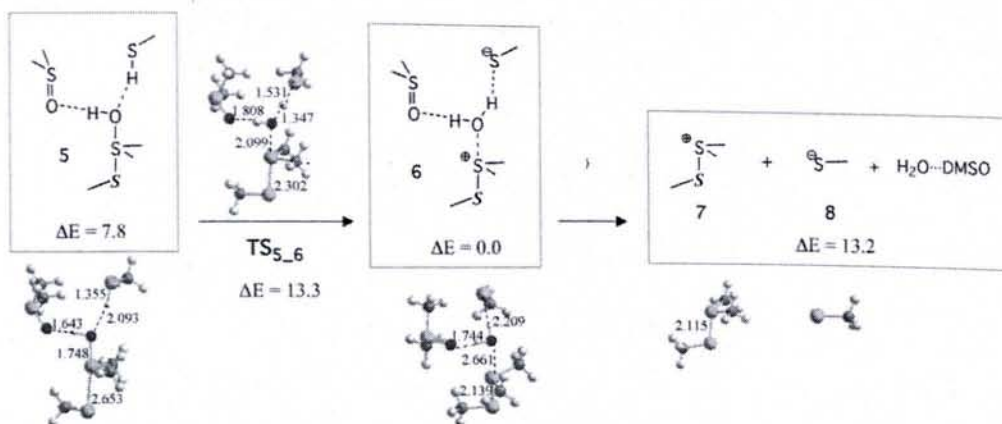


Figure 3. Schematic representation of the chemical species involved in the reaction of methanethiol with 3 and optimized structures (reactants, intermediates, transition structures) at the B3LYP/6-311G** level in DMSO solution and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies. ΔE includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to separated 1 + CH₃SH. Values are in angstroms and kcal/mol.

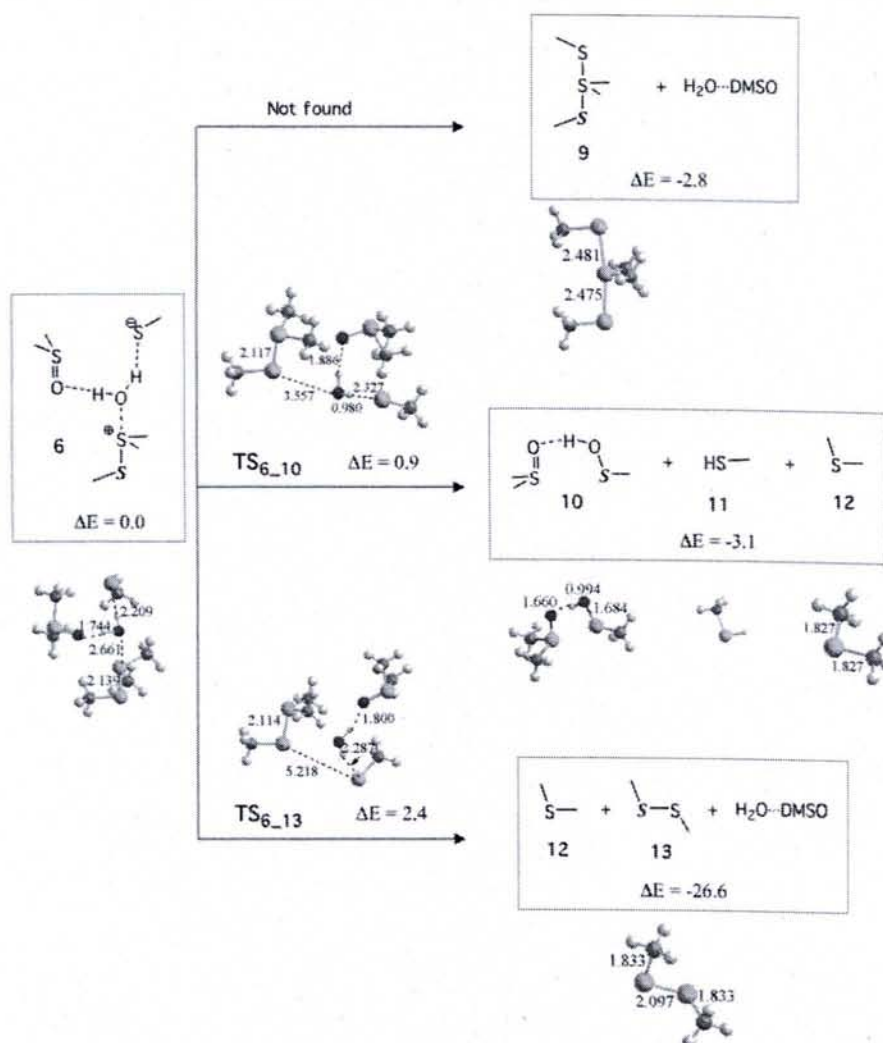


Figure 4. Schematic representation of the chemical species involved in various possible reactions of the thiolate, thiosulfonium ion and water and optimized structures at the B3LYP/6-311G** level in DMSO solution and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies. ΔE includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to separated 1 + CH₃SH. Values are in angstroms and kcal/mol.

reaction and the formation of the sulfurane 9. The structure of 9 is similar to that of 3 and simply differs from it by a hydroxyl/thiolate group exchange. Experimentally, it is known that if a sulfurane has an alkoxy ligand, it can be exchanged readily with the alkoxy group of an alcohol.^{57,61} Our results indicate that such a rapid exchange can also take place between -OH and

-SR ligands in the presence of thiols. Sulfurane 9 should undergo further processes similar to those of sulfurane 3, and therefore it is not expected to be a final product of the reaction.

In another reaction mechanism (middle reaction in Figure 4), complex 6 leads to formation of a sulfenic acid 10, a thiol 11, and a thioether 12 by crossing the transition structure TS₆₋₁₀.

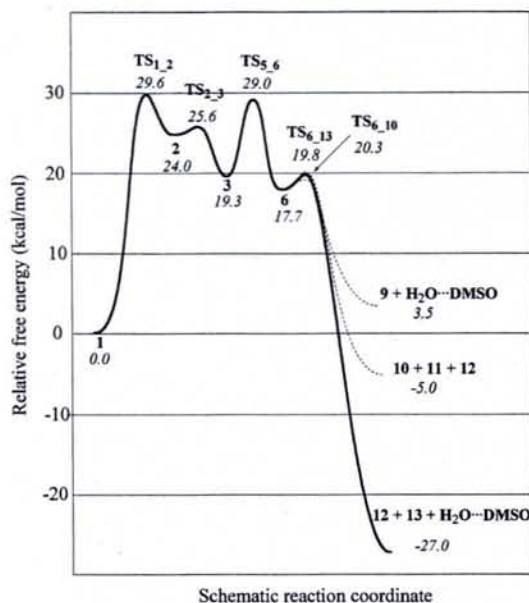


Figure 6. Free-energy profile for the reduction of DMSO by methanethiol in DMSO solution. The *x*-axis represents a schematic reaction path combining several coordinates for individual steps. Approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies (in italics, in kcal/mol) using optimized structures at the B3LYP/6-311G** level and eq 3. The hydrogen-bonded structure 5 ($\Delta G = 23.7$ kcal/mol) is not included for simplicity. It lies between 3 and TS_{5-6} .

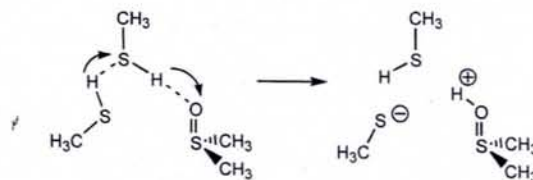
our theoretical study suggests that these intermediates could be formed in the process, they should rapidly react making their experimental detection in solution difficult or even unfeasible.

Comparison with Experimental Data in Solution. Kinetic studies by Wallace and Mahon²³ proposed the reaction mechanism summarized in eqs 1 and 2. The authors deduced a negligible value for k_{-2} and obtained $k_2 \gg k_1$. Qualitatively, our calculations are in very good agreement with these experimental findings. We show however that the formation of the intermediate 3 (eq 1) actually involves two steps, ionization, which is rate-determining, and ion recombination, which is a fast reaction.

Experimental data for methanethiol was not reported, but as noted in the Introduction, results for α -toluenethiol should be a good approximation. The measured pseudo-first-order rate constant, k' , at 100 °C with DMSO being the reagent in excess was $4.03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.²³ Since the reaction was shown to be first order in DMSO concentration, the true kinetic constant k corresponding to the second-order reaction is derived from $k' = k \cdot [\text{DMSO}]$. Taking $[\text{DMSO}]$ as the concentration of the pure liquid ($[\text{DMSO}] = 14.1 \text{ mol L}^{-1}$) and using transition state theory, the experimental free energy of activation is estimated to be 31.4 kcal/mol for α -toluenethiol, which is in satisfactory agreement with our computed value 29.6 kcal/mol for methanethiol considering the different approximations made. Note also that these values correspond to different temperatures. An estimation of the free energy of activation at 100 °C gives 30.5 kcal/mol (assuming the same dielectric constant and empirical correction to free energy that the one used above).

Let us now consider the products of the reaction. Our study predicts the formation of sulfenic acid 10 and disulfide 13 in competing reactions. The disulfide is the most stable species, and if thermodynamic control would apply, only this species should be observed. However, the sulfenic acid is substantially more stable than 6 and backward reaction appears to be unlikely. In the experimental work of Wallace and Mahon,²³ the only reported product was the disulfide although it is not clear

SCHEME 4



whether the authors tried to identify a sulfenic acid or not. Hence, the calculations agree with experimental data in predicting 13 as the major reaction product but points out to a possible formation of a secondary product 10.

Proton Relay Mechanism, Bifunctional Catalysis. The rate-determining step in the sulfoxide reduction reaction involves the ionization of the system through a proton transfer process from the thiol to the sulfoxide. This process may substantially be favored by proton relay mechanisms and bifunctional catalysis. A typical process is illustrated in Scheme 4, where we assume that two methanethiol molecules are involved in DMSO protonation. The structures of the complex and of the proton-transfer TS have been optimized. The computed activation energy is 19.6 kcal/mol that may be compared with the corresponding value for the nonassisted process in Figure 1, 20.4 kcal/mol. Computation of the activation free energy in solution is not straightforward for the same reasons as those presented above for the nonassisted ionization mechanism. However, one may obtain a rough evaluation of the bifunctional catalytic effect by computing the quantity

$$\delta\Delta G^\ddagger = G(\text{TS}_{\text{Ass}}) - G(\text{TS}_{1-2}) - G(\text{CH}_3\text{SH}) + G(\text{DMSO})$$

where TS_{Ass} and TS_{1-2} represent the transition structures for the assisted proton-relay (Scheme 4) and nonassisted (Figure 1) mechanisms, respectively. The expression is rigorous in the gas phase provided the molecules are assumed to be separated at infinity in the reactant state and can be considered to be a reasonably good approximation for the process in solution. Our computations lead to a free energy barrier decrease of $\delta\Delta G = -1.7$ kcal/mol. A comparable effect may be expected if water molecules or other chemical species bearing bifunctional groups are present in the reaction medium.

We shall not describe here the details of the subsequent steps for the assisted reduction reaction. In principle, one could expect the formed ions to recombine and form a sulfurane intermediate, as in the nonassisted process above. Our calculations show sulfurane formation from the ions in Scheme 4 to be a feasible reaction though it requires a larger activation free energy than sulfurane formation from the ions in 2. In the latter structure, the explicit solvent DMSO molecule provides a significant stabilization effect. Such an interaction is absent in the system shown in Scheme 4 where it is replaced by the interaction of the ions with an extra thiol molecule. Thus, an increase in thiol concentration may lead to a change of the reduction process kinetics due to two main factors: (1) decrease of the activation entropy associated to the proton relay mechanisms and (2) modification of the solute-solvent intermolecular interactions. Obtaining quantitative results for a given $[\text{DMSO}]/[\text{methanethiol}]$ ratio would need taking into account the interactions with the solvent in a more rigorous way although due to increasing system complexity such a study might also require to combine quantum mechanical calculations with statistical simulations.

Conclusions

The calculations carried out in this work confirm the experimental result that the reduction of sulfoxides by thiols in

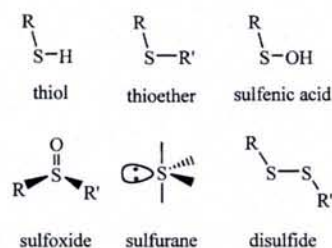
DMSO solution basically involves the slow formation of a sulfurane intermediate followed by a fast decay of this intermediate into the products. The computed activation free energy for the model reaction methanethiol + DMSO (29.6 kcal/mol) is close to the experimental value for the reaction of DMSO with α -toluenethiol (31.4 kcal/mol, deduced here from reported kinetic constants at 100 °C). Nevertheless, our study provides further insight in the reaction mechanism that appears to be more complicated. First, the sulfurane intermediate is formed in a stepwise reaction after ionization of the thiol-sulfoxide system, proton transfer being rate determining. Once formed, the sulfurane rapidly reacts with another thiol molecule. Sulfonium and thiolate ions are formed at this step that recombine to form sulfenic acid or disulfide, the latter being much more stable than the former.

In the catalytic mechanism of Msrs, a sulfenic acid intermediate has clearly been shown to be formed. Therefore, it is probable that the sulfenic acid was not reported in the experimental chemical study because it undergoes a fast decay into a disulfide species due to the presence of thiol. In that context, comparison of enzymatic and in solution processes is not straightforward. For instance, it is not clear which chemical group in the enzymatic process could play the activation role postulated for the second thiol molecule in the solution process (Figure 3). What is certain is that the recycling cysteine is not involved since the sulfenic acid intermediate is efficiently formed in its absence. Hence, understanding the mechanism in the active site of Msr enzymes deserves further investigation.

Glossary

Scheme 5 summarizes the nomenclature of sulfur compounds appearing in this study.

SCHEME 5



Acknowledgment. B. B. acknowledges postdoctoral positions from Tubitak and from the University of Nancy 1. The authors thank the CNRS, the University of Nancy 1, the PRST "Bioingénierie", and the French Ministry of Research (ACI IMPBio program, project SIRE) for financial support.

Supporting Information Available: Cartesian coordinates of all the optimized structures and transition vectors in transition structures are available as Supporting Information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Moskovitz, J.; Poston, J. M.; Berlett, B. S.; Nosworthy, N. J.; Szczepanowski, R.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14167–14172.
- (2) Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Honek, J. F.; Matthews, B. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 6463–6468.
- (3) Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Matthews, B. W. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13307–13312.
- (4) Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Sanglier-Cianferani, S.; Talfournier, F.; Van Dorsselaar, A.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35908–35913.

- (5) Tête-Favier, F.; Cobessi, D.; Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. *Struct. Fold. Des.* **2000**, *8*, 1167–1178.
- (6) Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2272–2279.
- (7) Grimaud, R.; Ezraty, B.; Mitchell, J. K.; Lafitte, D.; Briand, C.; Derrick, P. J.; Barras, F. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48915–48920.
- (8) Kumar, R. A.; Koc, A.; Cerny, R. L.; Gladyshev, V. N. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37527–37535.
- (9) Lowther, W. T.; Weissbach, H.; Etienne, F.; Brot, N.; Matthews, B. W. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 348–352.
- (10) Olry, A.; Boschi-Muller, S.; Marraud, M.; Sanglier-Cianferani, S.; van Dorsselaar, A.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12016–12022.
- (11) Taylor, A. B.; Benglis, D. M., Jr.; Dhandayuthapani, S.; Hart, P. J. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 4119–4126.
- (12) Antoine, M.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45352–45357.
- (13) Kim, H.-Y.; Gladyshev, V. N. *Mol. Biol. Cell.* **2004**, *15*, 1055–1064.
- (14) Olry, A.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. *Biochem.* **2004**, *43*, 11616–11622.
- (15) Coudeville, N.; Thureau, A.; Azza, S.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Cung, M.-T. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 363–364.
- (16) Thureau, A.; Olry, A.; Coudeville, N.; Azza, S.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Cung, M.-T. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 223–224.
- (17) Boschi-Muller, S.; Olry, A.; Antoine, M.; Branlant, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 231–238.
- (18) Lipton, S. H.; Bodwell, C. E. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 235–237.
- (19) Otaka, A.; Koide, T.; Shide, A.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1223–1226.
- (20) Akaji, K.; Tatsumi, T.; Yoshida, M.; Kimura, T.; Fujiwara, Y.; Kiso, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4137–4143.
- (21) Yiannios, C. N.; Karabinos, J. V. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3246–3248.
- (22) Wallace, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2018–2021.
- (23) Wallace, T. J.; Mahon, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4099–4103.
- (24) Wallace, T. J.; Mahon, J. J. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1502–1506.
- (25) Epstein, W. W.; Sweat, F. W. *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 247–260.
- (26) Lowe, O. G. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2096–2098.
- (27) Lowe, O. G. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2061–2064.
- (28) Madesclaire, M. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6537–6580.
- (29) Arterburn, J. B.; Perry, M. C.; Nelson, S. L.; Dible, B. R.; Holguin, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9309–9310.
- (30) Abu-Omar, M. M.; Khan, S. I. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4979–4985.
- (31) Arnáiz, F. J.; Aguado, R.; Pedrosa, M. R.; De Cian, A. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *347*, 33–40.
- (32) Hirano, M.; Yakabe, S.; Monobe, H.; Morimoto, T. *J. Chem. Res.* **1998**, 472–473.
- (33) Davis, F. A.; Rizvi, S. Q. A.; Ardecky, R.; Gosciniak, D. J.; Friedman, A. J.; Yocklovich, S. G. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1650–1653.
- (34) Davis, F. A.; Jenkins Jr, R. H.; Rizvi, S. Q. A.; Yocklovich, S. G. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3467–3474.
- (35) Davis, F. A.; Billmers, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7016–1018.
- (36) Davis, F. A.; Billmers, R. L. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2593–2595.
- (37) Davis, F. A.; Jenkins, L. A.; Billmers, R. L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1033–1040.
- (38) Goto, K.; Holler, M.; Okazaki, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1460–1461.
- (39) Ishii, A.; Komiya, K.; Nakayama, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12836–12837.
- (40) Allison, W. S. *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 293–299.
- (41) Claiborne, A.; Yeh, J. I.; Mallett, T. C.; Luba, J.; Crane, E. J., III; Charrier, V.; Parsonage, D. *Biochem.* **1999**, *38*, 15407–15416.
- (42) Poole, L. B.; Karplus, P. A.; Claiborne, A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 325–347.
- (43) Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 1622–1627.
- (44) Rivail, J.-L.; Rinaldi, D. *Chem. Phys.* **1976**, *18*, 233–242.
- (45) Rinaldi, D.; Ruiz-López, M. F.; Rivail, J.-L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 834–838.
- (46) Dillet, V.; Rinaldi, D.; Rivail, J.-L. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5034–5039.
- (47) Rinaldi, D.; Bouchy, A.; Rivail, J.-L.; Dillet, V. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 2343–2350.
- (48) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (49) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- (50) Montgomery, J. A., Jr.; Frisch, M. J.; Ochterski, J. W.; Petersson, G. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 2822–2827.
- (51) Reed, A. E.; Weinstock, R. B.; Weinhold, F. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735–746.
- (52) Mayer, I. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *97*, 270–277.

- (53) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Rega, N.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.11.3; Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2002.
- (54) Fu, Y.; Liu, L.; Li, R.-Q.; Liu, R.; Guo, Q.-X. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 814–822.
- (55) Johnson, C. R.; Rigau, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5398–5399.
- (56) Owsley, D. C.; Helmkamp, G. K.; Rettig, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5239–5242.
- (57) Martin, J. C.; Arhart, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2339–2341.
- (58) Martin, J. C.; Arhart, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2341–2342.
- (59) Tolles, M. W.; Gwinn, W. D. *J. Chem. Phys.* **1962**, *36*, 1119–1121.
- (60) Paul, I. C.; Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5010–5017.
- (61) Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *Science* **1976**, *191*, 154–159.
- (62) Downs, A. J.; McGrady, G. S.; Barnfield, E. A.; Rankin, D. W. H.; Robertson, H. E.; Boggs, J. E.; Dobbs, K. D. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3286–3292.
- (63) Yoshioka, Y.; Goddard, J. D.; Schaefer III, H. F. *J. Chem. Phys.* **1981**, *74*, 1855–1863.
- (64) Koutecký, V. B.; Musher, J. I. *Theor. Chim. Acta* **1974**, *33*, 227–238.
- (65) Schwenzer, G. M.; Schaefer, H. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1393–1397.
- (66) Chen, M. M. L.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1647–1653.
- (67) Martin, L. D.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3511–3513.
- (68) Young, P. R.; Hsieh, L.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7121–7122.
- (69) Young, P. R.; McMahon, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7572–7577.
- (70) Kaplan, L. J.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 793–798.
- (71) Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3155–3168.
- (72) Ángyán, J. G. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 61–67.
- (73) Loos, M.; Rivail, J.-L.; Kucsman, Á.; Csizmadia, I. G. *J. Mol. Struct.* **1991**, *230*, 143–153.
- (74) Eggers, M. D.; Livant, P. D.; McKee, M. L. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 69–84.
- (75) Volatron, F. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 167–184.
- (76) Ángyán, J. G.; Bonnelle, C.; Daudel, R.; Kucsman, Á.; Csizmadia, I. G. *J. Mol. Struct.* **1988**, *165*, 273–287.
- (77) Kice, J. L. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 58–64.
- (78) Pappas, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2926–2930.
- (79) Pappas, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 561–567.
- (80) Loos, M.; Rivail, J.-L.; Csizmadia, I. G. *J. Chim. Phys.* **1991**, *88*, 2465–2472.
- (81) Császár, P.; Csizmadia, I. G.; Viviani, W.; Loos, M.; Rivail, J.-L.; Perczel, A. *J. Mol. Struct.* **1998**, *455*, 107–122.

Letter to the Editor

¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of an oxidized form (Cys₅₁–Cys₁₉₈) of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Escherichia coli*

DOI 10.1007/s10858-005-6049-6

Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA) is involved in the reduction of methionine-(S)-sulfoxides generated during an oxidative stress. The catalytic mechanism of *E. coli* MsrA involves the formation of two successive disulfide bonds (Cys₅₁–Cys₁₉₈ and Cys₁₉₈–Cys₂₀₆), both are reducible by thioredoxin. We report the nearly complete ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the oxidized form (Cys₅₁–Cys₁₉₈). 2D and 3D NMR experiments were performed with uniformly ¹⁵N-, ¹³C-labeled protein. 88% of backbone H^N, N, C^α, C^γ and the large majority of side chain nuclei have been assigned. Almost of the unassigned residues are located in the 122–132 segment, which may be poorly structured, undergoing a conformational exchange, as revealed by linewidth increase for residues up- and down-stream of this segment (certainly due to exchange contribution to transverse relaxation). BMRB deposits with accession number 6786.

Reference: Boschi-Muller et al. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 231–238.

Nicolas Coudeville^a, Mathias Antoine^b, Sandrine Boschi-Muller^b, Guy Branlant^b & Manh-Thong Cung^{a,*}
^aLCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001, Nancy Cedex, France; ^bFaculté des Sciences, MAEM, UMR CNRS-UHP 7567, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: cmt@ensic.inpl-nancy.fr

Supplementary material is available in electronic format at <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-005-6049-6>

¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of an oxidized form (Cys₅₁-Cys₁₉₈) of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Escherichia coli*

Nicolas Coudeville^a, Mathias Antoine^b, Sandrine Boschi-Muller^b, Guy Branlant^b and Manh-Thong Cung^{a,*}

^aLCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France;

^bMAEM, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

Key words: methionine sulfoxide reductase A, *Escherichia coli*, resonance assignment

Biological context

Reactive oxygen species (ROS) are generated by cellular metabolism and involved in various physiological processes as signal transduction or immune response. Upon oxidative stress conditions, methionines (Met) included in proteins, are easily oxidized into Met-(*R*)-SO and Met-(*S*)-SO. In many cases, Met oxidation leads to protein functional alteration. Methionine Sulfoxide Reductases (Msr) are enzymes able to reduce MetSO back to Met. Msr of class A is stereospecific for the *S* absolute configuration of MetSO (Moskovitz *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002). The *E. coli* MsrA exhibits an original catalytic mechanism in three steps involving three cysteine residues (Boschi-Muller *et al.*, 2000). First, the attack of the catalytic cysteine (Cys₅₁) on the sulfoxide function of MetSO leads to the formation of a sulfenic acid intermediate and the liberation of one mole of Met per mole of enzyme. Then, two successive intra disulfide bonds are formed, first between Cys₅₁ and Cys₁₉₈, and after, between Cys₁₉₈ and Cys₂₀₆. The last step consists of reducing the Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond by thioredoxin. As shown for the MsrAs which only have the Cys₁₉₈ as a recycling cysteine, the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond in a *E. coli* MsrA in which the C206 has been replaced, is also efficiently reduced by Trx as the Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond is in the wild type (unpublished results). In a first approach, we recently reported the backbone and side-chain assignment of the reduced form of MsrA from *E. coli* (Coudeville *et al.*, 2004). We now report the nearly complete backbone and side-chain assignment of the first oxidized form occurring in the catalytic cycle and containing the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond.

Methods and experiments

E. coli MsrA contains four cysteines at positions 51, 86, 198 and 206. C206 was replaced by a serine residue in order to form only the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond while C86, which is located on the surface of MsrA, was substituted by a serine to avoid any protein aggregation. The C86S/C206S double mutant was obtained by site-directed mutagenesis. The *E. coli* strain used for MsrA production was BL21-DE3 transformed with a plasmidic construction containing the coding sequence under the T7 promoter. ¹⁵N and ¹⁵N/¹³C samples labeled were prepared by growing cells in a minimal media with (¹⁵NH₄)Cl as the sole nitrogen source and with glucose, ¹³C-labeled or not, as the only carbon source. MsrA production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h. for the ¹⁵N/¹³C protein and 16 h for the ¹⁵N protein. Purification was done as described by Boschi-Muller *et al.* (2000). The oxidation was performed by incubation of the labeled MsrA with excess of MetSO. The sample was then purified by gel filtration. Purity of the oxidized form of the mutant and its molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 1 mM protein concentration (95% H₂O, 5% D₂O) in 10 mM phosphate buffer (pH 7.1). Spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis gradient TXI probe and on a Bruker DRX 800 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels *et al.*, 1995). Backbone ¹H^N, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹H^α, ¹³C^γ, and side chain ¹H, ¹³C resonances were assigned using ¹H-¹⁵N HSQC, HNCOC, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH,

CBCA(CO)NH and HNHA experiments. HCCH-TOCSY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH and ^{15}N -, ^{13}C -3D NOESY spectra were also recorded with the aim of side-chain assignments.

Extent of assignments and data deposition

The ^1H - ^{15}N TROSY spectrum for this oxidized form (Cys₅₁-Cys₁₉₈) of *E. coli* MsrA is shown in Figure 1. 88% of backbone H^{N} , N, C $^{\alpha}$, C' and C $^{\beta}$ nuclei were assigned, as the large majority of the ^1H , ^{13}C side-chain nuclei. Almost of the unassigned residues are located in the 122-132 segment, likely poorly structured and undergoing a conformational exchange, as revealed by linewidth increase for residues up and down it (certainly due to exchange contribution to transverse relaxation). Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB-6786 (<http://www.bmrb.wisc.edu>).

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Accesses to the Bruker DRX 600 of the SCBIM, Nancy I, and to the Bruker DRX 800 of the ISCN, CNRS, NMR facilities were deeply appreciated.

References

- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., 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.
- Coudevylle, N., Thureau, A., Azza, S., Boschi-Muller, S., Branlant, G., Cung, M. T. (2004) (^1H) , (^{13}C) and (^{15}N) resonance assignment of the reduced form of methionine sulfoxide reductase A from *Escherichia coli*, *J Biomol NMR* **30**, 363-4.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J.K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P.J. and Barras, F. (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48915-20.
- Moskovitz, J., Poston, J.M., Berlett, B.S., Nosworthy, N.J., Szczepanowski, R. and 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.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., 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.

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.

Nicolas Coudeville^a, Mathias Antoine^b, Sabine Bouguet-Bonnet^c, Pierre Mutzenhardt^c, Sandrine Boschi-Muller^b, Guy Branlant^{b*} and Manh-Thong Cung^{a*}

^aLaboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Universités, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy cedex.

^bMaturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy.

^cMéthodologie RMN, UMR 7565 CNRS-UHP, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 209, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr; E-mail : guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

Running title: NMR structure and dynamics of *E. coli* MsrA

Methionine Sulfoxide Reductases (Msr) reduce methionine sulfoxide (MetSO)-containing proteins, back to methionine (Met). MsrAs are stereospecific for the S epimer whereas MsrBs reduce the R epimer of MetSO. Although structurally-unrelated, the Msrs characterized so far display a similar catalytic mechanism with formation of a sulfenic intermediate on the catalytic cysteine and a concomitant release of Met, followed by formation of at least one intramolecular disulfide bond (between the catalytic and a recycling cysteine) which is then reduced by thioredoxin. In the case of the MsrA from *Escherichia coli*, two disulfide bonds are formed i.e. first between the catalytic Cys₅₁ and the recycling Cys₁₉₈ and then between Cys₁₉₈ and the second recycling Cys₂₀₆. Three crystal structures including *E. coli* and *Mycobacterium tuberculosis* MsrAs which, for the latter, possesses only the unique recycling Cys₁₉₈, have been solved so far. In these structures, the distances between the cysteines involved in the catalytic mechanism are too large to allow formation of the intramolecular disulfide bonds. In the present work,

structural and dynamical NMR studies of the reduced wild type and the oxidized (Cys₅₁-Cys₁₉₈) forms of C86S/C206S MsrA from *E. coli* have been carried out. The mapping of MetSO substrate-bound C51A MsrA has also been performed. The data support 1) a conformational switch occurring subsequently to sulfenic acid formation and/or Met release that would be a prerequisite to form the Cys₅₁-Cys₁₉₈ bond and, 2) a high mobility of the C-terminal part of the Cys₅₁-Cys₁₉₈ oxidized form that would favor formation of the second Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), that originate from various sources such as aerobic respiration, are involved in various physiological processes including signal transduction and immune response.¹ Due to their high chemical reactivity, ROS can damage cellular targets like proteins. Methionine (Met) residues in proteins are one of the most sensitive aminoacid targets of oxidation by ROS. Its oxidation leads to formation of methionine sulfoxide (MetSO) which in turn can lead to

inactivation or modulation of the protein activity. Methionine sulfoxide reductases (Msrs) are able to reduce MetSO, back to Met. Msrs of class A are stereospecific for the *S* epimer, whereas MsrBs reduce the *R* epimer of the sulfoxide function.² Although MsrAs³⁻⁶ and MsrBs⁷⁻⁸ are structurally-unrelated, all of the Msrs characterized so far, display a similar catalytic mechanism involving at least three successive steps including: 1) formation of a sulfenic acid on the catalytic cysteine with the concomitant release of 1 mol of methionine per mole of Msr, 2) formation of an intramolecular disulfide bond and, 3) reduction of the oxidized form of Msr by thioredoxin (Trx). This is the case, for instance, for MsrAs from *Neisseria meningitidis* and *Mycobacterium tuberculosis* and for MsrBs from *Escherichia coli* and *N. meningitidis*. In *E. coli* and *Bos taurus* MsrAs, the presence of one supplementary recycling cysteine residue leads to formation of two successive intramolecular disulfide bonds, the first one between the catalytic Cys₅₁ and the recycling Cys₁₉₈, followed by the second one between Cys₁₉₈ and the second recycling Cys₂₀₆ (Figure 1). Both disulfide bonds are reduced by Trx but with a higher catalytic efficiency for the second one.⁷

Three X-ray structures of MsrAs from *E. coli* (MsrA^{*E.coli*}, PDB code 1FF3),⁶ *B. taurus* (MsrA^{*B.tau*}, PDB codes 1FVA and 1FVG)⁴ and *M. tuberculosis* (MsrA^{*M.tub*}, PDB code 1NWA)⁵ have been reported. In all of the X-ray structures, the active site is occupied by a molecule which is covalently bound or unbound, to the catalytic Cys₅₁. In the case of the MsrA^{*M.tub*}, a Met residue belonging to a neighboring monomer is in the active site, while for the MsrA^{*E.coli*} and the MsrA^{*B.tau*}, a dimethyl arsenate and a DTT molecule are covalently bound to the catalytic Cys₅₁, respectively. The X-ray structures show that in all the three structures, the distances between Cys₅₁ and Cys₁₉₈ are too large to allow the formation of intramolecular disulfide bonds. This is

also the case for the distances between Cys₁₉₈ and Cys₂₀₆ in the MsrA^{*E.coli*} and MsrA^{*B.tau*}.^{3, 9} This apparent contradiction could be explained either by the fact that the crystalline state does not reflect the solution conformation or by a conformational change occurring concomitantly or after formation of the sulfenic acid intermediate with the release of methionine. This would be a prerequisite to bring closer in space both the catalytic Cys₅₁ and the recycling Cys₁₉₈. To achieve greater insight in the understanding of the formation of the intramolecular disulfide bonds Cys₅₁/Cys₁₉₈ and Cys₁₉₈/Cys₂₀₆ in the *E. coli* MsrA, we have determined the solution structure of two forms of *E. coli* MsrA by high resolution NMR spectroscopy i.e. the reduced apo form (MsrA_{Red}) with an active site free from any bound molecule, and the oxidized C₅₁-C₁₉₈ MsrA form (MsrA_{Ox}) in which Cys₈₆ and Cys₂₀₆ have been substituted by Ser. Furthermore, we have quantified backbone mobility for both forms *via* the ¹⁵N longitudinal (*R*₁) and transverse (*R*₂) relaxation rates, and the steady-state heteronuclear {¹H}-¹⁵N NOE value measurements. We have also compared MsrA_{Red} solution structure with known MsrA X-ray structures, to assess conformational changes occurring upon the substrate binding. For this purpose, the mapping of MetSO substrate-bound C51A MsrA has been performed.

RESULTS

Solution structure of the reduced wild-type MsrA and of the C86S/C206S oxidized (Cys₅₁-Cys₁₉₈) MsrA

The NMR solution structures of MsrA_{Red} and MsrA_{Ox} were determined with the aim to obtain more structural information for Cys₅₁-Cys₁₉₈ and Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond formation. The reasons for substituting Cys₈₆ and Cys₂₀₆ by Ser in the MsrA_{Ox} are 1) Cys₂₀₆ would lead, in the presence of excess MetSO, to the formation of an oxidized MsrA with

Cys₅₁ under the sulfenic acid state and, Cys₁₉₈ and Cys₂₀₆ under disulfide state, 2) Cys₈₆, located on the protein surface, can lead, in the absence of reductant, to protein aggregation at the protein concentration required for the NMR experiment. However, it could not be excluded that the presence of two serine residues at positions 86 and 206 introduce structural perturbations, at least in the vicinity of positions 86 and 206. Therefore, the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of the C86S/C206S MsrA was recorded (see supplementary data for the corresponding HSQC spectrum, Figure S1) and assigned by comparison and analogy with the HSQC spectrum of the MsrA_{Red}. Most of the nuclei have similar chemical shifts in the two spectra. The signal of Ser₈₆ and Ser₂₀₆ were assigned by analogy with the HSQC spectrum of the oxidized form of MsrA. The chemical surrounding perturbations caused by the substitution were estimated by comparing the amide chemical shift differences between the MsrA_{Red} and the C86S/C206S MsrA by the bias of the consensual values $\Delta\delta$ (see Materials and Methods). The plot of $\Delta\delta$ values as a function of the protein sequence (see supplementary data Figure S2A) reveals that meaningful perturbations are observed for residues Tyr₈₂ to Gly₈₈ ($\Delta\delta > 0.1$ ppm) and for residue Gln₁₃₃ ($\Delta\delta = 0.48$ ppm). The localization of these perturbations on the 3D solution structure of the MsrA_{Red} (see supplementary data Figure S2B) shows that these residues are spatially close to Ser₈₆. The Ser₈₆ substitution perturbs the entire local surroundings of the α_2 helix, which is located in the vicinity of Ser₈₆. The C206S substitution does not induce surrounding perturbations. Altogether, the data show that the C86S/C206S substitutions lead to minor localized perturbations on the 3D solution structure of the MsrA and therefore renders pertinent the conclusion deduced from the comparison of the 3D structures of the reduced form of the wild type and the oxidized (Cys₅₁-Cys₁₉₈) form of MsrA in

which Cys₈₆ and Cys₂₀₆ have been substituted by Ser.

The NMR solution structures of both forms were calculated using the interproton NOE-derived restraints in combination with the dihedral angle (derived from TALOS prediction) and hydrogen bond restraints (based on the protection factor values for amide groups measured *via* H₂O/D₂O exchange experiments). The coordinates of the 20 final structures have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank under accession number 2GT3 for MsrA_{Red} and 2IEM for MsrA_{Ox}. The superimpositions of the 20 representative structures for each form are shown in Figures 2A and 2B respectively.

The structural statistics for both forms are summarized in Table I. For the core of MsrA_{Red} (residues 12 to 193), the 20 selected structures exhibit an atomic rmsd distribution about the mean coordinate positions of 0.85 ± 0.14 Å for the backbone atoms and 1.64 ± 0.21 Å for all of the heavy atoms, excluding the two N- and C- terminal ends, which are ill-defined. For the core of MsrA_{Ox} (residues 12 to 121 and 133 to 194), the 20 selected structures exhibit an atomic rmsd distribution about the mean coordinate positions of 0.85 ± 0.14 Å for the backbone atoms and 1.62 ± 0.19 Å for all of the heavy atoms, excluding the two N- and C-termini, as well as the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment, which undergoes a noticeable structural disorder. For both of the two forms, the 3D structure sets fit the experimental restraints with no interproton distance and torsion angle violations greater than 0.2 Å and 5°, respectively (Table 1). Moreover, all of the backbone torsion angles of the non-glycine residues are located in the allowed regions of the Ramachandran plot. As shown in Figure 3, the rms distribution is not homogeneous along the sequence that indicates an effective structural disorder in some regions (loops, turns and N- and C-termini).

The overall folds of the MsrA_{Red} and MsrA_{Ox} are very similar. Both adopt a α/β roll conformation, close to that reported in crystal structures. Figures 2C and 2D show a schematic view of the regular secondary elements of the most representative structure for each form. Only 38 and 40 % of the residues of MsrA_{Ox} and MsrA_{Red} respectively, are involved in regular secondary structures. The core of both forms consists of a six-stranded β -sheet. The individual strands comprise residues from Glu₄₃ to Ala₄₈ (β_1), Tyr₆₆ to Thr₇₃ (β_2), Ala₉₃ to Tyr₁₀₀ (β_3), Ala₁₃₇ to Tyr₁₃₉ (β_4), Glu₁₇₂ to Ile₁₇₃ (β_5) and Tyr₁₈₀ to Tyr₁₈₁ (β_6). Both parallel (p) and antiparallel (a) arrangements of the strands display the pattern $\beta_5(p)\beta_4(a)\beta_1(a)\beta_3(a)\beta_2(a)\beta_6$. This main β -sheet is surrounded by five α -helices. The first helix, α_1 , extends from Phe₅₂ to Trp₆₀ with two turns of a regular α -helix. The second helix, α_2 , from Tyr₈₂ to Ser₈₇, is also regular. The third α -helix, α_3 , from Tyr₁₀₇ to Asn₁₁₇, is characterized by two and a half turns of α -helix. The fourth α -helix, α_4 , from Pro₁₄₃ to Ala₁₆₂, consists of three turns of a regular α -helix from Pro₁₄₃ to Phe₁₅₆. The fifth and last α -helix, α_5 , extends from Tyr₁₈₉ to Lys₁₉₂ and contains only one turn of an α -helix.

A major difference between the two forms, concerning the core of the enzyme, is observed for the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment. In the reduced form, this segment forms a little two-stranded antiparallel β -sheet (β' : Arg₁₂₅ to Glu₁₂₆ and β'' : Asp₁₂₉ to His₁₃₀) which seems to be poorly stabilized (despite regular ϕ , ψ values and long range NOE correlation describing classically a β -sheet), as shown by a higher rmsd (compared to other secondary structure elements) and low protection factor values. In the oxidized form, the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment exhibits no secondary structure element and a high spatial disorder, as shown by the observed high rmsd values (Figure 4A).

For both forms, the core of the enzyme is flanked by the long N- and C-

terminal ends which contain a few or no regular secondary structure elements. The N-terminus, from Ser₁ to Met₄₂, exhibits a short loop (from Ser₁₀ to Ala₁₄) as a unique secondary structure. It is mainly stabilized both by hydrophobic interactions between numerous hydrophobic residues and the core of the enzyme, and by one hydrogen bond between H^N₂₈ and O^E₁₈₈. The C-terminal end, from Tyr₁₉₅ to Ala₂₁₁, contains the two recycling cysteines (Cys₁₉₈ and Cys₂₀₆) and shows no secondary structure element. For the reduced form, the C-terminal end is only stabilized by hydrophobic contacts between Ile₂₀₀, Ile₂₀₃, Val₂₀₅ and the core of the enzyme. For the oxidized form, the C-terminal end begins with the Cys₁₉₈ residue, which participates in the formation of the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond, and exhibits an important conformational disorder as shown by high rmsd values (Figure 4B).

The MsrA_{Red} active site is organized around the catalytic Cys₅₁ which is located inside the canonical sequence Gly₅₀Cys₅₁Phe₅₂Trp₅₃. As shown in Figures 2C and 2E, Cys₅₁ belongs to a short loop between strand β_1 and helix α_1 . This loop is surrounded by the β' - β'' sheet containing Asp₁₂₉. Following the Cys₅₁ residue, the side chains of Phe₅₂ and Trp₅₃ form a hydrophobic pocket, the indol ring of Trp₅₃ being stabilized by a π - π interaction with the aromatic side chain of Tyr₁₈₉. Surrounding this hydrophobic pocket are Tyr₈₂ (which makes part of the α_2 helix), Glu₉₄ (located in the strand β_3) and Tyr₁₃₄ (which is situated between β'' and β_4). The active site is surface-exposed and accessible to the substrate. As shown in Figures 2D and 2F, the active site of MsrA_{Ox} is organized around the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond and is surrounded by the Phe₅₂, Trp₅₃, Tyr₈₂, Tyr₁₃₄ and Tyr₁₉₇ residues. More than in the case of the reduced form, the active site of the oxidized form is surface-exposed and accessible to Trx. Finally, both active sites display a strong hydrophobic character by

the presence of numerous aromatic residue side chains (Phe₅₂, Trp₅₃, Tyr₈₂ and Tyr₁₃₄).

Backbone superimposition of the MsrA_{Red} solution structure with that of MsrA_{Ox} leads to a rmsd value of 1.83 Å for residues 14 to 122 and 132 to 195 (Figure 5A). Except for the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment, both structures are very similar, suggesting that the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond formation does not affect the global folding of the enzyme. The reduced and oxidized forms adopt a similar active site conformation (Figures 2E and 2F), especially with regard to the position and side chain conformation of aromatic residues (Trp₅₃, Tyr₈₂, Phe₅₂). The major difference concerns the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment. Indeed, in the reduced form, this segment adopts a little 2-stranded β -sheet (β' , β'') surrounding the active site. In the oxidized form, this segment is less structured, does not cover the active site and undergoes a strong structural disorder (Figure 4A). The consequence of this disorder is to expose to solvent the hydrophobic active site of MsrA_{Ox} as shown by the hydrophobic surface comparison between MsrA_{Red} (Figure 5C) and MsrA_{Ox} (Figure 5D). Finally, looking at the C-terminal part of both two forms, only the conformation of residues Gly₁₉₆, Tyr₁₉₇ and Cys₁₉₈ is affected in the MsrA_{Ox} structure (Figure 5B), as shown by ϕ , ψ et χ_1 dihedral values for these residues (Table II). One could argue that the conformational switch of the Gly₁₉₆-Cys₁₉₈ segment should allow the closeness of Cys₅₁ and Cys₁₉₈ and the formation of the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond.

Internal mobility of MsrA_{Red} and MsrA_{Ox}

For both forms, the 3D structures exhibit some spatial disorder in special parts of the enzyme (i.e. essentially the N- and C-terminal parts). Such disorders can indeed be explained by only a few observable nOe effects, poor spectral quality or missing assignments. But, in most cases, these disorders can be correlated to a particular dynamic behavior

of the concerned part of the enzyme. In order to characterize the molecular motions, the R_1 , R_2 and $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE values (see supplementary data, Figure S3) were analyzed by using the model free dynamics formalism¹⁰⁻¹¹ under the assumption of an overall anisotropic molecular tumbling. For a set of selected residues (residues that exhibit either significant conformational exchange (high R_2), or motions on the fast timescale (low NOE factor) were excluded from the analysis), the R_2/R_1 ratios were corrected from the contributions of high-frequency components and subsequently used to determine the rotational diffusion tensors that describe the overall tumbling. As a result, the global motion is shown to be fully anisotropic for both forms: a correlation time of 14.08 ns with an anisotropy equals to 1.07 and a rhombicity equal to 1.15 for MsrA_{Red}; a correlation time of 13.90 ns with an anisotropy equals to 1.07 and a rhombicity equal to 1.49 for MsrA_{Ox}. Even if the global correlation times are similar, the different rhombicity between the two forms testifies their different dynamical properties.

Then, the internal mobility analysis, using the Lipari and Szabo's Model Free approach, leads both to a value of the square of the generalized order parameter (S^2), which characterizes the restriction of internal motions, and to the effective correlation time for internal motions (τ_e). Examination of the order parameters (S^2) indicates that both forms adopt a fairly rigid folding as reflected by the fact that most of the S^2 values are above 0.9.

Even if global reorientations of both forms seem to be close, it is also interesting to compare the local dynamic behavior of both forms of the enzyme and to estimate how the dynamic properties are affected by the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond formation. In the reduced form, the most mobile part of the enzyme is the Tyr₁₉₅-Gly₂₀₂ segment, thus generating conformational adaptability that may facilitate substrate binding. In contrary, for

the MsrA_{Ox} structure, it is observed that the Tyr₁₉₅-Gly₂₀₂ segment exhibits lower rmsd and higher S^2 , which reflects a rigidification (Figure 3). The Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment, which covers the active site, becomes flexible as confirmed by the comparison of $(1-S^2)$, rmsd and $J(\omega_N)$ between the two forms (Figure 3). It must be recalled that $J(\omega_N)$ are the spectral densities which reflect better local dynamics changes in our case. Finally, the C-terminal terminus (Ile₂₀₃ to Ala₂₁₁), which is stabilized by hydrophobic interactions in the reduced form, shows a higher mobility in the oxidized form as reflected by lower S^2 and higher $J(\omega_N)$. This latter feature probably facilitates the formation of the Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond.

Structural comparison between the MsrA_{Red} solution structure and X-ray structures

Backbone superimposition of the MsrA_{Red} solution structure with the X-ray structure of MsrA^{*E.coli*} leads to rmsd values of 1.27 Å for residues 12 to 193 (Figure 6A), of 1.24 Å with MsrA^{*B.tau*} (186 residues; 61 % of sequence identity with MsrA^{*E.coli*}) and of 1.22 Å with MsrA^{*M.tub*} (141 residues; 44 % of sequence identity with MsrA^{*E.coli*}). Except for the absence of about 40 residues at the N-terminal fragment of MsrA^{*M.tub*} and for the C-terminal end of MsrA^{*E.coli*}, the MsrA_{Red} solution structure possesses the same folding as the one encountered in the X-ray structures.

As shown in Figure 6B, the active sites observed for the complexed MsrA^{*E.coli*} X-ray and MsrA_{Red} in solution structures are rather similar. The same statement remains true with the MsrA^{*M.tub*} and MsrA^{*B.tau*} X-ray structures. The Phe₅₂, Trp₅₃, Tyr₈₂, Asp₁₂₉, Tyr₁₃₄ and Tyr₁₈₉ residues present the same side-chain conformation in the X-ray and solution structures. In particular, in the solution structure, the side chains of Phe₅₂ and Trp₅₃ form a hydrophobic pocket, similarly to that observed in MsrA^{*E.coli*} and

MsrA^{*M.tub*} X-ray structures in which one of the two methyl groups of the dimethyl arsenate adduct and that of a Met coming from a neighboring monomer are located, respectively. Such methyl groups are supposed to mimic the methyl ϵ of MetSO. Moreover, the Tyr₈₂ and Tyr₁₃₄ side chains are positioned similarly to those in the MsrA^{*E.coli*} and MsrA^{*M.tub*} X-ray structures, forming hydrogen bonds with a water molecule that is postulated to mimic the oxygen atom of MetSO. Only, the side-chains of two invariant residues adopt different conformations: Cys₅₁ which is involved in the nucleophilic attack of the sulfoxide function of MetSO, and Glu₉₄, the role of which is to stabilize the transition state which leads to the formation of the sulfenic acid intermediate.¹²

The C-termini show different conformations. In the MsrA_{Red} solution structure, the Pro₁₉₄-Tyr₁₉₇ segment forms a bend that places C ^{β} ₅₁ and C ^{β} ₁₉₈ at a mean distance of 8.4 Å (with a minimal distance of 6.1 Å) (Figure 6C). This latter distance is shorter than the one found in the MsrA^{*E.coli*} X-ray structure (11.2 Å) (Figure 6D). In contrast to the former crystalline structure, in which the Pro₁₉₄ to Ile₂₀₃ sequence adopts an extended conformation, MsrA^{*B.tau*} and MsrA^{*M.tub*} exhibit the same bend (Pro₁₉₄ to Tyr₁₉₇) as the one encountered in the MsrA_{Red} solution structure (Figure 6E). Because of the presence of this bend, the distance between C ^{β} ₅₁ and C ^{β} ₁₉₈ in MsrA_{Red} solution is similar to that observed in crystalline MsrA^{*B.tau*} (8 Å) and to that observed in the solution structural model of MsrA^{*E.chr*} (7.9 Å).¹³ Moreover, MsrA^{*M.tub*} is a particular case due the presence of an extra residue. Indeed, in the MsrA^{*M.tub*} X-ray structure, the analogous Cys₁₉₈ is in position $i+2$ with respect to the analogous Tyr₁₉₇ and the side chain of Tyr₁₉₇ is facing the active site. In this context, the C ^{β} ₅₁ - C ^{β} ₁₉₈ distance is slightly shorter (6.6 Å).

Finally, the Tyr₁₉₇ and Cys₁₉₈ side chains in the MsrA_{Red} solution structure

exhibit different conformations compared to the X-Ray structures (complexed MsrA^{*E.coli*}, MsrA^{*B.tau*}; MsrA^{*M.tub*}). The C-terminal Gly₁₉₉-Glu₂₂₁ sequence exhibits different conformations when compared to the solution structure and the X-Ray structures, suggesting a flexibility of this sequence. However, one has to note the similar distance between C^β₁₉₈ and C^β₂₀₆ (23.7 ± 2.7 Å for the MsrA_{Red} solution structure, 21.2 Å and 19.4 Å in the MsrA^{*E.coli*} and MsrA^{*B.tau*} X-ray structures, respectively).

Thus, solution structure and X-ray structures are all in good agreement with respect to the global folding of MsrA. The mean distances between the different cysteines are definitely too large to allow the formation of disulfide bonds (around 8 Å between C^β₁₉₈ and C^β₅₁, and 22 Å between C^β₁₉₈ and C^β₂₀₆). Some observed minor differences (Cys₅₁, Glu₉₄, Tyr₁₉₇ and Cys₁₉₈) could be explained by the presence of different substrate mimics. Therefore, in order to investigate more deeply the differences between the free and substrate binding states, we have performed a titration study of C51A MsrA^{*E.coli*} with a chemically protected substrate.

Enzyme/Substrate complex study

In the case of MsrA^{*E.coli*}, determination of the structure of a Michaelis complex was not possible with the wild type because of the turn-over of the enzyme. Thus, the catalytic Cys₅₁ had to be substituted. The choice of Ala, instead of Ser is justified by the hydrophobic character of the active site. A ¹⁵N-labeled C51A MsrA sample was prepared in order to detect possible perturbations generated by the Ala substitution. Its ¹H-¹⁵N HSQC spectrum was recorded and attributed by comparison and analogy with the HSQC spectrum of MsrA_{Red}. Most of the nuclei have nearby chemical shifts. The chemical perturbations generated by the substitution were estimated by comparing the amide chemical shift differences between MsrA_{Red} and C51A MsrA by the bias of

the consensual values of $\Delta\delta$ (see Materials and Methods section). The localization of these perturbations in the 3D solution structure of MsrA_{Red} shows that the Ala₅₁ substitution leads to numerous perturbations for the local surroundings of Ala₅₁, due to its central position inside the core of the enzyme, but of rather minor intensities. In fact, from a conformational point of view, they should not prevent the recognition of the substrate by C51A MsrA (see supplementary data, Figure S4, for the plot of $\Delta\delta$ values versus amino acid residue number and the localization of these perturbations in the 3D solution structure of MsrA_{Red}).

The relevance of using such a mutated MsrA being confirmed by the former conformational results, ¹H-¹⁵N HSQC spectra were performed with increasing Ac-L-Met(*R,S*)-SO-NHMe /enzyme ratios, varying from 0 to 253. Taking into account the low apparent affinity value of MsrA for Ac-L-Met(*R,S*)-SO-NHMe (estimated to 42 ± 1 mM),¹² such an important ratio was necessary to reach enzyme saturation. A superimposition of the ten HSQC spectra revealed that numerous cross-peaks were more or less affected by the progressive addition of substrate. These observations indicate that the free and substrate-complexed forms of C51A MsrA are in fast exchange on the NMR time scale. The HSQC spectrum, recorded in the presence of a 253-fold excess of substrate, was used for the $\Delta\delta$ calculation. The backbone amide chemical shift changes for each residue of C51A MsrA in the complex are shown in Figure 7A. Large chemical shift perturbations were observed for several residues. Illustration of these changes on the 3D solution structure of C51A MsrA reveals that the majority of the perturbed amide groups are situated near the binding site, i.e. in the Ala₅₁ vicinity (Figure 7B). However, some of them are in enzyme regions far from the active site: the helix α_4 , the N-terminus and the C-terminus. Given the high substrate concentration, these latter perturbations may be due to

non-specific interactions and have not been considered.

Weak $\Delta\delta$ values are observed for Trp₅₃, Tyr₈₂, Asp₁₂₉, Tyr₁₃₄, and Tyr₁₉₇ residues belonging to the active site, except for Glu₉₄ ($\Delta\delta = 0.12$ ppm). By using the ¹H-¹⁵N HSQC experiment for substrate titration, only the chemical shift changes generated on the backbone environment (i.e. on the amide groups) were taken into account. For all of the non-perturbed amide groups, only the side-chains are implicated in substrate recognition, suggesting that their backbone amide groups are not affected. For the Glu₉₄ residue, the slight perturbation observed for its $\Delta\delta$ value could be correlated with the difference between the conformation of Glu₉₄ side chain in the free state solution and the X-ray complexed conformations, suggesting a conformational change for this residue occurring upon substrate binding.

The Tyr₁₉₅-Cys₁₉₈ segment (with exception of Tyr₁₉₇ which interacts with the substrate by its side chain) and the two Gly₂₀₁ and Gly₂₀₂ residues possess significant $\Delta\delta$ values, in particular for Cys₁₉₈ ($\Delta\delta = 0.65$ ppm). This suggests that these fragments of MsrA_{Red} are highly perturbed by the substrate binding, which could correspond to a major conformational change during the enzyme/substrate complex formation. This observation agrees with the hypothesis of conformational adaptability of this segment and the difference between the conformation of Tyr₁₉₇-Cys₁₉₈ residues in the free state solution and in the X-ray complexed conformations.

All of the perturbations encountered in the active site environment, generated by the enzyme/substrate complex formation, correlate well with the conformational differences observed for some MsrA regions when comparing the free solution structure of MsrA_{Red} with the X-ray structures of the enzyme/substrate mimic complexes, suggesting that residues Glu₉₄, and Tyr₁₉₅ to Cys₁₉₈ undergo

conformational changes upon substrate binding.

DISCUSSION

The examination of MsrA_{Red} solution structure reveals that, in the reduced state, the distances between cysteine residues are too large to allow the formation of any of the disulfide bonds (Cys₅₁-Cys₁₉₈ and Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ as well). The NMR dynamics study also shows that the free active site undergoes mobility on the picosecond to nanosecond timescale, generating a conformational adaptability that may facilitate substrate binding. The structural comparison between the MsrA_{Red} structure in solution and other ligand-complexed MsrA X-ray structures, in addition with the NMR enzyme/substrate complex study, show that substrate binding induces conformational change for residues Glu₉₄, and Tyr₁₉₅ to Cys₁₉₈ which leads to a similar conformation as those described in the X-ray structures. But once again, as observed for the X-ray structures, which are substrate-like complexed enzymes, the distances between the cysteines in the enzyme/substrate complex remain too large to make possible the formation of disulfide bonds. This strongly suggests that a conformational change occurs concomitantly or after the formation of the sulfenic acid intermediate and/or release of Met which likely permits to bring closer Cys₅₁ and Cys₁₉₈ residues, and consequently, the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond formation.

Unfortunately, the chemical stability of the sulfenic acid intermediate is low thus preventing NMR determination of its 3D structure. In that context, determination of the first structure of a Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide oxidized form of a MsrA is highly informative. Indeed, structural and dynamical properties of MsrA_{Ox} are roughly similar to the MsrA_{Red} ones. Nevertheless, some specific parts exhibit interesting differences, which should lead to functional implications. In particular, in the MsrA_{Ox} solution structure, the Gln₁₂₂-

Thr₁₃₂ segment shows no secondary structural elements and high mobility. Examination of the X-ray structure of MsrA^{*E.coli*} in which an arsenate molecule is covalently bound to Cys₅₁ reveals that the Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ conformation is stabilized by a hydrogen bond network involving water molecules. In the MsrA_{Ox} structure, this network appears to be broken. The active site is now more exposed to the solvent, displaying a hydrophobic patch on the molecular surface. A conformational switch of the Gly₁₉₆-Cys₁₉₈ segment is also observed which makes possible the formation of the Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond. It also appears that the Ile₂₀₃-Ala₂₁₁ segment, which is stabilized by hydrophobic interactions with the core in the MsrA_{Red} form, displays high mobility (on the picosecond to nanosecond timescale) which can favor Cys₁₉₈-Cys₂₀₆ disulfide bond formation.

The solvent-exposed hydrophobic surface of the MsrA_{Ox} active site is an interesting feature with regard to the Trx dependent Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide reduction. In fact, many MsrAs like the MsrA^{*M.tub*} possess only the recycling Cys₁₉₈. In this case, the disulfide bond reduced by Trx is the Cys₅₁-Cys₁₉₈ one. It has been shown that the MsrA^{*E.coli*} Cys₅₁-Cys₁₉₈ disulfide bond can also be reduced by Trx⁷. Therefore, MsrA_{Ox} structure can also be considered to be representative of the structure of the oxidized form of the sub-class of MsrA possessing only the recycling Cys₁₉₈ residue. Then, the solvent-exposed hydrophobic surface of the oxidized form likely plays a role in Trx interaction during the reduction step. Indeed, several studies have shown that the Trx active site exhibits large solvent-exposed hydrophobic surface,¹⁴⁻¹⁵ such a surface playing a key role during the interaction with other partners.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

The *E. coli* strain used for production of *E. coli* wild-type MsrA and C86S/C206S mutated MsrA was BL21-DE3 transformed with a plasmidic construction containing the corresponding coding sequence under the T7 promoter. Site-directed mutagenesis were performed as described previously.³ ¹⁵N- and ¹⁵N/¹³C-labeled samples were prepared by growing cells at 37° C in M9 minimal media, supplemented with (¹⁵NH₄)Cl as the sole nitrogen source and with ¹³C-labeled glucose, as the unique carbon source. MsrA production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h for the ¹⁵N/¹³C protein and 16 h for the ¹⁵N protein. Purification was done as described by Boschi-Muller *et al.*³ Sample purities and molecular masses were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

To obtain the Cys₅₁/Cys₁₉₈ oxidized form, the double C86S/C206S mutated MsrA was incubated with an excess of MetSO. The protein was then purified by gel filtration. The formation of the Cys₅₁/Cys₁₉₈ disulfide bond was checked by electrospray mass spectrometry and thiol titration by DTNB.

The NMR samples were prepared with 1 mM protein concentration (95% H₂O, 5% D₂O) in 10 mM phosphate buffer at pH 7.1. Samples were degassed and sealed under nitrogen. Reduced form samples were kept in their reduced state by adding 50 mM 1,5-dithiothreitol-*d*₁₀ (Cambridge Isotope Laboratories).

NMR Spectroscopy

All spectra were acquired at 298K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a gradient 3-axis TXI probe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY¹⁶. TSP-*d*₄ (Euriso-top) was used as an internal reference for ¹H chemical shifts and as external reference for calibration of ¹³C chemical shifts. Indirect referencing was used for the ¹⁵N chemical shift.¹⁷ Backbone amide ¹H^N,

$^1\text{H}^\alpha$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$ and $^{13}\text{C}'$ resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and HNHA experiments; side chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using CC(CO)NH and HCCH-TOCSY experiments. The chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB-6090 for MsrA_{Red}¹⁹ and BMRB-6786 for MsrA_{Ox}¹⁸ (<http://www.bmrb.wisc.edu>). Interproton distance restraints were derived from three-dimensional ^1H - ^{13}C / ^{15}N HSQC-NOESY experiments with two mixing time values of 75 and 150 ms; a particular ^1H - ^{13}C HSQC-NOESY experiment was performed, with the ^{13}C frequency carrier set to 150 ppm (corresponding to the aromatic carbons) and a mixing time of 70 ms, especially for the assignment of the aromatic protons.¹⁸⁻¹⁹

$^1\text{H}/^2\text{H}$ exchange experiments were performed using lyophilized ^{15}N -labeled samples dissolved in D_2O . The exchange rates of amide protons were monitored by ^1H - ^{15}N HSQC experiments of 30 minutes duration, performed during 12 h. The resulting data were fitted as a monoexponential curve so as to determine the kinetic exchange rate k_m . The k_m values were then normalized to evaluate the protection factor values.²⁰ This latter method permits to include *a priori* experimental hydrogen bond restraints in the calculation on the assumption that high protection factor values correlate with secondary structure predictions.

Spin relaxation measurements

The ^{15}N longitudinal relaxation rates (R_1), ^{15}N transverse relaxation rates (R_2), and steady-state heteronuclear $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE values of MsrA_{Red} and MsrA_{Ox} were determined. Experiments were performed as described by Farrow *et al.*²¹ on a Bruker Avance 600 MHz NMR spectrometer at 298K, using a $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ cryoprobe. Spectral widths of 10,163 Hz for ^1H (F2 domain with the ^1H carrier frequency set to the water signal, 4.7 ppm) and 2430 Hz for

^{15}N (F1 domain with the carrier frequency set to the middle of the amide region, 120 ppm), were used. For the R_1 and R_2 measurements, 2048 (^1H) and 256 (^{15}N) complex data points were collected with 8 transients/increment and a recycle delay of 5s. Ten delays of 20, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000 and 2500 ms were used during the inversion-recovery period of the R_1 experiments, whereas eight delays of 15.7, 31.4, 47.1, 62.9, 78.5, 94.2, 109.9 and 141.3 ms were used during the CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) period of the R_2 experiments. Raw data were processed and analyzed with the GIFA software package.²² The relaxation rate constants were obtained by fitting the peak intensities to a single exponential function using the nonlinear least-squares method. Heteronuclear ^1H - ^{15}N NOE experiments were carried out in an interleaved manner, with and without proton saturation period of 4.5s applied before the start of the ^1H - ^{15}N HSQC experiment and repeated twice under identical conditions. 48 transients were collected for each experiment. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE were deduced from the ratios of peak intensities obtained with and without proton saturation.

Backbone dynamics

The ^{15}N experimental relaxation data were first used as input into the *RotDif* program²³ to obtain the global motion, and then into the *Dynamics* program²⁴ to derive the local motions. The amide bond was fixed to 1.02 Å and a mean ^{15}N chemical shift anisotropy value of -170 ppm was used during the fitting procedure. In some cases, residues exhibit additional internal motions which are taken into account by the *Dynamics* program but which may be referred to as a different model of motion for a given residue in each of the two forms, reduced or oxidized. Thus, and because both forms have to be compared with minimum hypothesis (maximum of confidence), a direct spectral density mapping²⁵ (which is independent of the model of global reorientation) was also

performed using the DYNAMOF program.
26

Titration of C51A MsrA with Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe

The NMR sample containing 1 mM of ^{15}N -labeled C51A MsrA was prepared in 10 mM phosphate buffer (95% H_2O , 5% D_2O) and 50 mM 1,5-dithiotreitol- d_{10} (Cambridge Isotope Laboratories) at pH 7.1 in order to observe possible perturbations generated by the substitution. The amide chemical shift perturbations ($\Delta\delta$) were calculated as $\Delta\delta = \left| \Delta\delta^{15}\text{N} \right| / f + \left| \Delta\delta^1\text{H} \right|$.²⁷ The introduction of the f factor and of its value was justified by the difference in the spectral widths of the backbone ^{15}N resonances and the ^1H signals (^{15}N range, 135 - 104 ppm = 29 ppm; ^1H range, 11.6 - 6.3 ppm = 5.3 ppm; correction factor $f = 29/5.3 = 5.5$). Thus, the correction factor $f = 5.5$ was used in order to give roughly equal weighting for each of the ^1H and ^{15}N chemical shift changes. The titration was performed at 10 substrate/enzyme ratios i.e. 0, 9, 18, 23, 35, 60, 87, 120, 165 and 253. The concentration of C51A MsrA (^{15}N -labeled) is equal to 1 mM. ^1H - ^{15}N HSQC spectra were recorded for each titration ratio. The substrate used was Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe instead of L-Met-(R,S)-SO because MsrA displays a better affinity for the protected MetSO substrate¹² as already shown for the MsrA from *N. meningitidis*.⁷ The Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe used was a mixture of the two *LS* and *LR* diastereoisomers. MsrAs recognize only the *LS* diastereoisomer, whereas the *LR* one is neither a substrate²⁸ nor an inhibitor even at the high concentration used.⁷ Therefore, only the *LS* diastereoisomer binds to MsrA. The amide chemical shift

perturbations ($\Delta\delta$) between the complexed and the free forms were calculated as defined above by comparing the HSQC spectrum of the complexed form at a substrate/enzyme ratio of 253 with that of the free C51A MsrA.

Structure Calculations

NOE cross-peaks were classified as strong, medium or weak, and converted into upper limits of 2.5, 3.5 and 5.5 Å. Restraints involving pseudo-atoms were systematically over-estimated. Hydrogen bond restraints were treated as two distance restraints with an upper limit of 2.4 Å between the hydrogen and the acceptor heavy atom, and that of 3.5 Å between the acceptor and donor heavy atoms. Backbone ϕ and ψ dihedral restraints were derived from the program TALOS²⁹ using as input the ^1H , ^{13}C , ^{15}N , backbone chemical shifts determined previously. Only TALOS prediction with 10 agreeing matches were used as ϕ and ψ dihedral restraints. To each of them was attributed an average value with a standard deviation range with a minimum of 10°. All of the peptide bonds were kept planar and trans. Experimental restraints are summarized in Table I.

Structures were calculated with the program DYANA.³⁰ 500 randomized structures were generated and simulated annealing calculations were performed with DYANA. The 20 structures with the lowest target function were selected as the final set. Figures were made using MOLMOL³¹ and INSIGHT II. The coordinates of the 20 final structures have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank under accession number 2GT3 for MsrA_{Red} and 2IEM for MsrA_{Ox}.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-N° 5436) and the French Ministry of Research (ACI BCMS047). Mathias Antoine gratefully thanks the French Ministry of Research for financial support. Accesses to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) and to the Bruker DRX 800 (NMR facilities of the Laboratoire de RMN à haut champ, ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette) were deeply appreciated. We thank Dr G. Boussard and Dr. S. Sonkaria for their critical review of the manuscript, Dr S. Azza and S. Gioria for their technical assistance.

REFERENCES

1. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
2. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A. & 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.
3. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A. & 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**, 35908-35913.
4. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H. & Matthews, B. W. (2000). Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry* **39**, 13307-13312.
5. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S. & Hart, P. J. (2003). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. *J. Bacteriol.* **185**, 4119-4126.
6. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. & Aubry, A. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold. Des.* **8**, 1167-1178.
7. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. & Branlant, G. (2005). The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231- 238.
8. Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. & Matthews, B. W. (2002). The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 348-352.
9. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., Honek, J. F. & Matthews, B. W. (2000). Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 6463- 6468.
10. Lipari, G. & Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559-4570.
11. Lipari, G. & Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559.
12. Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2006). Characterization of the amino-acids from *Neisseria meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reductase step. *J. Biol. Chem.* (in press)

13. Beraud, S., Bersch, B., Brutscher, B., Gans, P., Barras, F. & Blackledge, M. (2002). Direct structure determination using residual dipolar couplings: reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13709-13715.
14. Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B. M., Holmgren, A., Jorvall, H., Hoog, J. O. & Branden, C. I. (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *Embo J.* **3**, 1443-1449.
15. Himawan, J. S. & Richardson, C. C. (1996). Amino acid residues critical for the interaction between bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **271**, 19999-20008.
16. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. & Wüthrich, K. (1995). The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* **6**, 1-10.
17. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L. & Sykes, B. D. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**, 135-140.
18. Coudeville, N., Antoine, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G. & Cung, M. T. (2006). ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of an oxidized form Cys51-Cys198 of methionine sulfoxide reductase A from *Escherichia Coli*. *J. Biomol. NMR* (Epub ahead of print).
19. Coudeville, N., Thureau, A., Azza, S., Boshi-Muller, S., Branlant, G. & Cung, M. T. (2004). ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the reduced form of methionine sulfoxide reductase A from *Escherichia coli*. *J. Biomol. NMR* **30**, 363-364.
20. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86.
21. 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. & 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.
22. Malliavin, T. E., Pons, J. L. & Delsuc, M. A. (1998). An NMR assignment module implemented in the Gifa NMR processing program. *Bioinformatics* **14**, 624-631.
23. Walker, O., Varadan, R. & Fushman, D. (2004). Efficient and accurate determination of the overall rotational diffusion tensor of a molecule from ^{15}N relaxation data using computer program ROTDIF. *J. Magn. Reson.* **168**, 336-345.
24. Hall, J. B. & Fushman, D. (2003). Characterization of the overall and local dynamics of a protein with intermediate rotational anisotropy: Differentiating between conformational exchange and anisotropic diffusion in the B3 domain of protein G. *J. Biomol. NMR* **27**, 261-275.
25. Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W. & 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.
26. Barthe, P., Ropars, V. & Roumestand, C. (2006). DYNAMOF : un programme pour l'analyse dynamique de données de relaxation obtenues à champs magnétiques multiples. *C. R. Chimie* **9**, 503-513.
27. Williamson, R. A., Carr, M. D., Frenkiel, T. A., Feeney, J. & 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.

28. Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R. & 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**, 14167-14172.
29. 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.
30. Guntert, P., Mumenthaler, C. & Wuthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283- 298.
31. Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55.
32. Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boshi-Muller, S. & Branlant, G. (2006). Theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols. *J. Phys. Chem. A*, **110**, 7628-7636.

Abbreviations: DTNB, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; DTT, dithiothreitol; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; MetSO, L-methionine sulfoxide; Met-(*S*)-SO, L-methionine-(*S*)-sulfoxide; Met-(*R*)-SO, L-methionine-(*R*)-sulfoxide; Msr, methionine sulfoxide reductase; MsrA_{Ox}, oxidized (Cys₅₁-Cys₁₉₈) form of C86S/C206S MsrA from *Escherichia coli*; MsrA_{Red}, reduced wild type apo form of MsrA from *Escherichia coli*; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; rms, root mean square; rmsd, rms deviation; ROS, reactive oxygen species.

Table 1. NMR-derived geometrical restraints and structural statistics of the entire conformational set of reduced MsrA_{Red} and oxidized MsrA_{Ox}.

| Restraint | Number | |
|--|---------------------|-------------------------------|
| | MsrA _{Red} | MsrA _{Ox} |
| Upper interproton | | |
| Total of distance restraints | 3082 | 2807 |
| H-Bonds ^a | 146 | 130 |
| Intra | 1769 | 1668 |
| Sequential | 853 | 654 |
| Long-distance | 314 | 355 |
| Dihedral angle | 262 | 258 |
| ϕ | 130 | 128 |
| ψ | 132 | 130 |
| Violation | Occurrence | |
| | MsrA _{Red} | MsrA _{Ox} |
| Distance violation | | |
| > 0.0 Å | 96 ± 12 | 90 ± 11 |
| > 0.1 Å | 9 ± 3 | 9 ± 3 |
| > 0.2 Å | 0 | 0 |
| Dihedral violation | | |
| > 0 degrees | 36 ± 8 | 31 ± 7 |
| > 5 degrees | 0 | 0 |
| Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR) | | |
| Residues in the most favorable region (%) | 82.6 | 82.2 |
| Residues in additional allowed regions (%) | 17.3 | 17.4 |
| Residues in generously allowed regions (%) | 0.1 | 0.4 |
| Residues in disallowed regions (%) | 0 | 0 |
| Atoms | rmsd (Å) | |
| | MsrA _{Red} | MsrA _{Ox} |
| Backbone (12-193) | 0.85 ± 0.14 | (12-121, 133-194) 0.85 ± 0.14 |
| Heavy (12-193) | 1.64 ± 0.21 | (12-121, 133-194) 1.62 ± 0.19 |

^a Each Hydrogen bond is treated as two distance restraints so that 73 hydrogen bonds lead to 146 distances restraints.

Table II. Structural comparison of the MsrA_{Red} and MsrA_{Ox} Tyr₁₉₅-Cys₁₉₈ segment.

| Residue | MsrA _{Red} | | MsrA _{Ox} | |
|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | ϕ (deg.) | ψ (deg.) | ϕ (deg.) | ψ (deg.) |
| Tyr ₁₉₅ | -103 ± 5 | 12 ± 10 | -95 ± 3 | 16 ± 14 |
| Gly ₁₉₆ | -68 ± 10 | -161 ± 7 | -106 ± 19 | 65 ± 43 |
| Tyr ₁₉₇ | -81 ± 28 | 124 ± 10 | -65 ± 12 | 139 ± 16 |
| Cys ₁₉₈ | -129 ± 10 | 166 ± 96 | -80 ± 30 | -67 ± 96 |

Figure 1

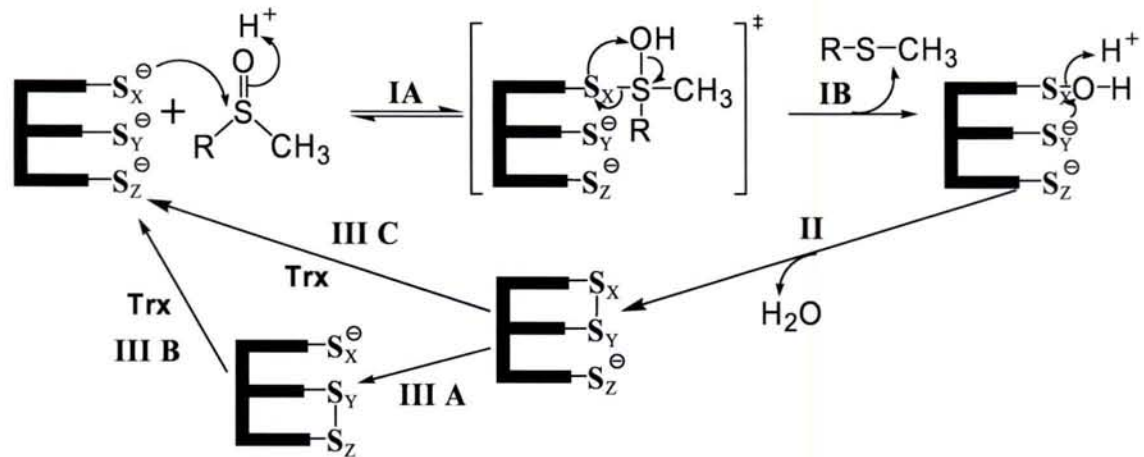


Figure 1. Catalytic Mechanism of *E. coli* MsrA (from ref. 3). Attack of Cys_X on the sulfur atom of the sulfoxide substrate leads to formation of a sulfuranium³² (step IA), the rearrangement of which leads to formation of a sulfenic acid intermediate (step IB). Attack of Cys_Y on the sulfur atom of the sulfenic acid intermediate leads to the formation of a disulfide bond between Cys_X and Cys_Y and the release of a molecule of water, facilitated by acid catalysis (step II). Return of the active site to a fully reduced state proceeds by a thiol-disulfide exchange with Cys_Z and a thioredoxin regenerating system (steps IIIA and IIIB). When Cys_Z is not present, as is the case for *M. tuberculosis* MsrA, the disulfide bond between Cys_X and Cys_Y is reduced by Trx (Step IIIC). RSOCH₃ and RSCH₃ represent MetSO and Met, respectively. For *E. coli* MsrA, X = C51, Y = C198 and Z = C206.

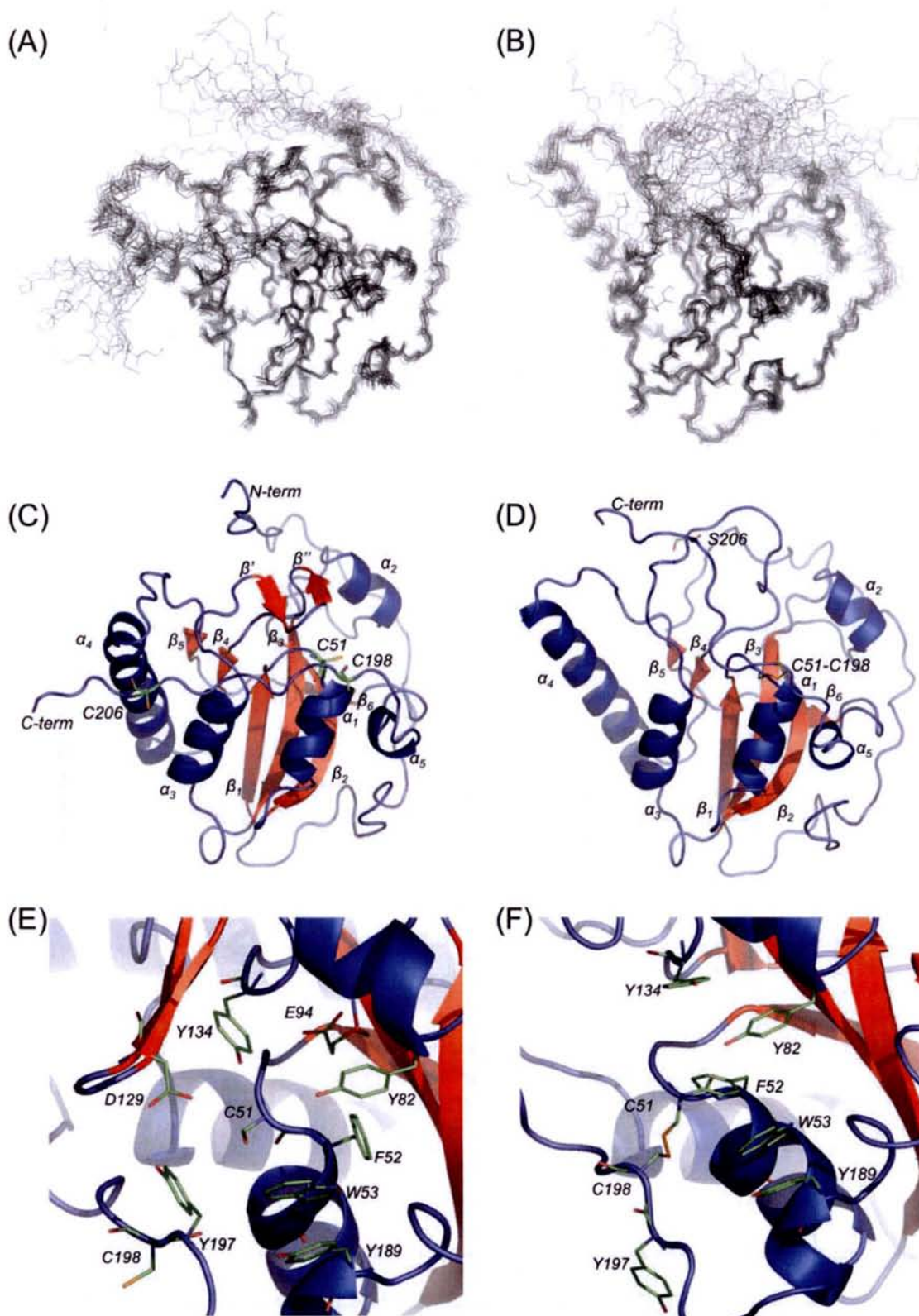


Figure 2. Overall solution structures and active sites of MsrA_{Red} and MsrA_{Ox}. Backbone superimposition of the set of the 20 final structures for MsrA_{Red} (A: residues 12 to 193) and MsrA_{Ox} (B: residues 12 to 121 and 133 to 194); Symbolic representation of the different secondary structure elements for MsrA_{Red} (C) and MsrA_{Ox} (D). Active sites of the most representative structure of MsrA_{Red} (E) and MsrA_{Ox} (F); Backbones are represented by a blue ribbon; essential amino acids are also shown with their side-chain.

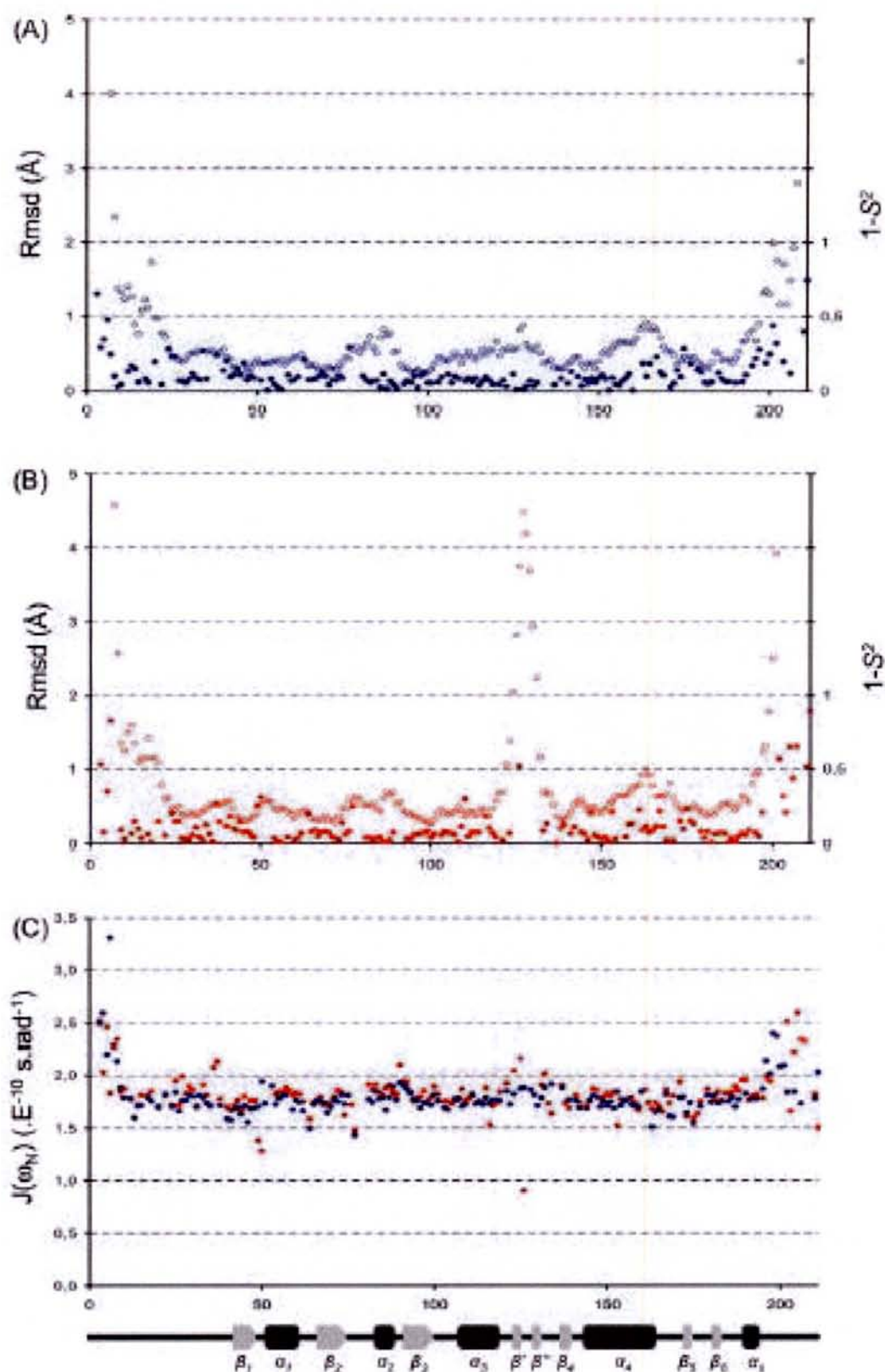


Figure 3. Backbone rmsd distribution and order parameters S^2 as a function of the residue number along the MsrA_{Red} (A) and MsrA_{Ox} (B) sequence (open symbols: rmsd in Å; filled symbols: order parameter S^2). $J(\omega_N)$ values obtained through spectral density mapping (C) for both forms of *E. coli* MsrA (blue symbols for MsrA_{Red} and red symbols for MsrA_{Ox}).

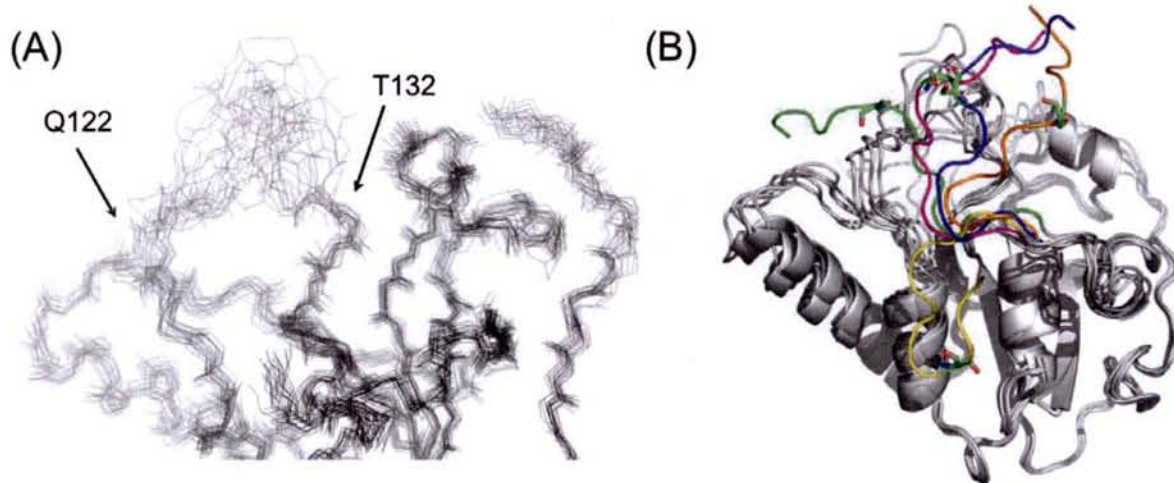


Figure 4. Gln₁₂₂-Thr₁₃₂ segment conformation in the 20 final structures (A) and C-terminus conformation (different color) of the 5 most representative structures (B) of MsrA_{Ox} in solution. The rest of the backbone is figured by a grey ribbon.

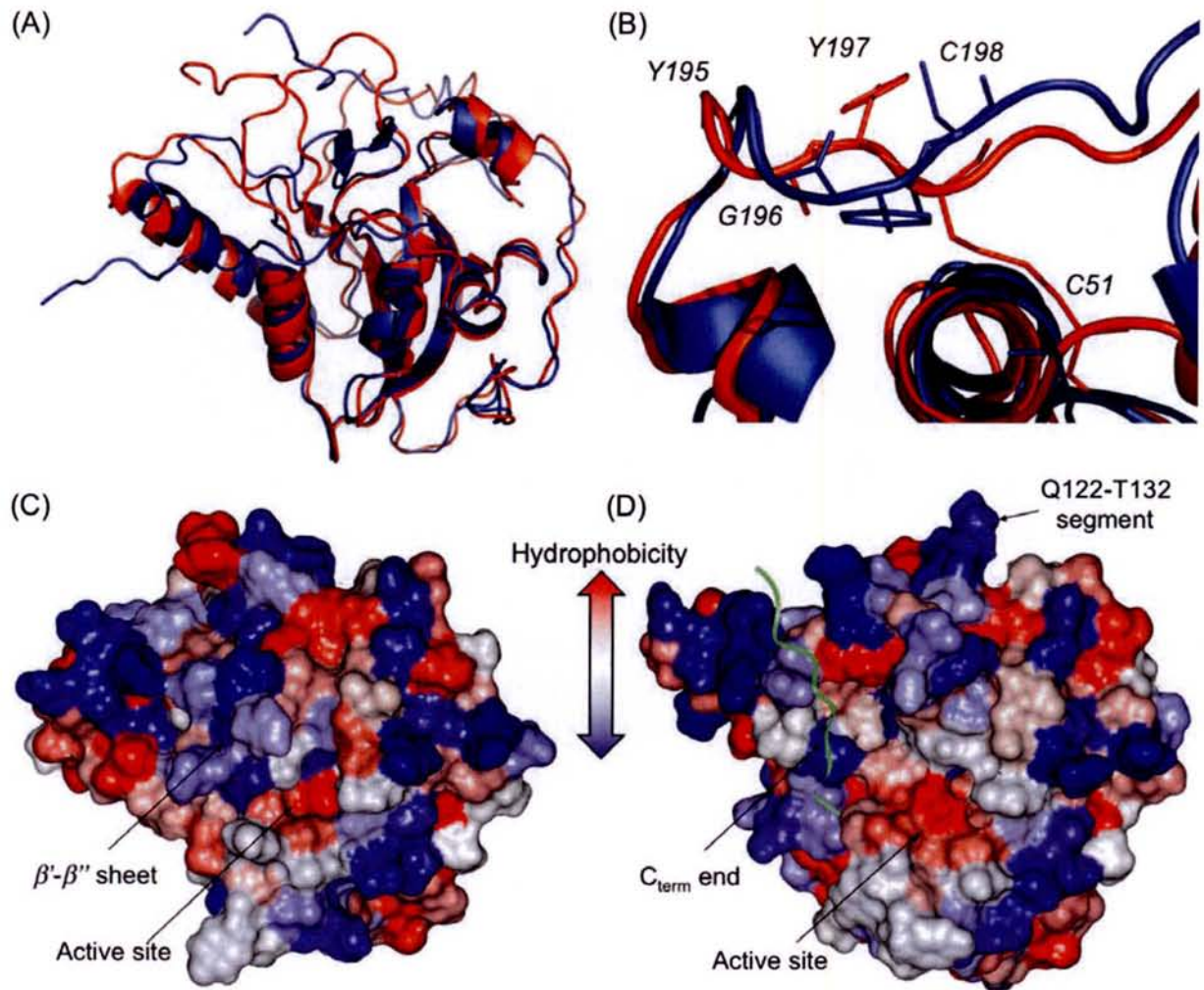


Figure 5. (A) Superimposition of the solution backbone structure of MsrA_{Red} (blue ribbon) with that of MsrA_{Ox} (red ribbon). (B) Comparison between the solution structure of MsrA_{Red} Tyr₁₉₅-Cys₁₉₈ segment (blue residues) with that of MsrA_{Ox} (red residues). Hydrophobic Connolly surfaces of MsrA_{Red} (C) and MsrA_{Ox} (D) in solution.

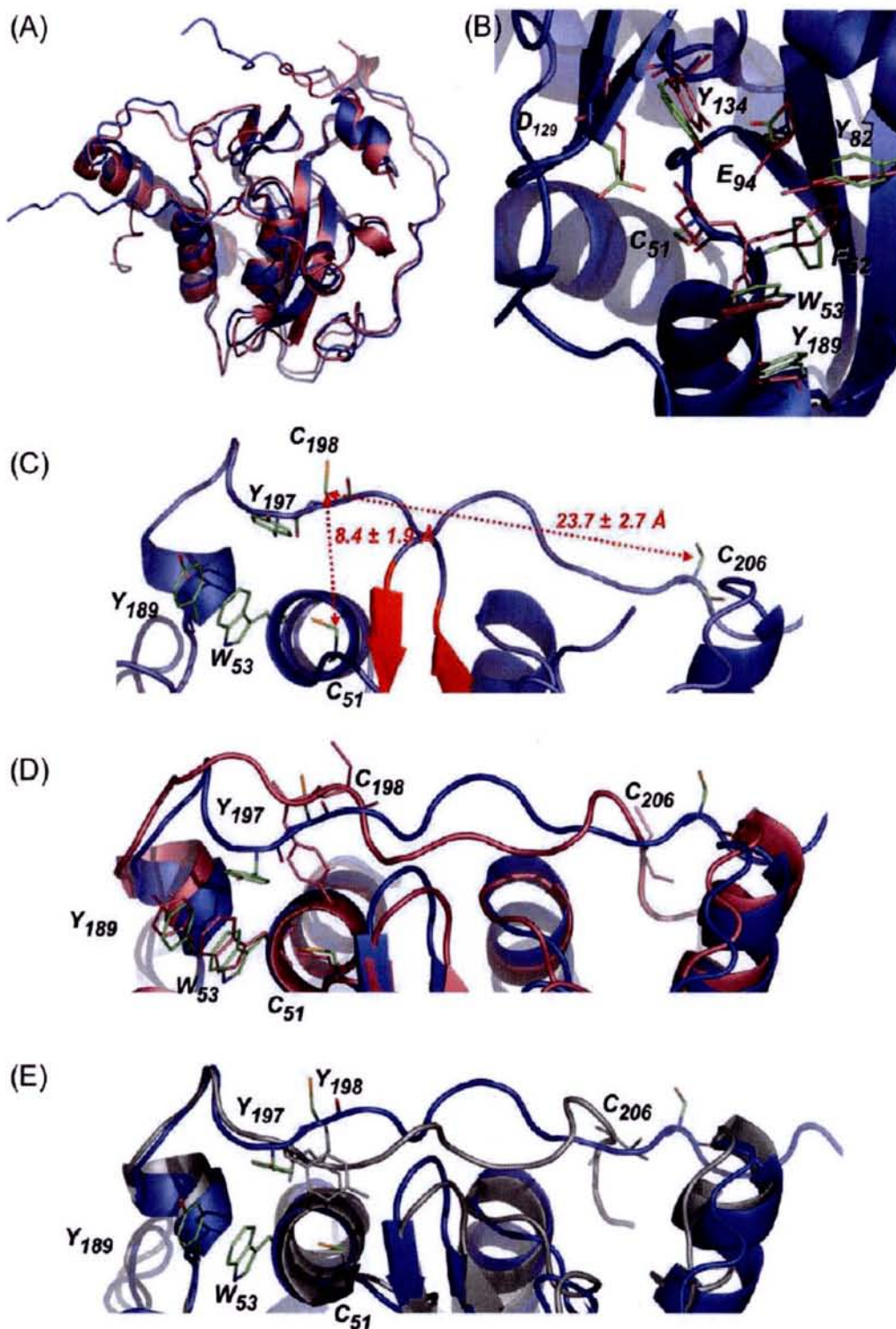


Figure 6. (A) Superimposition of the solution backbone structure of MsrA_{Red} (blue ribbon) with X-Ray structure of MsrA^{*E.coli*} (salmon ribbon). (B) Active site comparison between MsrA_{Red} in solution (green residues) and X-Ray structure of MsrA^{*E.coli*} (salmon residues). (C) C-terminus conformation of the most representative structure of MsrA_{Red} in solution. (D) Comparison between C-terminus of MsrA_{Red} in solution (blue ribbon and green residues) with X-Ray structure of MsrA^{*E.coli*} (red ribbon and black residues). (E) Comparison between C-terminus of MsrA_{Red} in solution (blue ribbon and green residues) with X-Ray structure of MsrA^{*B.tau*} (grey ribbon and black residues)

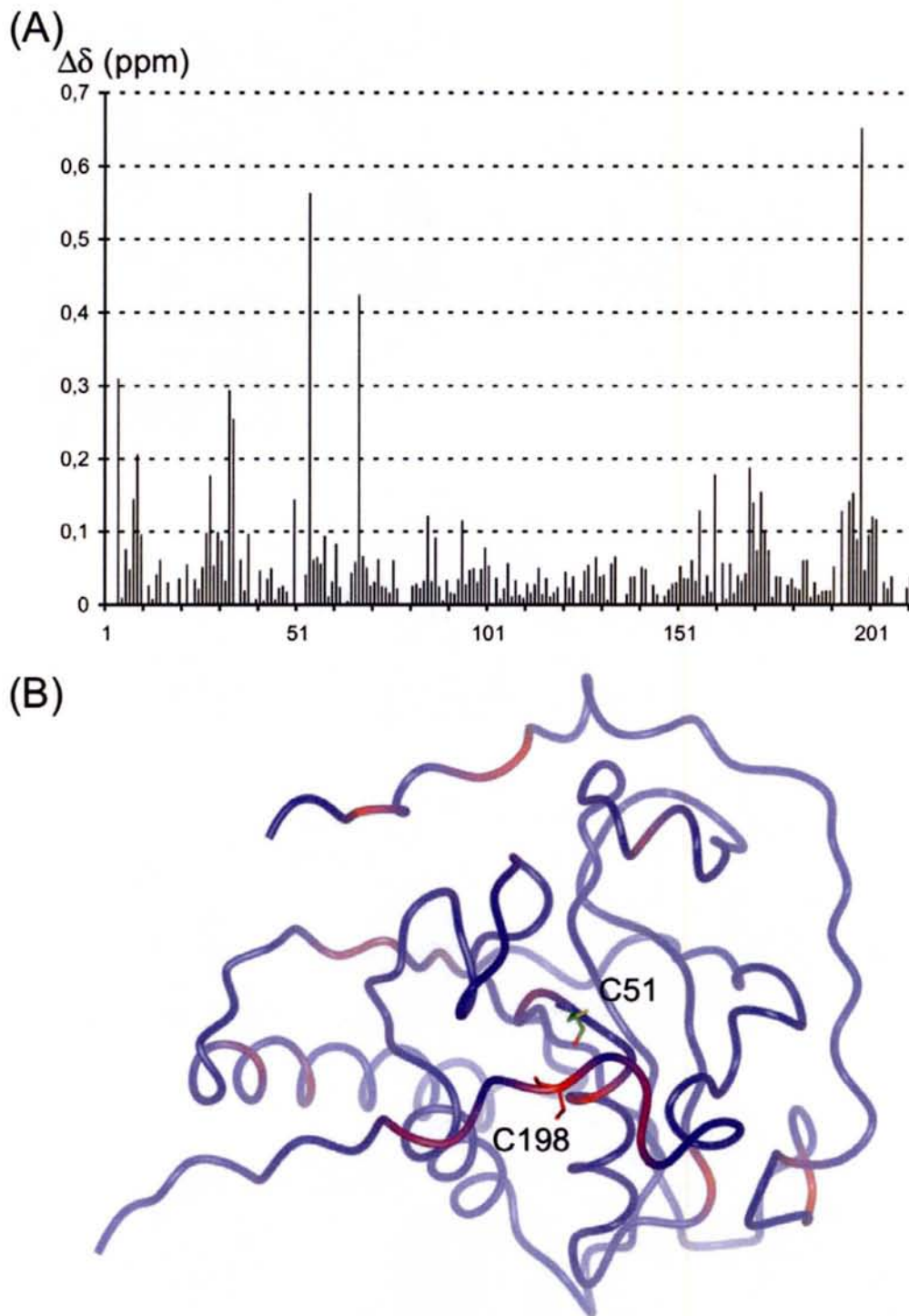


Figure 7. (A) Chemical shift perturbations ($\Delta\delta$) of the C51A MsrA^{E.coli} backbone amide groups upon binding with the Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe substrate. The combined ¹H and ¹⁵N chemical shift differences, calculated using the equation $\Delta\delta = |\Delta\delta^{15}\text{N}|/f + |\Delta\delta^1\text{H}|$, where f is the scaling factor ($f = 5.5$) used to normalize the ¹H and ¹⁵N chemical shifts²⁶ were plotted against residue number. Large chemical shift perturbations were observed for the following residues: Asp₄, Leu₈, Val₉, His₂₈, His₃₃, Ser₃₄, Gly₅₀, Gly₅₄, Ser₆₇, Val₈₅, Glu₉₄, Phe₁₅₆, Met₁₆₀, Ile₁₆₉, Thr₁₇₀, Glu₁₇₂, Asn₁₉₃, Tyr₁₉₅, Gly₁₉₆, Cys₁₉₈, Gly₂₀₁ and Gly₂₀₂. (B) Structure mapping of the chemical shift variation of C51A MsrA^{E.coli} upon substrate binding generated (in red) onto the ribbon representation of the MsrA_{Rcd} 3D solution structure which corresponds to significantly perturbed residues ($\Delta\delta > 0,1$ ppm).

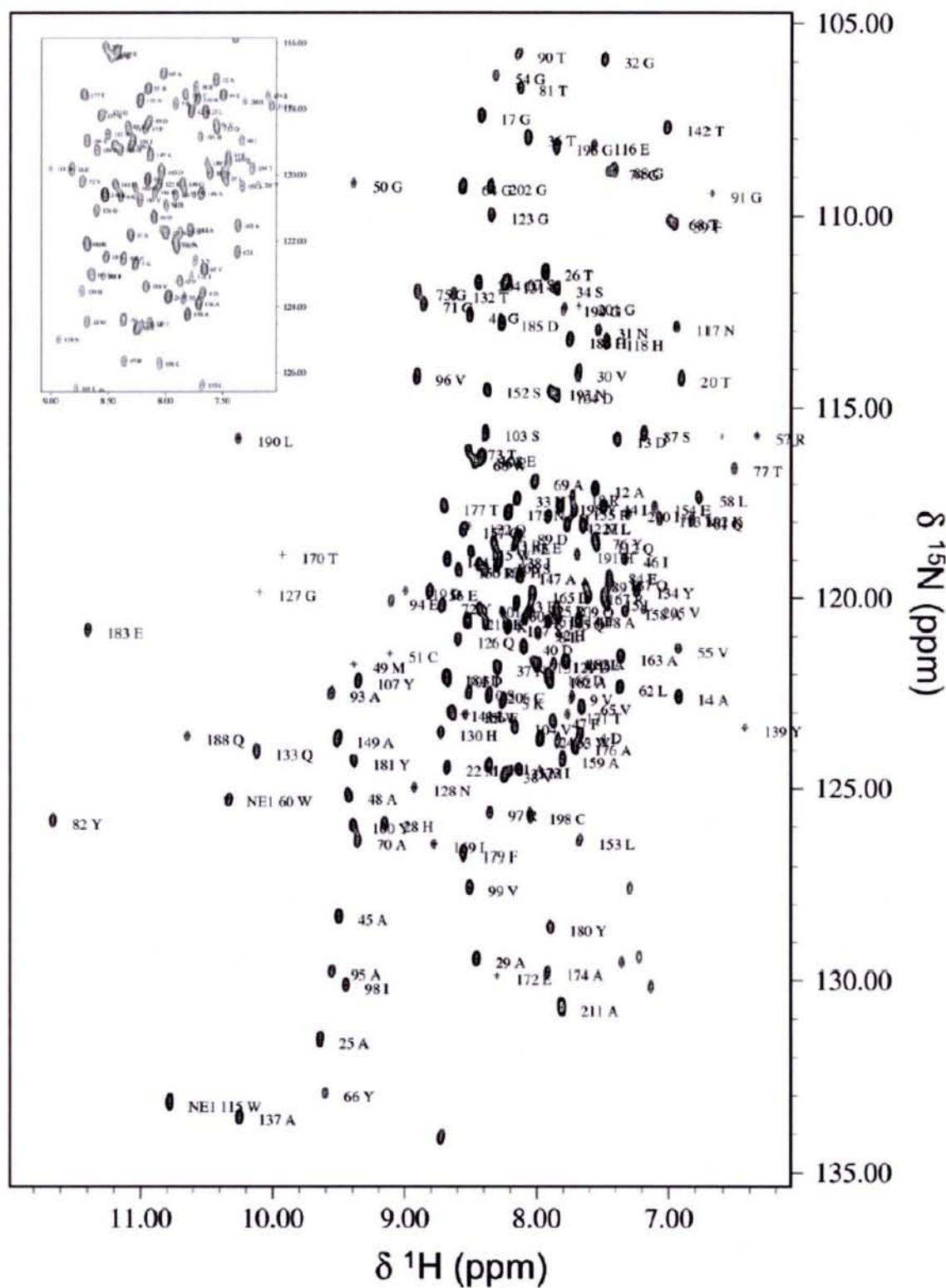


Figure S1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the reduced form of C86S/C206S MsrA uniformly labeled with ^{15}N , recorded at a ^1H frequency of 600 MHz, 1 mM, in a 95% H_2O /5% D_2O mixture, with 50 mM phosphate buffer (pH 7.1) at 298 K.

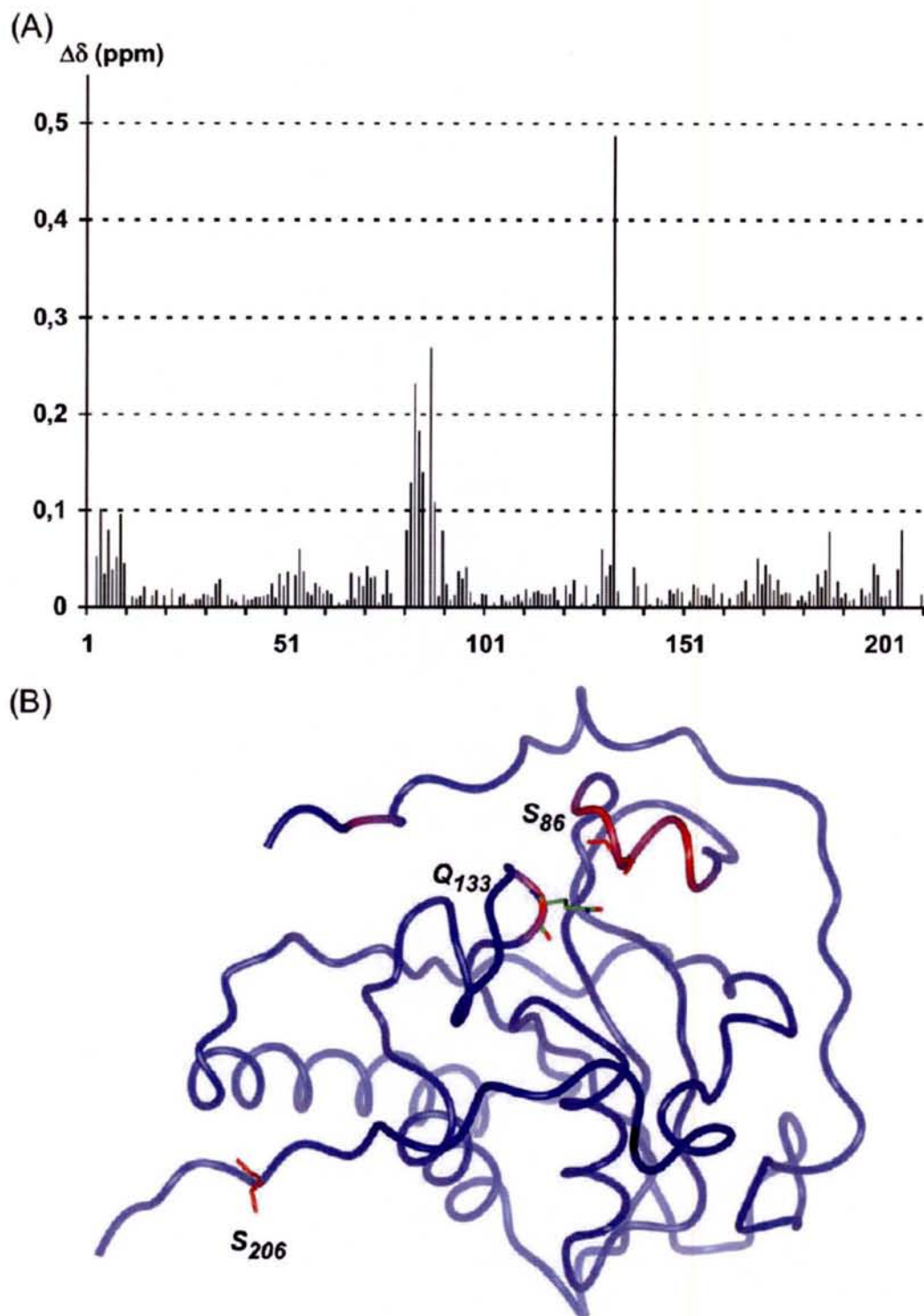


Figure S2. (A) Chemical shift perturbations ($\Delta\delta$) of MsrA_{Red} backbone amide groups upon the C86S/C206S mutation. The combined ^1H and ^{15}N chemical shift differences, calculated using the equation $\Delta\delta = |\Delta\delta^{15}\text{N}|/f + |\Delta\delta^1\text{H}|$, where f is the scaling factor (equal to 5.5) used to normalize the ^1H and ^{15}N chemical shifts²⁶ were plotted against residue numbers. (B) Structure mapping of the chemical shift variation of MsrA_{Red}, the C86S/C206S mutation generated (in red) onto the ribbon representation of the MsrA_{Red} 3D solution structure which corresponds to significantly perturbed residues ($\Delta\delta > 0,1$ ppm). The location of Ser₈₆, Gln₁₃₃ and Ser₂₀₆ residues is also shown.

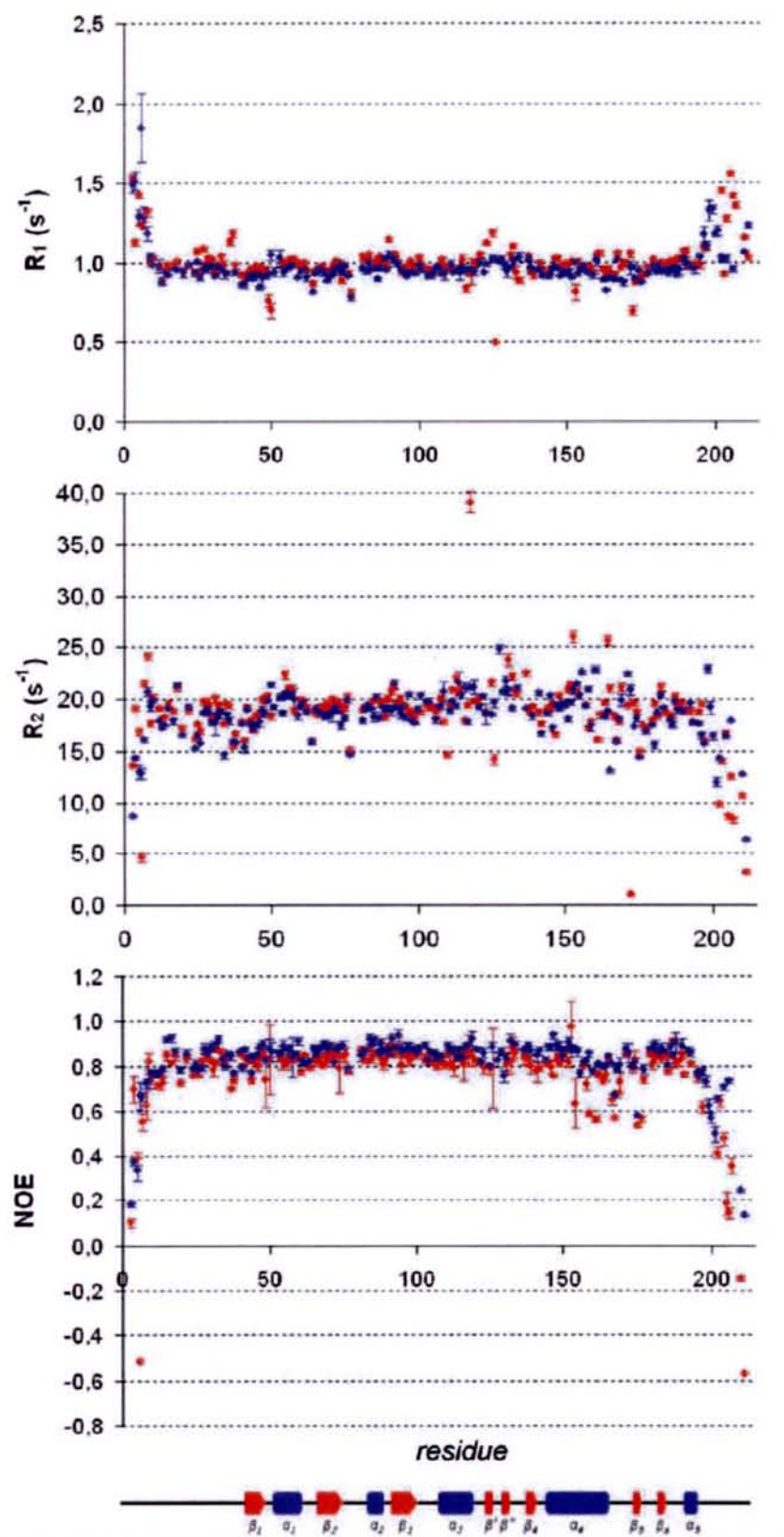


Figure S3. ¹⁵N relaxation parameters R_1 (spin-lattice relaxation rate constant, top), R_2 , (spin-spin relaxation rate constant, middle) and ¹H-¹⁵N steady-state heteronuclear NOE (bottom) of MsrA_{Rcd} (in blue) and MsrA_{Ox} (in red) as a function of the residue number. The error bars represent standard deviations in the estimated parameters.

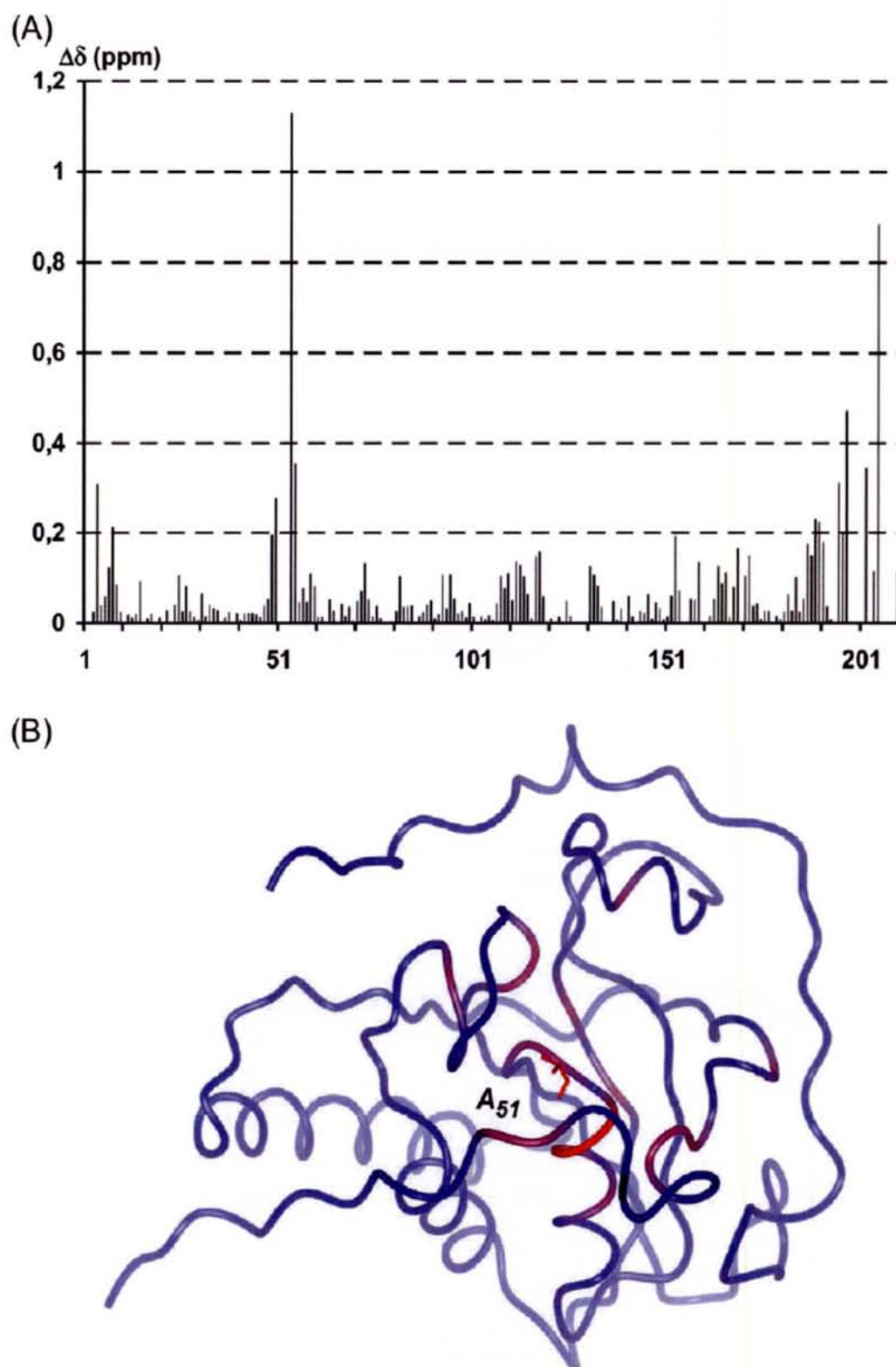


Figure S4. (A) Chemical shift perturbations ($\Delta\delta$) of MsrA_{Red} backbone amide groups upon the C51A mutation. The combined ^1H and ^{15}N chemical shift differences, calculated using the equation $\Delta\delta = |\Delta\delta^{15}\text{N}|/f + |\Delta\delta^1\text{H}|$, where f is the scaling factor (equal to 5.5) used to normalize the ^1H and ^{15}N chemical shifts²⁶) were plotted against residue numbers. (B) Structure mapping of the chemical shift variation of MsrA_{Red}, the C51A mutation generated (in red) onto the ribbon representation of the MsrA_{Red} 3D solution structure which corresponds to significantly perturbed residues ($\Delta\delta > 0,1$ ppm). The location of Ala₅₁ residue is also shown.

Matériels et Méthodes

La majorité des techniques enzymatiques utilisées au cours de cette thèse étant décrite en détail dans les articles présentés dans la partie Résultat de ce mémoire, seules les techniques de génie génétique, de production et purification des enzymes et de détermination des potentiels rédox seront décrites en détail dans cette partie.

I Matériel biologique et milieux de culture

I.1 Souches bactériennes

- *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique.
- *E. coli* BE002 : MG1655 *msrA* :: *spec* Ω , *msrB* :: α 3*kan*. Cette souche est utilisée pour la production du type sauvage et des mutants des MsrA de *N. meningitidis* et d'*E. coli*.
- *E. coli* BL21 (DE3) : F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- m_B^-) *gal*, *dcm*. Cette souche qui contient l'ORF codant la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *lac* est utilisée pour la production du type sauvage et des mutants des MsrA d'*E. coli* de marquées avec l'isotope ¹⁵N et ¹⁵N-¹³C.

I.2 Vecteurs plasmidiques

- pSKPILBMsra : Phagemide recombinant pBluescript II SK (+) portant la séquence codante de la MsrA de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lac* (Olry *et al.*, 2002). Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline.
- pETMsra : Phagemide recombinant pET-20b portant la séquence codante de la MsrA d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur T7. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.

I.3 Milieux de culture bactérienne

I.3.1 Milieu riche LB

Composition : 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 de plasmide pSKPILBMsra *N. meningitidis* et pETMsra *E. coli* et des protéines recombinantes correspondantes. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/L de milieu de culture avant stérilisation. Les milieux sont

Matériels et Méthodes

autoclavés 20 min à 120 °C. Afin de sélectionner les clones recombinants, l'antibiotique approprié est ajouté à une concentration de 200 mg/L après stérilisation.

I.3.2 Milieu minimum M9

Composition : NaCl (0,5 g/L), KH₂PO₄ (22 mM), Na₂HPO₄, 7H₂O (50 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 (2 mM), FeSO₄, 7H₂O (25 mg/L).

Ce milieu est utilisé pour les productions de la MsrA d'*E. coli* marquée ¹⁵N ou ¹⁵N-¹³C, après ajout de ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) ou ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) et ¹³C glucose (4g/L).

I.3.3 Milieu riche SOB

Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM). Ce milieu est utilisé lors de la préparation de cellules compétentes (voir chapitre II.1.4) Le milieu est autoclavé 20 min à 120 °C.

II Techniques de génie génétique

II.1 Préparation de l'ADN plasmidique

II.1.1 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 heure à 37°C par la ribonucléase A (1 µg/ml).

II.1.2 La maxipréparation

Cette technique est utilisée pour la préparation en grande quantité d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne de 100 mL. Après lyse alcaline des cellules et centrifugation, l'ADN plasmidique est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (Machery Nagel) qui repose sur l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique élué est concentré par précipitation à l'isopropanol, lavé à l'éthanol à 70% et enfin séché et repris dans du tampon Tris 10 mM EDTA 2mM pH 8,0.

La concentration de l'ADN ainsi obtenu est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm en admettant qu'une unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée à partir du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} , qui doit être compris entre 1,8 et 2.

II.1.3 Séquençage de l'ADN double brin

Le séquençage par méthode enzymatique est utilisé afin de vérifier l'introduction correcte des mutations ainsi que l'absence de mutations parasites sur le plasmide, en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7. Une première étape consiste à préparer l'ADN plasmidique sous forme dénaturée à l'aide de NaOH 2M afin de permettre, dans une deuxième étape, l'hybridation de l'oligodesoxyribonucléotide de séquençage. La troisième étape de séquençage est réalisée avec la T7 ADN polymérase dont l'activité permet l'élongation du brin d'ADN (Tabor et Richardson, 1987). L'élongation est stoppée après incorporation d'un didésoxyribonucléotide sur le brin d'ADN en élongation. La séquence d'ADN est marquée au ^{33}P grâce à de l' $\alpha^{33}PdATP$ dans le mélange réactionnel d'élongation. La séquence d'ADN est analysée après migration sur un gel de polyacrylamide et révélation par autoradiographie.

II.1.4 Préparation et transformation des bactéries compétentes

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5 α , BE002 et BL21(DE3). Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB à une température comprise entre 35 et 37°C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 30 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans $1/10^{ème}$ du volume initial de solution TB, en présence de diméthyle sulfoxyde (7%

final) et incubée 2 heures dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80°C (Inoue *et al.*, 1990).

La méthode classique de transformaton des bactéries compétentes (Sambrook, 1989) est réalisée en mélangeant 1 ng de plasmide et 50 µl de bactéries compétentes. Après incubation sur glace, le mélange est soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis les cellules sont régénérées 1 heure 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.

II.2 Mutagenèse du matériel plasmidique

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du Kit «QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit» commercialisé par Stratagène. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* 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 religuées.

Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn I* (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 *Dpn I*. 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.

III Production et purification des MsrA de *N. meningitidis*

III.1 Production des protéines recombinantes

Les MsrA de *N. meningitidis*, sauvages et mutées, non marquées sont surproduites dans la souche d'*E. coli* BE002 transformée par le plasmide recombinant pSKPILBMsrA

portant l'ORF de la protéine à produire. Typiquement, quatre litres de LB sontensemencées au $1/50^{\text{ème}}$ à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB en présence d'ampicilline (200 mg/l), de spectinomycine (25 mg/l) et de kanamycine (50 mg/l). Les cultures sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C en milieu LB sous agitation, en présence d'ampicilline (200 mg/L).

Les cultures des cellules d'*E. coli* BL21(DE3), transformées avec les vecteurs plasmidiques pETMsrA permettant la surexpression de la MsrA d'*E. coli*, sontensemencées au $1/50^{\text{ème}}$ à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB (protéine non marquée) ou minimum M9 (protéine marquée ^{15}N ou $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}$) et incubées à 37°C. L'antibiotique de résistance est la kanamycine (200 mg/ml). A une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,6 et 0,8, l'induction de la synthèse de la T7 ARN polymérase est initiée par ajout de 1 mM d'IPTG et conduit à l'induction de la synthèse en grande quantité d'ARN messenger correspondant à la protéine recombinante. La culture est arrêtée de 6 à 18 heures après induction.

Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 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.

III.2 Purification des MsrA

Avant chaque étape, 50 mM en DTT est ajouté à la solution protéique

III.2.1 Désintégration des cellules

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 ml de tampon de purification (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 (Branson Sonifier 250) ou d'un désintégrateur de cellules (Constant Cell Disruption Systems). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 12000 g durant 45 min.

III.2.2 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Le surnageant de sonication est amené à 50% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et précipité 2 heures sous légère agitation à 4°C. A cette concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la MsrA est précipitée, elle est récupérée dans le culot après centrifugation pendant 45 min à 12000 g

III.2.3 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%, Biosepra) dont le domaine de fractionnement se situe entre 5 et 70 kDa. L'élution se fait grâce au tampon de purification et est suivie par la mesure de la $DO_{280\text{ nm}}$. L'analyse des fractions est effectuée par lecture de la $DO_{280\text{ nm}}$ et électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE, 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.

III.2.4 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 (agarose 6% sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium, Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences). L'élution se fait par un gradient linéaire croissant de KCl de 0 à 200 mM sous un débit de 5 ml/min. Les MsrA de *N. meningitidis* sont éluées à environ 50 mM de KCl. Les MsrA d'*E. coli* sont éluées à environ 150 mM de KCl.

Cette étape permet d'éliminer des contaminants protéiques et surtout beaucoup d'acides nucléiques.

III.2.5 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 jusqu'à une concentration de l'ordre de 20-25 DO/mL. Les protéines sont ensuite précipitées en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50% de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservées à -20°C .

III.3 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées

III.3.1 Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

III.3.2 Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon débarrassé de toute 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 fraîchement préparé. 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 de Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer. L'appareil utilisé est un spectromètre ESI-TOF LCT (Waters).

IV Préparation des substrats sulfoxydes

Toutes les expériences faisant intervenir de la MetSO ont été réalisées avec de la *D,L*-Met-*R,S*-SO commerciale (Sigma). Le terme MetSO fait donc référence à ce mélange des 4 diastéréoisomères. La majorité des études enzymatiques ont été réalisées avec le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe, les Msr présentant une meilleure affinité vis-à-vis de ce substrat. La synthèse du substrat doublement protégé Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe est décrite précisément dans la publication Olry *et al.*, 2004.

La synthèse du substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe dont la fonction sulfoxyde est marquée à l'O¹⁸ a été réalisée par Jacques Bodiguel, à partir du protocole décrit par Okruszek, 1983 permettant l'oxydation du DMS en DMSO¹⁸ par H₂O¹⁸, en présence de dibrome et de pyridine, en solvant non aqueux. Cette réaction implique la bromination du sulfure puis l'hydrolyse de ce composé, en présence de pyridine agissant comme accepteur de bromure.



Le DMS a été remplacé par l'AcMetNHMe.

Le produit brut de synthèse a ensuite été purifié au laboratoire. Une étape de chromatographie d'échange de cations sur une colonne SP-Sépharose (Amersham Biosciences) couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences) a permis de se débarrasser du pyridinium présent, l'AcMetSONHMe et l'AcMetNHMe n'étant pas retenue sur la colonne. La colonne est préalablement équilibrée à pH 4,0, le produit étant repris dans la même solution et filtré. L'élution est suivie par la mesure de la DO à 215 et 260 nm. Après la collecte des composés non retenus, les contaminants fixés sur la colonne sont élués par un gradient rapide en KCl, pH 4,0, de 0 à 100 %. Le produit AcMetSONHMe a ensuite été isolé par HPLC préparative en phase inverse à l'aide d'une colonne DeltaPak C₁₈ (Waters) couplée à une chaîne HPLC (Waters), comme décrit par Olry *et al.*, 2004. Le produit est ensuite lyophilisé et conservé à -80°C.

V Techniques d'étude enzymatique

Toutes nos études ont été effectuées avec des préparations enzymatiques réduites préalablement par 50 mM de DTT pendant 30 min qui subissent ensuite deux dialyses contre le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 sous un flux d'azote. Cette procédure permet d'obtenir des enzymes à l'état réduit et sans trace de DTT.

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire théoriques déterminés par la méthode de Gill et Von Hippel (Gill et von Hippel, 1989): MsrA de *N. meningitidis* $\epsilon = 26200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; MsrA d'*E. coli* $\epsilon = 34632 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

V.1 Récapitulatif des procédures décrites dans les publications et manuscrits

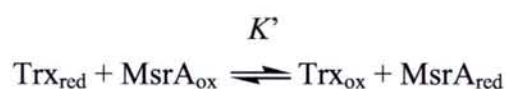
Les procédures expérimentales suivantes sont explicitées en détail dans la publication Antoine *et al.*, 2003 ou les manuscrits 3 et 4 présentés dans la partie Résultats :

- Utilisation de sondes chimiques spécifiques des Cys. Deux sondes ont été utilisées : le DTNB et le 2PDS, à pH 8 ou en fonction du pH. L'utilisation de ces réactifs a permis de suivre la vitesse de l'étape réductase par quantification des groupements thiols libres de la MsrA, de déterminer les pK_{app} des résidus Cys de la MsrA, d'activer des mutants monocystéiniques de la MsrA et de suivre la cinétique de formation des complexes avec le mutant C35S de la Trx.

- Titration directe de l'ionisation des thiols des Cys51 et Cys198 de la MsrA par spectroscopie UV.
- Détermination des paramètres cinétiques K_M et k_{cat} en présence du système réducteur Trx/Trx réductase/NADPH à l'état stationnaire.
- Spectroscopie de fluorescence : Les résidus Trp de la MsrA de *N. meningitidis* et de la Trx ont été utilisées comme sonde spectroscopique afin d'étudier à l'état pré-stationnaire la vitesse de formation du pont disulfure de la MsrA ou de la Trx, en cinétique classique ou rapide, à pH fixe ou variable.
- Quantification de la Met et de l'Ac-L-Met-NHMe par chromatographie en phase inverse : Cette technique a permis de suivre la vitesse de l'étape réductase de la MsrA à l'état pré-stationnaire après mélange rapide résolu en temps.

V.2 Equilibre rédox et séparation des formes réduites et oxydée à l'état disulfure des MsrA et Trx

La méthodologie utilisée consiste à mesurer directement la constante d'équilibre rédox protéine-protéine (K') entre la MsrA et la Trx. La procédure utilisée est similaire à la technique décrite par Aslund *et al.*, 1997.



Les mélanges réactionnels contenaient 50 μM de chacune des deux protéines dans un volume final de 300 μL , en présence de tampon phosphate de potassium 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 préalablement dégazé. La réaction rédox a été déclenchée par le mélange des deux protéines, l'une réduite et l'autre oxydée, puis laissée à équilibrer pendant 20 heures à 25°C. La réaction a été arrêtée par acidification en ajoutant du TFA à une concentration finale de 0,1 %. Les quatre formes rédox Trx_{red} , MsrA_{ox} , Trx_{ox} et MsrA_{red} ont ensuite été séparées par chromatographie analytique en phase inverse dans un tampon aqueux contenant 0,1 % de TFA avec un débit de 1 mL/min sur une colonne BrownLee Aquapore RP300 C₈ (Applied

Matériels et Méthodes

Biosystems) couplée à un système AKTA explorer (Amersham Bioscience). Le gradient appliqué était soit un gradient de 0 à 80 % d'acétonitrile en 20 volumes colonne, soit un double gradient d'abord de 0 à 40 % d'acétonitrile en 1 volume colonne, suivi par un gradient de 40 à 60 % d'acétonitrile en 5 volumes colonne. L'élution des protéines est suivie par la mesure de la DO à 280 et 260nm. La quantification des quatre espèces protéiques est réalisée par intégration des pics à 280 nm.

Bibliographie

Abu-Omar, M. M. et Khan, S. I. (1998) Molecular rhenium(V) oxotransferases: Oxidation of thiols to disulfides with sulfoxides. The case of substrate-inhibited catalysis. Inorg. Chem., 37, 4979-4985.

Adams, B., Smith, A. T., Bailey, S., McEwan, A. G. et Bray, R. C. (1999) Reactions of dimethylsulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* with dimethyl sulfide and with dimethyl sulfoxide: complexities revealed by conventional and stopped-flow spectrophotometry. Biochemistry, 38, 8501-11.

Alamuri, P. et Maier, R. J. (2004) Methionine sulphoxide reductase is an important antioxidant enzyme in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol., 53, 1397-406.

Allison, W. S. (1976) Formation and Reactions of Sulfenic Acids in Proteins. Accounts of Chemical Research, 9, 293-299.

Anbanandam, A., Bieber Urbauer, R. J., Bartlett, R. K., Smallwood, H. S., Squier, T. C. et Urbauer, J. L. (2005) Mediating molecular recognition by methionine oxidation: conformational switching by oxidation of methionine in the carboxyl-terminal domain of calmodulin. Biochemistry, 44, 9486-96.

Andersen, O. S. et Koeppe, R. E., 2nd (1992) Molecular determinants of channel function. Physiol. Rev., 72, S89-158.

Andreae, M. (1997) Atmospheric aerosols: biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. Science, 276, 1052-1058.

Argyrou, A. et Blanchard, J. S. (2004) Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 78, 89-142.

Arterburn, J. B. et Nelson, S. L. (1996) Rhenium-catalyzed oxidation of sulfides with phenyl sulfoxide. Journal of Organic Chemistry, 61, 2260-2261.

Arterburn, J. B., Perry, M. C., Nelson, S. L., Dible, B. R. et Holguin, M. S. (1997) Rhenium-catalyzed oxidation of thiols and disulfides with sulfoxides. Journal of the American Chemical Society, 119, 9309-9310.

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.

Bakala, H., Delaval, E., Hamelin, M., Bismuth, J., Borot-Laloi, C., Corman, B. et Friguet, B. (2003) Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. Eur. J. Biochem., 270, 2295-302.

Beal, M. F. (2003) Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci., 991, 120-31.

Bibliographie

Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2006) Theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols. J. Phys. Chem. A, 110, 7628-36.

Bell, A. F., He, X., Ridge, J. P., Hanson, G. R., McEwan, A. G. et Tonge, P. J. (2001) Active site heterogeneity in dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* revealed by Raman spectroscopy. Biochemistry, 40, 440-8.

Beraud, S., Chambost, J. P., Bersch, B., Gans, P., Barras, F. et Marion, D. (2001) Backbone H(N), N, C α , C' and C β assignment of the 25 kDa peptide methionine sulfoxide reductase from *Erwinia chrysanthemi*. J. Biomol. NMR, 20, 97-8.

Beraud, S., Bersch, B., Brutscher, B., Gans, P., Barras, F. et Blackledge, M. (2002) Direct structure determination using residual dipolar couplings: reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution. J. Am. Chem. Soc., 124, 13709-15.

Bigelow, D. J. et Squier, T. C. (2005) Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 121-34.

Biteau, B., Labarre, J. et Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. Nature, 425, 980-4.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, 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., 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.

Bota, D. A. et Davies, K. J. (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. Nat. Cell Biol., 4, 674-80.

Bray, R. C., Adams, B., Smith, A. T., Bennett, B. et Bailey, S. (2000) Reversible dissociation of thiolate ligands from molybdenum in an enzyme of the dimethyl sulfoxide reductase family. Biochemistry, 39, 11258-11269.

Brot, N. et Weissbach, H. (2000) Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. Biopolymers, 55, 288-96.

Bruice, T. C. et Sayigh, A. B. (1959) The Structure of Anthraquinone-1-sulfenic Acid (Fries' Acid) and Related Compounds. J. Am. Chem. Soc., 81, 3416-20.

Buhrman, G., Parker, B., Sohn, J., Rudolph, J. et Mattos, C. (2005) Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond. Biochemistry, 44, 5307-16.

- 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.
- Calligaris, M.** (2004) Structure and bonding in metal sulfoxide complexes: an update. Coordination Chemistry Reviews, 248, 351-375.
- Cammack, R. et Weiner, J. H.** (1990) Electron paramagnetic resonance spectroscopic characterization of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. Biochemistry, 29, 8410-6.
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A. et Alvarez, B.** (2003) Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. Biochemistry, 42, 9906-14.
- Carlsson, F. H. et Louw, A. I.** (1978) The oxidation of methionine and its effect of the properties of cardiotoxin VIII from *Naja melanoleuca* venom. Biochim. Biophys. Acta, 534, 322-30.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. et Ryu, S.** (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. Cell, 105, 103-13.
- Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G. et Ryu, S. E.** (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. Nat. Struct. Biol., 5, 400-6.
- Chu, J. W. et Trout, B. L.** (2004) On the mechanisms of oxidation of organic sulfides by H₂O₂ in aqueous solutions. J. Am. Chem. Soc., 126, 900-908.
- Chu, J. W., Yin, J., Wang, D. I. C. et Trout, B. L.** (2004) Molecular dynamics simulations and oxidation rates of methionine residues of granulocyte colony-stimulating factor at different pH values. Biochemistry, 43, 1019-1029.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. et Hoshi, T.** (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 94, 9932-7.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. et Hoshi, T.** (1999) Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. FEBS Lett., 442, 48-52.
- Cioslowski, J. et Mixon, S. T.** (1993) Rigorous Interpretation of Electronic Wave-Functions .2. Electronic-Structures of Selected Phosphorus, Sulfur, and Chlorine Fluorides and Oxides. Inorg. Chem., 32, 3209-3216.
- Claiborne, A., Ross, R. P. et Parsonage, D.** (1992) Flavin-linked peroxide reductases: protein-sulfenic acids and the oxidative stress response. Trends Biochem. Sci., 17, 183-6.

Bibliographie

Crane, E. J., 3rd, Parsonage, D. et Claiborne, A. (1996) The active-site histidine-10 of enterococcal NADH peroxidase is not essential for catalytic activity. Biochemistry, 35, 2380-7.

Davies, J. A. (1981) Adv. Inorg. Chem. Radiochem., 24, 115.

Davies, K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie, 83, 301-10.

Davis, D. A., Newcomb, F. M., Moskovitz, J., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Kaufman, J., Fales, H. M., Levine, R. L. et Yarchoan, R. (2000) HIV-2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulfoxide reductase. Biochem. J., 346 Pt 2, 305-11.

Davis, F. A. et Billmers, R. L. (1981) Chemistry of Sulfenic Acids .4. The 1st Direct Evidence for the Involvement of Sulfenic Acids in the Oxidation of Thiols. J. Am. Chem. Soc., 103, 7016-7018.

Davis, F. A., Jenkins, L. A. et Billmers, R. L. (1986) Chemistry of Sulfenic Acids .7. Reason for the High Reactivity of Sulfenic Acids - Stabilization by Intramolecular Hydrogen-Bonding and Electronegativity Effects. J. Org. Chem., 51, 1033-1040.

Dawson, T. M. et Dawson, V. L. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. Science, 302, 819-22.

del Campillo-Campbell, A., Dykhuizen, D. et Cleary, P. P. (1979) Enzymic reduction of d-biotin d-sulfoxide to d-biotin. Methods Enzymol., 62, 379-85.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. et Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. Cell, 111, 471-81.

DeMaster, E. G., Quast, B. J., Redfern, B. et Nagasawa, H. T. (1995) Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. Biochemistry, 34, 11494-9.

Denu, J. M. et Tanner, K. G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. Biochemistry, 37, 5633-42.

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.

Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Ficner, R. et Rudolph, M. G. (2005) Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. Cell, 121, 541-52.

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. et Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99, 11908-13.

Dobado, J. A., Martinez-Garcia, H., Molina, J. M. et Sundberg, M. R. (1999) Chemical bonding in hypervalent molecules revised. 2. Application of the atoms in molecules theory to Y(2)XZ and Y(2)XZ(2) (Y = H, F, CH₃; X = O, S, Se; Z = O, S) compounds. J. Am. Chem. Soc., 121, 3156-3164.

Douglas, T., Daniel, D. S., Parida, B. K., Jagannath, C. et Dhandayuthapani, S. (2004) Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages. J. Bacteriol., 186, 3590-8.

Dow, L. K., Changela, A., Hefner, H. E. et Churchill, M. E. (1997) Oxidation of a critical methionine modulates DNA binding of the *Drosophila melanogaster* high mobility group protein, HMG-D. FEBS Lett., 414, 514-20.

Dreizler, H. et Dendle, G. (1964) Z. Naturforsch., 19a, 512.

Dykhuisen, D. (1973) Genetic analysis of the system that reduces biotin-d-sulfoxide in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 115, 662-7.

Ejiri, S. I., Weissbach, H. et Brot, N. (1979) Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 139, 161-4.

Eklund, H., Cambillau, C., Sjoberg, B. M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J. O. et Branden, C. I. (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. EMBO J., 3, 1443-9.

Ellis, H. R. et Poole, L. B. (1997a) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. Biochemistry, 36, 15013-8.

Ellis, H. R. et Poole, L. B. (1997b) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Biochemistry, 36, 13349-56.

Ezraty, B., Grimaud, R., Hassouni, M. E., Moinier, D. et Barras, F. (2004) Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*. EMBO J., 23, 1868-77.

Ezraty, B., Aussel, L. et Barras, F. (2005a) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 221-9.

Ezraty, B., Bos, J., Barras, F. et Aussel, L. (2005b) Methionine sulfoxide reduction and assimilation in *Escherichia coli*: new role for the biotin sulfoxide reductase BisC. J. Bacteriol., 187, 231-7.

Bibliographie

Frelinger, A. L., 3rd et Zull, J. E. (1986) The role of the methionine residues in the structure and function of parathyroid hormone. Arch. Biochem. Biophys., 244, 641-9.

Friguet, B., Bulteau, A. L., Chondrogianni, N., Conconi, M. et Petropoulos, I. (2000) Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. Ann. N. Y. Acad. Sci., 908, 143-54.

Friguet, B. (2006) Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. FEBS Lett., 580, 2910-6.

Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. et Helmann, J. D. (2001) OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 183, 4134-41.

Fuangthong, M. et Helmann, J. D. (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99, 6690-5.

Garton, S. D., Hilton, J., Oku, H., Crouse, B. R., Rajagopalan, K. V. et Johnson, M. K. (1997) Active site structures and catalytic mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase as revealed by resonance raman spectroscopy. J. Am. Chem. Soc., 119, 12906-12916.

Garton, S. D., Temple, C. A., Dhawan, I. K., Barber, M. J., Rajagopalan, K. V. et Johnson, M. K. (2000) Resonance Raman characterization of biotin sulfoxide reductase. Comparing oxomolybdenum enzymes in the ME(2)SO reductase family. J. Biol. Chem., 275, 6798-805.

Geijer, P. et Weiner, J. H. (2004) Glutamate 87 is important for menaquinol binding in DmsC of the DMSO reductase (DmsABC) from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 1660, 66-74.

George, G. N., Hilton, J., Temple, C., Prince, R. C. et Rajagopalan, K. V. (1999) Structure of molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. J. Am. Chem. Soc., 121, 1256-1266.

Gill, S. C. et von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem., 182, 319-26.

Glaser, C. B., Morser, J., Clarke, J. H., Blasko, E., McLean, K., Kuhn, I., Chang, R. J., Lin, J. H., Vilander, L., Andrews, W. H. et al. (1992) Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. J. Clin. Invest., 90, 2565-73.

Glaser, C. B., Yamin, G., Uversky, V. N. et Fink, A. L. (2005) Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 157-69.

Goto, K., Holler, M. et Okazaki, R. (1997) Synthesis, structure, and reactions of a sulfenic acid bearing a novel bowl-type substituent: The first synthesis of a stable sulfenic acid by direct oxidation of a thiol. J. Am. Chem. Soc., 119, 1460-1461.

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.

Hamada, T., Matsunaga, S., Yano, G. et Fusetani, N. (2005) Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. J. Am. Chem. Soc., 127, 110-8.

Hanlon, S. P., Holt, R. A., Moore, G. R. et McEwan, A. G. (1994) Isolation and Characterization of a Strain of *Rhodobacter-Sulfidophilus* - a Bacterium Which Grows Autotrophically with Dimethylsulfide as Electron-Donor. Microbiology-Uk, 140, 1953-1958.

Hanlon, S. P., Toh, T. H., Solomon, P. S., Holt, R. A. et McEwan, A. G. (1996) Dimethylsulfide:acceptor oxidoreductase from *Rhodobacter sulfidophilus*. The purified enzyme contains b-type haem and a pterin molybdenum cofactor. Eur. J. Biochem., 239, 391-6.

Hanlon, S. P., Graham, D. L., Hogan, P. J., Holt, R. A., Reeve, C. D., Shaw, A. L. et McEwan, A. G. (1998) Asymmetric reduction of racemic sulfoxides by dimethyl sulfoxide reductases from *Rhodobacter capsulatus*, *Escherichia coli* and *Proteus* species. Microbiology, 144 (Pt 8), 2247-53.

Hansel, A., Kuschel, L., Hehl, S., Lemke, C., Agricola, H. J., Hoshi, T. et Heinemann, S. H. (2002) Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. FASEB J., 16, 911-3.

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.

Hansel, A., Heinemann, S. H. et Hoshi, T. (2005) Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 239-47.

Harndahl, U., Kokke, B. P., Gustavsson, N., Linse, S., Berggren, K., Tjerneld, F., Boelens, W. C. et Sundby, C. (2001) The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic alpha-helix. Biochim. Biophys. Acta, 1545, 227-37.

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.

Bibliographie

- Higuchi, M.** (1992) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase involvement in defense against oxygen toxicity of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol. Immunol., 7, 309-14.
- Higuchi, M., Yamamoto, Y., Poole, L. B., Shimada, M., Sato, Y., Takahashi, N. et Kamio, Y.** (1999) Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol., 181, 5940-7.
- Himawan, J. S. et Richardson, C. C.** (1996) Amino acid residues critical for the interaction between bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia coli thioredoxin. J. Biol. Chem., 271, 19999-20008.
- Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D. et Brennan, R. G.** (2005) Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. Mol. Cell, 20, 131-41.
- Hoskins, D. D., Whiteley, H. R. et Mackler, B.** (1962) The reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase of *Streptococcus faecalis*: purification and properties. J. Biol. Chem., 237, 2647-51.
- Hou, L., Kang, I., Marchant, R. E. et Zagorski, M. G.** (2002) Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem., 277, 40173-6.
- Huang, W., Jia, J., Cummings, J., Nelson, M., Schneider, G. et Lindqvist, Y.** (1997) Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. Structure, 5, 691-9.
- Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T. et Kumagai, H.** (2002) Plant biochemistry: an onion enzyme that makes the eyes water. Nature, 419, 685.
- Inoue, K., Hoshijima, K., Sakamoto, H. et Shimura, Y.** (1990) Binding of the Drosophila sex-lethal gene product to the alternative splice site of transformer primary transcript. Nature, 344, 461-3.
- Ishii, A., Komiya, K. et Nakayama, J.** (1996) Synthesis of a stable sulfenic acid by oxidation of a sterically hindered thiol (thiophenetriptycene-8-thiol) and its characterization. J. Am. Chem. Soc., 118, 12836-12837.
- Jackson, G. S., Hosszu, L. L., Power, A., Hill, A. F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C. J., Waltho, J. P., Clarke, A. R. et Collinge, J.** (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. Science, 283, 1935-7.
- Jackson, S. J. et Singletary, K. W.** (2004) Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. J. Nutr., 134, 2229-36.

- Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y. et Rhee, S. G.** (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. J. Biol. Chem., 281, 14400-7.
- Johnson, K. E. et Rajagopalan, K. V.** (2001) An active site tyrosine influences the ability of the dimethyl sulfoxide reductase family of molybdopterin enzymes to reduce S-oxides. J. Biol. Chem., 276, 13178-85.
- Jori, G., Galiazzo, G., Marzotto, A. et Scoffone, E.** (1968) Selective and reversible photo-oxidation of the methionyl residues in lysozyme. J. Biol. Chem., 243, 4272-8.
- 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.
- 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.
- Kauffmann, B., Aubry, A. et Favier, F.** (2005) The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases: current knowledge and open questions. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 249-60.
- Kido, K. et Kassell, B.** (1975) Oxidation of methionine residues of porcine and bovine pepsins. Biochemistry, 14, 631-5.
- Kiene, R. P. et Linn, L. J.** (2000) The fate of dissolved dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in seawater: Tracer studies using S-35-DMSP. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 64, 2797-2810.
- 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, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F., Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A. et Stamler, J. S.** (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. Cell, 109, 383-96.
- Kisker, C., Schindelin, H. et Rees, D. C.** (1997) Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. Annu. Rev. Biochem., 66, 233-67.
- Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Retey, J., Meckenstock, R. U. et Kroneck, P. M.** (1998) A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. FEMS Microbiol. Rev., 22, 503-21.
- Kobayashi, M. et Shimizu, S.** (1998) Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. Nat. Biotechnol., 16, 733-6.

Bibliographie

Kratochwil, N. A., Guo, Z. J., Murdoch, P. D., Parkinson, J. A., Bednarski, P. J. et Sadler, P. J. (1998) Electron-transfer-driven trans-ligand labilization: A novel activation mechanism for Pt(IV) anticancer complexes. J. Am. Chem. Soc., 120, 8253-8254.

Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. et Gladyshev, V. N. (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99, 4245-50.

Kucsman, A. et Kapovits, I. (1985) *Organic Sulphur Chemistry*, Elsevier,

Kuschel, L., Hansel, A., Schonherr, R., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T. et Heinemann, S. H. (1999) Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). FEBS Lett., 456, 17-21.

Landini, D., Modena, G., Scorrano, G. et Taddei, F. (1969) Acid-base behavior of sulfoxides. Measurement of pK_a values by ultraviolet and nuclear magnetic resonance techniques. J. Am. Chem. Soc., 91, 6703.

Lawrence, D. A. et Loskutoff, D. J. (1986) Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. Biochemistry, 25, 6351-5.

Lee, J. W., Gordiyenko, N. V., Marchetti, M., Tserentsoodol, N., Sagher, D., Alam, S., Weissbach, H., Kantorow, M. et Rodriguez, I. R. (2006) Gene structure, localization and role in oxidative stress of methionine sulfoxide reductase A (MSRA) in the monkey retina. Exp. Eye Res., 82, 816-27.

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.

Li, H. K., Temple, C., Rajagopalan, K. V. et Schindelin, H. (2000) The 1.3 angstrom crystal structure of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase reveals two distinct molybdenum coordination environments. J. Am. Chem. Soc., 122, 7673-7680.

Liss, P. S., Hatton, A. D., Malin, G., Nightingale, P. D. et Turner, S. M. (1997) Marine sulphur emissions. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 352, 159-168.

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.

- Mallett, T. C. et Claiborne, A.** (1998) Oxygen reactivity of an NADH oxidase C42S mutant: evidence for a C(4a)-peroxyflavin intermediate and a rate-limiting conformational change. Biochemistry, 37, 8790-802.
- Mallett, T. C., Parsonage, D. et Claiborne, A.** (1999) Equilibrium analyses of the active-site asymmetry in enterococcal NADH oxidase: role of the cysteine-sulfenic acid redox center. Biochemistry, 38, 3000-11.
- 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.
- McAlpine, A. S.** (1997) Molybdenum active centre of DMSO reductase from *Rhodobacter capsulatus*: crystal structure of the oxidised enzyme at 1.82 -angstrom resolution and the dithionite-reduced enzyme at 2.8-angstrom resolution. J. Biol. Inorg. Chem., 2, 690-701.
- McAlpine, A. S., McEwan, A. G., Shaw, A. L. et Bailey, S.** (1997) Molybdenum active centre of DMSO reductase from *Rhodobacter capsulatus*: crystal structure of the oxidised enzyme at 1.82-angstrom resolution and the dithionite-reduced enzyme at 2.8-angstrom resolution. J. Biol. Inorg. Chem., 2, 690-701.
- McAlpine, A. S., McEwan, A. G. et Bailey, S.** (1998) The high resolution crystal structure of DMSO reductase in complex with DMSO. J. Mol. Biol., 275, 613-23.
- McCrinkle, S. L., Kappler, U. et McEwan, A. G.** (2005) Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. Adv. Microb. Physiol., 50, 147-98.
- McEwan, A. G., Ferguson, S. J. et Jackson, J. B.** (1983) Electron flow to dimethylsulphoxide or trimethylamine-N-oxide generates a membrane potential in *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol., 136, 300-5.
- McEwan, A. G., Greenfield, A. J., Wetzstein, H. G., Jackson, J. B. et Ferguson, S. J.** (1985) Nitrous oxide reduction by members of the family *Rhodospirillaceae* and the nitrous oxide reductase of *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol., 164, 823-30.
- Melville, D. B., Genghof, D. S. et Lee, J. M.** (1954) Biological properties of biotin d- and l-sulfoxides. J. Biol. Chem., 208, 503-12.
- Miles, A. M. et Smith, R. L.** (1993) Functional methionines in the collagen/gelatin binding domain of plasma fibronectin: effects of chemical modification by chloramine T. Biochemistry, 32, 8168-78.
- Miller, B. L., Kuczera, K. et Schoneich, C.** (1998) One-electron photooxidation of N-methionyl peptides. Mechanism of sulfoxide and azasulfonium diastereomer formation through reaction of sulfide radical cation complexes with oxygen or superoxide. J. Am. Chem. Soc., 120, 3345-3356.

Bibliographie

Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K. et Wakagi, T. (2001) Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 288, 1169-74.

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.

Moskovitz, J., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jursky, F., Weissbach, H. et Brot, N. (1996) Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93, 3205-8.

Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. et Stadtman, E. R. (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 94, 9585-9.

Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M. et Stadtman, E. R. (1998) Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 95, 14071-5.

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., 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. (2005) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 213-9.

Mrazkova, E. et Hobza, P. (2003) Hydration of sulfo and methyl groups in dimethyl sulfoxide is accompanied by the formation of red-shifted hydrogen bonds and improper blue-shifted hydrogen bonds: An *ab initio* quantum chemical study. J. Phys. Chem. A, 107, 1032-1039.

Murakami, T., Nojiri, M., Nakayama, H., Odaka, M., Yohda, M., Dohmae, N., Takio, K., Nagamune, T. et Endo, I. (2000) Post-translational modification is essential for catalytic activity of nitrile hydratase. Protein Sci., 9, 1024-30.

Myzak, M. C., Hardin, K., Wang, R., Dashwood, R. H. et Ho, E. (2006) Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. Carcinogenesis, 27, 811-9.

Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., Yohda, M., Kamiya, N. et Endo, I. (1998) Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. Nat. Struct. Biol., 5, 347-51.

Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K. et Yodoi, J. (1994) Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. Immunol. Lett., 42, 75-80.

Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2004) Evidence for a new subclass of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. J. Biol. Chem., 279, 42462-8.

Nelson, K. J. et Rajagopalan, K. V. (2004) Studies on the interaction of NADPH with *Rhodobacter sphaeroides* biotin sulfoxide reductase. Biochemistry, 43, 11226-37.

Neumann, N. P., Moore, S. et Stein, W. H. (1962) Modification of the methionine residues in ribonuclease. Biochemistry, 1, 68-75.

Noguchi, T., Nojiri, M., Takei, K., Odaka, M. et Kamiya, N. (2003) Protonation structures of Cys-sulfinic and Cys-sulfenic acids in the photosensitive nitrile hydratase revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry, 42, 11642-50.

Okruszek, A. (1983) An Improved Procedure for the Synthesis of Sulfoxides-O-18. Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 20, 741-743.

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. 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., 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.

Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Poole, L. B. et Mongkolsuk, S. (2006) Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. J. Bacteriol., 188, 1389-95.

Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A. et Poole, L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. Biochemistry, 44, 10583-92.

Perrin, D. et Koppenol, W. H. (2000) The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxyxynitrite. Arch. Biochem. Biophys., 377, 266-72.

Bibliographie

- Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M. et Friguet, B.** (2001) Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. Biochem. J., 355, 819-25.
- Petropoulos, I. et Friguet, B.** (2005) Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 261-6.
- 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.
- Picot, C. R., Petropoulos, I., Perichon, M., Moreau, M., Nizard, C. et Friguet, B.** (2005) Overexpression of MsrA protects WI-38 SV40 human fibroblasts against H₂O₂-mediated oxidative stress. Free Radic. Biol. Med., 39, 1332-41.
- Pierson, D. E. et Campbell, A.** (1990) Cloning and nucleotide sequence of bisC, the structural gene for biotin sulfoxide reductase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 172, 2194-8.
- Pollock, V. V. et Barber, M. J.** (1997) Biotin sulfoxide reductase. Heterologous expression and characterization of a functional molybdopterin guanine dinucleotide-containing enzyme. J. Biol. Chem., 272, 3355-62.
- Pollock, V. V. et Barber, M. J.** (2000) Serine 121 is an essential amino acid for biotin sulfoxide reductase functionality. J. Biol. Chem., 275, 35086-90.
- Pollock, V. V. et Barber, M. J.** (2001) Kinetic and mechanistic properties of biotin sulfoxide reductase. Biochemistry, 40, 1430-40.
- Pollock, V. V., Conover, R. C., Johnson, M. K. et Barber, M. J.** (2003) Biotin sulfoxide reductase: Tryptophan 90 is required for efficient substrate utilization. Arch. Biochem. Biophys., 409, 315-26.
- Poole, L. B. et Claiborne, A.** (1986) Interactions of pyridine nucleotides with redox forms of the flavin-containing NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem., 261, 14525-33.
- Poole, L. B. et Claiborne, A.** (1989a) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid. J. Biol. Chem., 264, 12330-8.
- Poole, L. B. et Claiborne, A.** (1989b) The non-flavin redox center of the streptococcal NADH peroxidase. I. Thiol reactivity and redox behavior in the presence of urea. J. Biol. Chem., 264, 12322-9.
- Pryor, W. A., Jin, X. et Squadrito, G. L.** (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 91, 11173-7.

Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P. et Lunardi, J. (2002) Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J. Biol. Chem.*, 277, 19396-401.

Raftery, M. J., Yang, Z., Valenzuela, S. M. et Geczy, C. L. (2001) Novel intra- and inter-molecular sulfinamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *J. Biol. Chem.*, 276, 33393-401.

Rapoport, S., Hartel, B. et Hausdorf, G. (1984) Methionine sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, 139, 573-6.

Reed, A. E. et Schleyer, P. V. (1990) Chemical Bonding in Hypervalent Molecules - the Dominance of Ionic Bonding and Negative Hyperconjugation over D-Orbital Participation. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1434-1445.

Renault, E. et Le Questel, J. Y. (2004) Selenoxides are better hydrogen-bond acceptors than sulfoxides: a crystallographic database and theoretical investigation. *J. Phys. Chem. A*, 108, 7232-7240.

Ridge, J. P., Aguey-Zinsou, K. F., Bernhardt, P. V., Brereton, I. M., Hanson, G. R. et McEwan, A. G. (2002) Site-directed mutagenesis of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*: characterization of a Y114 --> F mutant. *Biochemistry*, 41, 15762-9.

Ridge, J. P., Aguey-Zinsou, K. F., Bernhardt, P. V., Hanson, G. R. et McEwan, A. G. (2004) The critical role of tryptophan-116 in the catalytic cycle of dimethylsulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.*, 563, 197-202.

Roeser, D., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Gasow, K., Wittmann, J. G., Dierks, T., von Figura, K. et Rudolph, M. G. (2006) A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 81-6.

Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K. et Zhu, Y. Z. (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat. Prod. Rep.*, 22, 351-68.

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.

Saiki, T., Goto, K., Tokitoh, N. et Okazaki, R. (1996) Synthesis and structure of a bridged calix 6 arene with a sulfenic acid functionality in the cavity. *J. Org. Chem.*, 61, 2924-2925.

Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K. et Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*, 423, 769-73.

Bibliographie

Salmeen, A. et Barford, D. (2005) Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid. Redox Signal*, 7, 560-77.

Sambasivarao, D. et Weiner, J. H. (1991) Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation. *J. Bacteriol.*, 173, 5935-43.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santarelli, L. C., Wassef, R., Heinemann, S. H. et Hoshi, T. (2006) Three methionine residues located within the regulator of conductance for K⁺ (RCK) domains confer oxidative sensitivity to large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J. Physiol.*, 571, 329-48.

Schachter, H. et Dixon, G. H. (1962) Identification of the methionine involved in the active center of chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 132-7.

Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K. V. et Rees, D. C. (1996) Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science*, 272, 1615-21.

Schneider, F., Lowe, J., Huber, R., Schindelin, H., Kisker, C. et Knablein, J. (1996) Crystal structure of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* at 1.88 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 263, 53-69.

Schoneich, C. et Bobrowski, K. (1994) Reaction of Hydroxysulfuranyl Radical with Molecular-Oxygen - Electron-Transfer Vs Addition. *J. Phys. Chem.*, 98, 12613-12620.

Schoneich, C. (2002) Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397, 370-6.

Schoneich, C., Pogocki, D., Hug, G. L. et Bobrowski, K. (2003) Free radical reactions of methionine in peptides: mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 13700-13.

Schoneich, C. (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703, 111-9.

Schultz, B. E., Hille, R. et Holm, R. H. (1995) Direct oxygen atom transfer in the mechanism of action of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 827-828.

Shafer, W. M. et Rest, R. F. (1989) Interactions of gonococci with phagocytic cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43, 121-45.

Shaw, A. L., Hochkoeppler, A., Bonora, P., Zannoni, D., Hanson, G. R. et McEwan, A. G. (1999) Characterization of DorC from *Rhodobacter capsulatus*, a c-type cytochrome involved in electron transfer to dimethyl sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, 274, 9911-4.

- Shen, B. et English, A. M.** (2005) Mass spectrometric analysis of nitroxyl-mediated protein modification: comparison of products formed with free and protein-based cysteines. Biochemistry, 44, 14030-44.
- Shringarpure, R., Grune, T. et Davies, K. J.** (2001) Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. Cell. Mol. Life Sci., 58, 1442-50.
- Sigalov, A. B. et Stern, L. J.** (1998) Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. FEBS Lett., 433, 196-200.
- Simala-Grant, J. L. et Weiner, J. H.** (1996) Kinetic analysis and substrate specificity of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase. Microbiology, 142 (Pt 11), 3231-9.
- Singh, S. V., Srivastava, S. K., Choi, S., Lew, K. L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S. C., Johnson, C. S., Trump, D. L., Lee, Y. J., Xiao, H. et Herman-Antosiewicz, A.** (2005) Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. J. Biol. Chem., 280, 19911-24.
- Singh, V. K., Jayaswal, R. K. et Wilkinson, B. J.** (2001) Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. FEMS Microbiol. Lett., 199, 79-84.
- 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.
- Skaar, E. P., Tobiason, 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.
- Sohn, J. et Rudolph, J.** (2003) Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. Biochemistry, 42, 10060-70.
- Sreekumar, P. G., Kannan, R., Yaung, J., Spee, C. K., Ryan, S. J. et Hinton, D. R.** (2005) Protection from oxidative stress by methionine sulfoxide reductases in RPE cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 334, 245-53.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. et Nathan, C.** (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 98, 9901-6.
- Stadtman, E. R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N. B. et Levine, R. L.** (2005) Methionine oxidation and aging. Biochim. Biophys. Acta, 1703, 135-40.
- Stehle, T., Ahmed, S. A., Claiborne, A. et Schulz, G. E.** (1990) The structure of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* at 3.3 Å resolution. FEBS Lett., 267, 186-8.

Bibliographie

Stehle, T., Ahmed, S. A., Claiborne, A. et Schulz, G. E. (1991) Structure of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1 refined at 2.16 Å resolution. J. Mol. Biol., 221, 1325-44.

Stehle, T., Claiborne, A. et Schulz, G. E. (1993) NADH binding site and catalysis of NADH peroxidase. Eur. J. Biochem., 211, 221-6.

Storz, G., Tartaglia, L. A. et Ames, B. N. (1990) The OxyR regulon. Antonie Van Leeuwenhoek, 58, 157-61.

Suker, J. et Feavers, I. M. (2001) Prospects offered by genome studies for combating meningococcal disease by vaccination. Pharmacogenomics, 2, 273-83.

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.

Szmant, H. H. (1961) Chemistry of the Sulfoxide Group. Kharasch, N., Book Chemistry of the Sulfoxide Group, Pergamon Press, 154-167.

Tabor, S. et Richardson, C. C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 4767-71

Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N. G., Wehr, N., Moss, J. et Levine, R. L. (2000) Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. J. Biol. Chem., 275, 27258-65.

Taha, M. K., So, M., Seifert, H. S., Billyard, E. et Marchal, C. (1988) Pilin expression in *Neisseria gonorrhoeae* is under both positive and negative transcriptional control. EMBO J., 7, 4367-78.

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.

Temple, C. A., George, G. N., Hilton, J. C., George, M. J., Prince, R. C., Barber, M. J. et Rajagopalan, K. V. (2000) Structure of the molybdenum site of *Rhodobacter sphaeroides* biotin sulfoxide reductase. Biochemistry, 39, 4046-52.

Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. et Aubry, A. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. Structure Fold. Des., 8, 1167-78.

Tobler, P. H., Tschopp, F. A., Dambacher, M. A., Born, W. et Fischer, J. A. (1983) Identification and characterization of calcitonin forms in plasma and urine of normal subjects and medullary carcinoma patients. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57, 749-54.

Tsujimura, M., Dohmae, N., Odaka, M., Chijimatsu, M., Takio, K., Yohda, M., Hoshino, M., Nagashima, S. et Endo, I. (1997) Structure of the photoreactive iron center of the nitrile

hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771. Evidence of a novel post-translational modification in the cysteine ligand. J. Biol. Chem., 272, 29454-9.

Uversky, V. N., Yamin, G., Souillac, P. O., Goers, J., Glaser, C. B. et Fink, A. L. (2002) Methionine oxidation inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro. FEBS Lett., 517, 239-44.

Van Montfort, R. L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R. et Jhoti, H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature, 423, 773-7.

Varadarajan, S., Yatin, S., Kanski, J., Jahanshahi, F. et Butterfield, D. A. (1999) Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. Brain Res. Bull., 50, 133-41.

Vattanaviboon, P., Seeanukun, C., Whangsuk, W., Utamapongchai, S. et Mongkolsuk, S. (2005) Important role for methionine sulfoxide reductase in the oxidative stress response of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. J. Bacteriol., 187, 5831-6.

Vougier, S., Mary, J. et Friguet, B. (2003) Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells. Biochem. J., 373, 531-7.

Wallace, T. J. (1964) Reactions of Thiols with Sulfoxides. I. Scope of the Reaction and Synthetic Applications. J. Am. Chem. Soc., 86, 2018.

Wallace, T. J. et Mahon, J. J. (1964) Reactions of Thiols with Sulfoxides. II. Kinetics and Mechanistic Implications. J. Am. Chem. Soc., 86, 4099.

Wallace, T. J. et Mahon, J. J. (1965) Reactions of Thiols with Sulfoxides. III. Catalysis by Acids and Bases. J. Org. Chem., 30, 1502.

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.

Wissenbach, U., Kroger, A. et Uden, G. (1990) The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. Arch. Microbiol., 154, 60-6.

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.

Wong, B. S., Wang, H., Brown, D. R. et Jones, I. M. (1999) Selective oxidation of methionine residues in prion proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 259, 352-5.

Bibliographie

Wood, M. J., Becvar, L. A., Prieto, J. H., Melacini, G. et Komives, E. A. (2003a) NMR structures reveal how oxidation inactivates thrombomodulin. Biochemistry, 42, 11932-42.

Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R. et Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. Biochemistry, 41, 5493-504.

Wood, Z. A., Poole, L. B. et Karplus, P. A. (2003b) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science, 300, 650-3.

Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. et Poole, L. B. (2003c) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem. Sci., 28, 32-40.

Yamin, G., Glaser, C. B., Uversky, V. N. et Fink, A. L. (2003) Certain metals trigger fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. J. Biol. Chem., 278, 27630-5.

Yeh, J. I., Claiborne, A. et Hol, W. G. (1996) Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution. Biochemistry, 35, 9951-7.

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.

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. et Posner, G. H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 89, 2399-403.

Zhao, Z. et Weiner, J. H. (1998) Interaction of 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide with dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 273, 20758-63.

Zheng, M., Aslund, F. et Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science, 279, 1718-21.

Les Méthionine Sulfoxyde Réductases (Msr) jouent un rôle essentiel dans la résistance des cellules à un stress oxydant et dans la virulence des bactéries pathogènes du genre *Neisseria*. Il existe deux classes de MsrA/B ayant des structures tridimensionnelles différentes et réduisant respectivement l'isomère *S* et *R* de la fonction sulfoxyde du substrat. Elles présentent un même mécanisme catalytique à trois étapes, avec formation d'un intermédiaire acide sulfénique suivie de celle d'un pont disulfure intramoléculaire réduit par la thiorédoxine (Trx). Les études réalisées sur le domaine MsrA de la protéine PilB de *Neisseria meningitidis* ont permis de montrer que : 1) l'étape réductase est rapide et cinétiquement déterminante dans le processus conduisant à la formation du pont disulfure, l'étape cinétiquement limitante du mécanisme étant associée à la réduction de la MsrA par la Trx, 2) le substrat sulfoxyde est fixé dans le site actif sous une forme fortement polarisée, stabilisée *via* des interactions avec les résidus conservés E94, Y82 et Y134, et participe à l'activation de la Cys catalytique *via* la charge -partielle- positive portée par le soufre de sa fonction sulfoxyde et ; 3) la C198 est la Cys de la MsrA qui est engagée dans le pont disulfure intermoléculaire transitoire formé avec la Trx. L'analyse des résultats d'enzymologie, de chimie théorique et des structures tridimensionnelles de la MsrA sous forme libre, complexée avec le substrat, intermédiaire acide sulfénique et pont disulfure obtenues par RX et RMN a permis de proposer un scénario original du mécanisme catalytique de la MsrA.

Methionine Sulfoxide Reductases (Msr) play an essential role in cell defences against oxidative stress and in virulence of pathogenic bacteria of *Neisseria* genus. There exist two structurally-unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB, specific for the *S* and the *R* epimer of the sulfoxide function, respectively. Both Msrs present a similar catalytic mechanism, which implies the successive formation of a sulfenic acid intermediate and of an intra disulfide bond, finally reduced by thioredoxin (Trx). The studies of the MsrA domain from *Neisseria meningitidis* PilB protein demonstrated that: 1) the reductase step is fast and rate-determining in the process leading to the formation of the intramolecular disulfide bond, the overall rate-limiting step being associated with the reduction of MsrA by Trx, 2) the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized, *via* stabilizing interactions with invariant residues E94, Y82 and Y134, and participates *via* the -partial- positive charge borne by the sulfur of the sulfoxide to the activation of the catalytic Cys and ; 3) C198 is the MsrA Cys engaged in the transient intermolecular disulfide bond formed with Trx during MsrA recycling. The analysis of the enzymatic results coupled with the results of theoretical chemistry and the three-dimensional structures of reduced, complexed with substrate, sulfenic acid intermediate and disulfide bond oxidized forms of MsrA obtained by X-ray crystallography and NMR led us to propose an original scenario of the MsrA catalytic mechanism.