



HAL
open science

Etudes cristallographiques d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant : les peptides méthionine sulfoxyde réductases et la NADH rubrédoxine oxydoréductase

Brice Kauffmann

► **To cite this version:**

Brice Kauffmann. Etudes cristallographiques d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant : les peptides méthionine sulfoxyde réductases et la NADH rubrédoxine oxydoréductase. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2003. Français. NNT : 2003NAN10182 . tel-01748177

HAL Id: tel-01748177

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748177>

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>



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

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

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie structurale moléculaire et cellulaire

par Brice KAUFFMANN

Etudes cristallographiques d'enzymes impliquées dans les mécanismes de
défense contre le stress oxydant : les peptide méthionine sulfoxyde
réductases et la NADH rubrédoxine oxydoréductase.

Soutenance publique prévue le jeudi 28 novembre 2003

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Otto DIDEBERG	Directeur de recherche CNRS, Grenoble
	M. Richard HASER	Directeur de recherche CNRS, Lyon
Examineurs :	M. André AUBRY	Directeur de recherche CNRS, Nancy I (Directeur de thèse)
	M. Guy BRANLANT	Professeur, U.H.P., Nancy I
	Mme Frédérique FAVIER	Maître de conférences, U.H.P., Nancy I
	M. Jean-Pierre JACQUOT	Professeur, U.H.P., Nancy I
	M. Manfred WEISS	Chargé de recherche, Hambourg, Allemagne

Laboratoire de Cristallographie et de Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques (LCM3B), Equipe Biocristallographie, Faculté des Sciences & Techniques - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

SOMMAIRE

Sommaire	1
Abréviations	5
Introduction : Le stress oxydant	
I. Origine et toxicité des agents oxydants dans les systèmes biologiques	7
I.1. Origine des espèces oxydantes	7
I.2. Toxicité des espèces oxydantes et conséquences physiologiques du stress oxydant	8
I.2.1. Toxicité des espèces oxydantes	
a) L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène	
b) Le radical hydroxyle	
c) Le radical oxyde nitrique	
I.2.2. Les conséquences physiologiques du stress oxydant	
a) Les conséquences sur les lipides	
b) Les conséquences sur les acides nucléiques	
c) Les conséquences sur les protéines	
II. Les mécanismes de défense contre le stress oxydant	15
II.1. Capture des ERO et ERN	15
II.2. Réparation des dommages induits par le stress oxydant	16
Partie A : Les peptide méthionine sulfoxyde réductases	
I. Introduction	18
I.1. Oxydation des résidus méthionines : conséquences et rôles physiologiques.	19
I.1.1. Oxydation des résidus méthionines	
a) Oxydation par des agents chimiques	
b) Oxydation par des agents oxydants d'origine biologique	
I.1.2. Conséquences et rôles physiologiques de l'oxydation des Met en MetSO	
a) Conséquences de l'oxydation des méthionines	
b) Fonction régulatrice	
c) Fonction de préparation à la dégradation des protéines et rôle antioxydant	

I.2. Rôles physiologiques des méthionine sulfoxyde réductases	23
I.2.1. Implication dans les phénomènes de résistance au stress oxydant et lien avec le vieillissement	
I.2.2. Msr et pathogénicité bactérienne	
I.3. La famille des Msr	26
I.3.1. Les différentes classes de Msr	
I.3.2. Organisation génomique	
I.3.3. Classification des Msr en fonction du nombre de cystéines	
a) Les MsrA	
b) Les MsrB	
I.4. Propriétés des Msr	33
I.4.1. Le mécanisme catalytique	
I.4.2. Spécificité de substrat	
I.5. Contexte structural et objectifs de notre étude	35
II. Etude structurale des domaines MsrB et MsrA de la protéine PILB de <i>N. meningitidis</i>	37
II.1. Introduction : Données biochimiques et enzymologiques sur les activités méthionine sulfoxyde réductases de PILB	37
II.2. Cristallisation, collecte des données de diffraction des rayons X et affinement des structures	40
II.2.1. Le domaine MsrB de PILB sous forme réduite	
II.2.2. Le domaine MsrB de PILB sous forme oxydée	
II.2.3. Le domaine MsrA de PILB sous forme oxydée	
II.3. Etude structurale de la forme réduite du domaine MsrB de PILB	49
II.3.1 Description générale de la structure	
II.3.2 Description du site actif du domaine MsrB de PILB	
II.4. Etude structurale de la forme oxydée du domaine MsrB de PILB	59
II.4.1 Conséquences de l'oxydation sur la structure globale	
II.4.2. Analyse du site actif	
a) Modélisation d'une L-Met-R-SO dans le site actif	
b) Modélisation d'une méthionine dans le site actif	

II.5. Etude structurale préliminaire du domaine MsrA de PILB	68
II.5.1. Structure globale de la forme oxydée du module MsrA de PILB	
II.5.2. Organisation du site actif de la forme oxydée du module MsrA de PILB	
III. Etude structurale de la MsrA chloroplastique de peuplier	76
Article en préparation : "Functionnal and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type A methionine sulfoxide reductase"	
Partie B : La NADH rubrédoxine oxydoréductase	
Avant propos	115
I. Introduction	117
I.1 Les flavoprotéines	117
I.2. Les protéines fer-soufre chez les clostridia	121
I.3. Structures cristallographiques de complexes flavoprotéines / protéine fer soufre	125
I.3.1. Le complexe adrénodoxine réductase / adrénodoxine d'origine bovine.	
I.3.2. Les complexes ferrédoxine / ferrédoxine réductase du maïs et de la cyanobactérie <i>Anabaena PCC7119</i> .	
II. Etude structurale de la rubrédoxine de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	129
II.1. Surexpression, purification, et détermination structurale de la rubrédoxine de <i>C. acetobutylicum</i>.	130
II.2. Description de la structure de la rubrédoxine de <i>C. acetobutylicum</i>	131
III. Etude structurale de la NADH rubrédoxine oxydoréductase (NROR) de <i>Clostridium acetobutylicum</i>.	136
III.1. Caractérisations biochimique et enzymatique de la NROR	136
III.2. Surexpression et purification des formes natives et sélénées de la NROR	140
III.3. Détermination de la structure de la NROR	143
III.3.1. Cristallisation des formes native et sélénée de la NROR	
III.3.2. Enregistrement des données de diffraction des rayons X	
a) Collecte haute résolution à partir des cristaux de la forme native	
b) Collecte des données de type MAD à partir des cristaux de la forme sélénée de la NROR	

III.3.3. Phasage par la méthode SAS (Single wavelength anomalous scattering) et obtention du premier modèle	
III.3.4. Affinement du modèle à haute résolution	
III.4. Description de la structure de la NROR	154
III.4.1 Structure globale	
III.4.2 Fixation du FAD	
III.4.3. Fixation du NADH : Résolution de la structure du complexe NROR-NADH	
a) Cristallisation et résolution de la structure du complexe NROR-NADH	
b) Caractéristiques structurales du domaine de fixation du NADH de la NROR	
c) Fixation du NADH et interactions avec le site actif	
d) Comparaison des structures oxydée et réduite de la NROR	
III.4.4. Interactions avec la rubrédoxine : Etude préliminaire du complexe NROR-rubrédoxine	
IV. Etude préliminaire de la superoxyde réductase (SOR) de <i>C. acetobutylicum</i>	180
IV.1. Introduction	180
IV.2. Surexpression et purification de la SOR de <i>C. acetobutylicum</i>	184
IV.3. Cristallisation de la SOR de <i>C. acetobutylicum</i>	185
V. Conclusions et perspectives	186
Conclusion générale	188
Annexe	191
Références bibliographiques	195

ABREVIATIONS

Abréviations

Å, angström
ADN, acide désoxyribonucléique
ADP, adénosine diphosphate
CCP4, Collaborative Computational Project, Number 4
DMSO, diméthyl sulfoxyde
DO, densité optique
DsbE, disulfide bond reductase E
EDC, 1-éthyl-3-(3-diméthylpropyl) carbodiimide
ERN espèce réactive nitrée
ERO, espèce réactive oxygénée
ESRF, European Synchrotron Radiation Facility
ETF, electron transferring protein
FAD, flavine adénine dinucléotide
Fd, ferrédoxine
FMN, flavine adénine mononucléotide
FNR, ferrédoxine réductase
 F_{calc} , F_{o} facteur de structure calculé
 F_{obs} , F_{o} facteur de structure observé
GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HEPES, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-piperazine-1-éthanesulfonique
HOMO, highest occupied molecular orbital
IUB, union internationale de biochimie
 k_{cat} , constante catalytique
kDa, kilodalton
 K_{M} , constante de Michaelis
LUMO, lowest unoccupied molecular orbital
LURE, Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique
MAD, multiwavelength anomalous diffraction
Met, méthionine
MetSO, méthionine sulfoxyde
Msr, méthionine sulfoxyde réductase
MsrA, méthionine sulfoxyde réductase de type A
MsrB, méthionine sulfoxyde réductase de type B
ORF, open reading frame
l, microlitre
mg, milligramme
ml, millilitre
mm, millimètre
mM, millimole par litre
M, mole par litre
MIR, multiple isomorphous replacement
NAD, nicotinamide mononucléotide diphosphate
NADP, 2'-phosphate nicotinamide mononucléotide diphosphate
NROR, NADH rubrédoxine réductase
PDB, protein data bank
PEG, polyéthylène glycol
 R_{cryst} , facteur d'accord cristallographique
Rd, rubrédoxine
 R_{free} , facteur d'accord cristallographique sur n % des données omises dans l'affinement
r.m.s.d, root mean square deviation
RX, rayons X
s, seconde

TMDH, triméthylamine déshydrogénase
TPP, thiamine pyrophosphate

Code une lettre et trois lettres des acides aminés:

G, Gly, glycine
A, Ala, alanine
V, Val, valine
L, Leu, leucine
I, Ile, isoleucine
S, Ser, sérine
T, Thr, thréonine
C, Cys, cystéine
M, Met, méthionine
D, Asp, acide aspartique
N, Asn, asparagine
E, Glu, acide glutamique
Q, Gln, glutamine
K, Lys, lysine
R, Arg, arginine
H, His, histidine
F, Phe, phénylalanine
Y, Tyr, tyrosine
W, Trp, tryptophane
P, Pro, proline

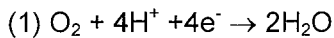
INTRODUCTION

LE STRESS OXYDANT

I. Origine et toxicité des agents oxydants dans les systèmes biologiques

I.1. Origine des espèces oxydantes

De nombreuses réactions biochimiques caractéristiques du métabolisme aérobie des cellules eucaryotes et procaryotes requièrent le transfert de quatre électrons vers l'oxygène moléculaire (O_2) pour former une molécule d'eau (H_2O) (réaction 1).



Dans la plupart des cas ce transfert s'effectue spontanément sans la formation d'aucun autre intermédiaire réactionnel. Cependant, O_2 possède la propriété d'être réduit séquentiellement pour former d'autres entités réactives oxygénées (ERO), dont les propriétés chimiques et la toxicité envers la cellule sont variables (figure 1).

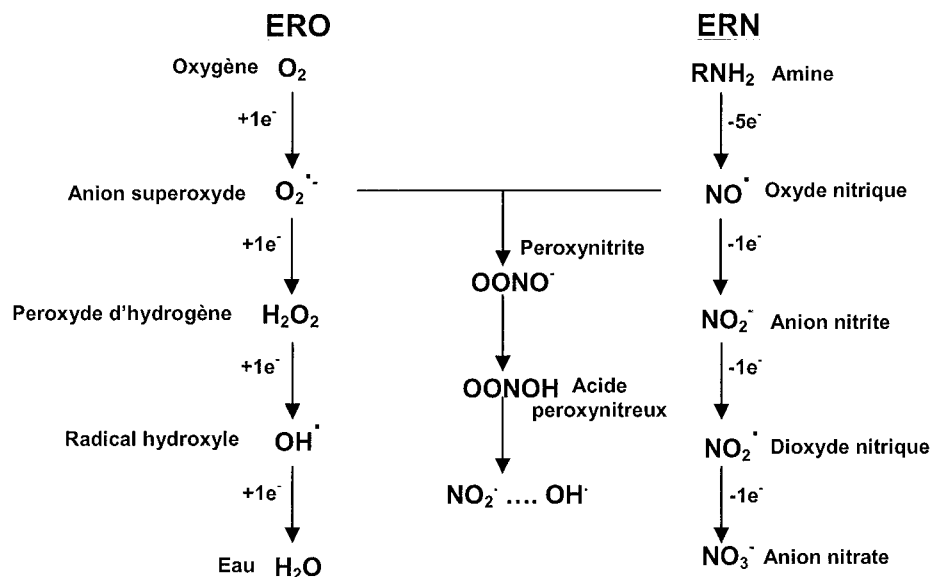


Figure 1 : Voies de production des espèces oxygénées (ERO) et nitrées (ERN) réactives (d'après Nathan & Shiloh, 2000)

Le gain d'un électron par O_2 produit le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui, à pH physiologique, est rapidement réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La réaction de H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$ *in vitro* produit un radical hydroxyle (OH^{\cdot}). *In vivo*, cette réaction est catalysée par un cation métallique divalent via la réaction d'Haber-Weiss (réactions 2, 3, 4).

- (2) $O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$
 (3) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$
 (4) $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$

Le radical oxyde nitrique (NO^{\cdot}), à l'origine des espèces nitrées réactives (ERN), n'est pas un produit direct de la réduction d' O_2 (figure 1), sa formation dans les cellules eucaryotes est dépendante d'enzymes regroupées sous le nom d'oxyde nitrique synthases (NOS) (Nathan *et al.*, 1994). Ces enzymes oxydent la L-arginine en L-citrulline et NO^{\cdot} . De nombreuses bactéries sont quant à elles capables de produire NO^{\cdot} via la réaction catalysée par les nitrite réductases (Zumft, 1993). NO^{\cdot} est un agent oxydant en soi et/ou peut interagir avec $O_2^{\cdot -}$ pour générer l'anion peroxyxynitrite ($ONOO^-$) puis OH^{\cdot} après décomposition de l'acide peroxyxynitrique ($OONOH$) (Pryor & Squadrito, 1995).

I.2. Toxicité des espèces oxydantes et conséquences physiologiques du stress oxydant

I.2.1. Toxicité des espèces oxydantes

a) L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène

$O_2^{\cdot -}$ est un agent modérément réactif, capable d'interagir en tant qu'oxydant et réducteur dans les systèmes biologiques. Cette relative inactivité lui permet de diffuser sur des distances considérables dans la cellule avant d'exercer son effet toxique. $O_2^{\cdot -}$ extracellulaire peut atteindre des cibles intracellulaires via des canaux à anions (Roos *et al.*, 1984), et en particulier certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés (Haas & Goebel, 1992). Dans un environnement acide, $O_2^{\cdot -}$ se protone pour former HO_2^{\cdot} . De par sa charge neutre, HO_2^{\cdot} est plus perméable aux membranes mais aussi plus apte à réagir avec lui-même pour former H_2O_2 . Enfin, $O_2^{\cdot -}$ participe *in vivo* à la réaction d'Haber-Weiss en présence de Fe^{3+} .

H_2O_2 est un agent oxydant plus réactif que $O_2^{\cdot -}$ et diffuse facilement à travers les membranes cellulaires.

b) Le radical hydroxyle

OH^{\cdot} est une entité très réactive. De ce fait, sa diffusion et donc ses déplacements dans les compartiments cellulaires pour oxyder un substrat sont très limités. Cette propriété

impose que OH^\cdot soit généré à proximité d'une cible potentielle pour pouvoir l'oxyder. OH^\cdot peut cependant initier des réactions radicalaires en cascades de radicaux libres afin de propager son pouvoir oxydant (Weiss, 1986).

c) Le radical oxyde nitrique

NO^\cdot comme OH^\cdot est une entité très réactive et donc peu mobile dans la cellule. Cytotoxique pour les cellules procaryotes et eucaryotes (Freeman, 1994), il peut réagir avec d'autres molécules et former des composés eux-mêmes cytotoxiques comme par exemple ONOO^\cdot , issu de la réaction avec O_2^\cdot . NO^\cdot interagit essentiellement avec des espèces chimiques contenant du fer et notamment les enzymes des cycles de la chaîne respiratoire.

1.2.2. Les conséquences physiologiques du stress oxydant

Les ERO et ERN affectent l'ensemble des familles de macromolécules biologiques que représentent les lipides, les acides nucléiques et les protéines.

a) Conséquences sur les lipides

Le stress oxydant affecte en majorité les bicouches lipidiques membranaires. Les ERO et en particulier OH^\cdot provoquent la peroxydation des phospholipides en trois étapes d'initiation, propagation et terminaison (figure 2).

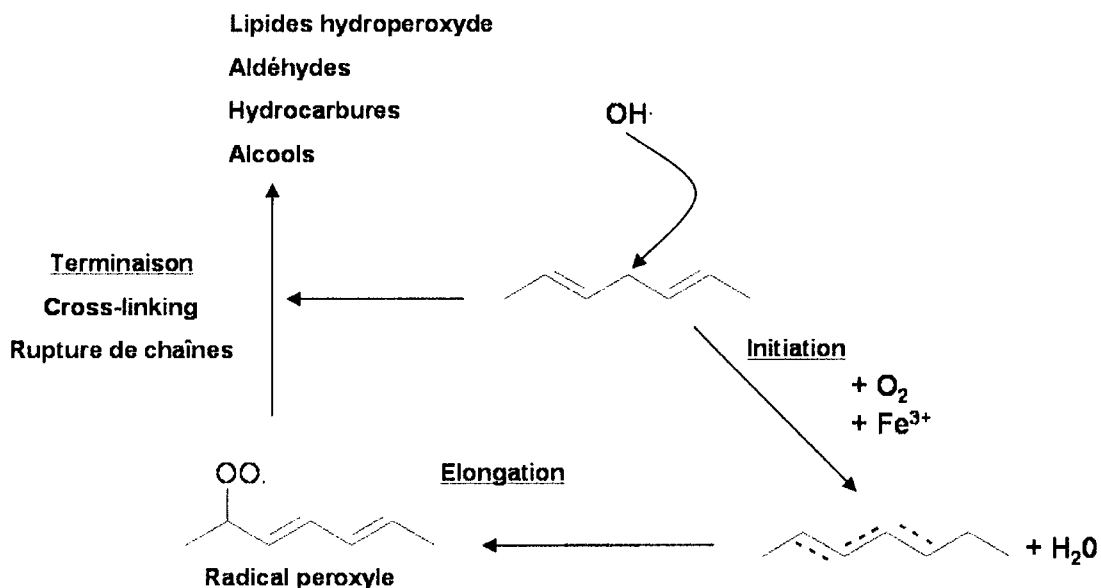


Figure 2 : Schéma du cycle de peroxydation des phospholipides membranaires initié par OH^\cdot

Cette réaction de peroxydation diffère selon la nature du lipide et plus particulièrement selon le nombre et la position des doubles liaisons sur la chaîne aliphatique (Frankel, 1985).

L'oxydation des acides gras insaturés membranaires produit un radical peroxyde qui peut réagir avec une autre molécule de lipide et générer un autre radical lipidique, initiant ainsi une oxydation de proche en proche. Cette succession de réaction peut aboutir à l'oxydation en fin de chaîne d'une macromolécule biologique très éloignée du site d'oxydation initiale par le radical hydroxyle.

L'attaque de $\text{OH}\cdot$ sur la bicouche lipidique des membranes produit des acides gras libres par désestérification (figure 3). La liaison ester liant l'acide gras au glycérol dans la molécule de phospholipide est rompue.

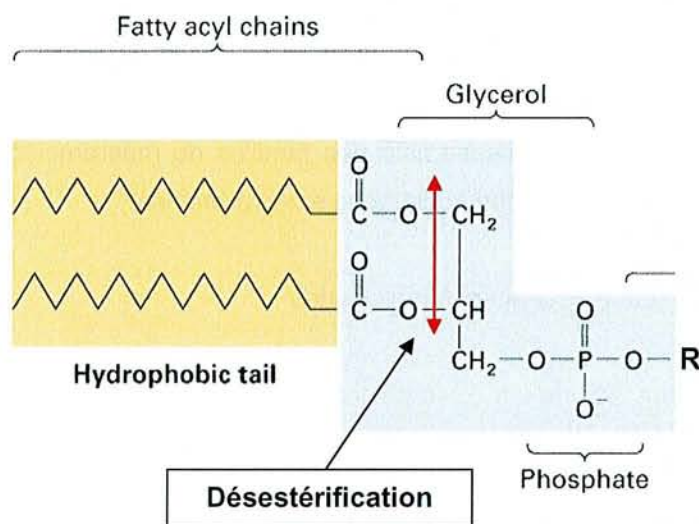


Figure 3 : Schéma d'un phospholipide membranaire montrant le site de désestérification

b) Conséquences sur les acides nucléiques

Les ERO induisent de nombreuses lésions sur les acides nucléiques qui ont pour conséquences des délétions et des mutations souvent létales pour la cellule.

La partie glycosidique et la base sont sujettes à l'oxydation provoquant des dégradations de ces bases, des cassures de l'acide nucléique simple brin ou encore des pontages ADN-protéines (Imlay & Linn, 1986).

La principale cause de cassure de l'acide nucléique simple brin est l'oxydation du sucre par $\text{OH}\cdot$. *In vitro*, ni H_2O_2 , ni $\text{O}_2\cdot^-$ dans des conditions physiologiques ne permettent la rupture d'un simple brin. Leur toxicité *in vivo* est dépendante de réactions de Fenton catalysées par des cations métalliques (Imlay & Linn, 1986).

Les pontages ADN-protéine sont également une conséquence de l'attaque d' $\text{OH}\cdot$ soit sur l'acide nucléique soit sur le partenaire protéique (Oleinick *et al.*, 1986). Comme pour certains

rayonnements ionisants, OH^\bullet engendre la formation de liaisons covalentes entre une thymine et une cystéine. Ce type de modification est moins fréquent que les ruptures de simple brin d'environ un ordre de grandeur et n'est pas facilement réparables (Imlay & Linn, 1986).

c) Conséquences sur les protéines

L'oxydation des protéines, soumises à des conditions de stress oxydant, est initiée essentiellement par OH^\bullet (Berlett & Stadtman, 1997). Les conséquences directes sur les protéines sont diverses :

- *oxydation de la chaîne polypeptidique principale* (figure 4) : OH^\bullet arrache le proton du carbone α des acides aminés formant ainsi un résidu radicalaire très réactif (réaction c). En présence d' O_2 , ce radical peut évoluer jusqu'à la formation d'un dérivé hydroxylé de la protéine (réactions d à j). En absence d' O_2 , le radical carbène peut réagir avec lui-même et initier des pontages entre chaînes polypeptidiques (« protein cross-linkage »).

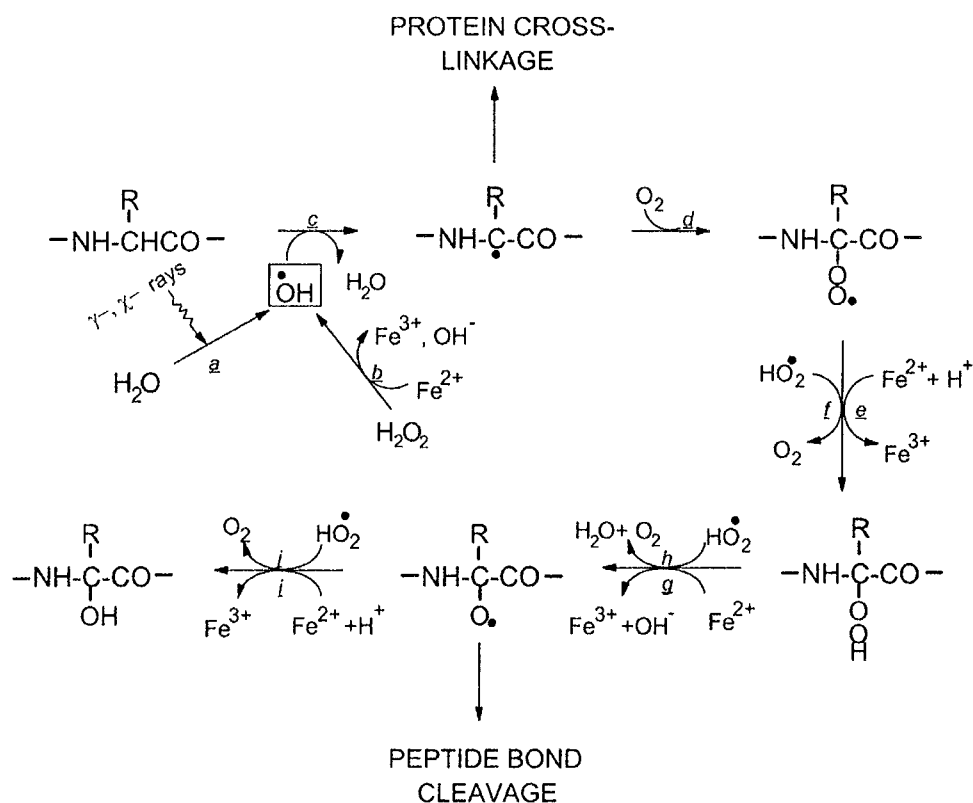


Figure 4 : Conséquences de l'oxydation des protéines initiées par OH^\bullet (d'après Berlett & Stadtman, 1997)

• *Fragmentation de la chaîne polypeptidique* : la génération d'un radical alkoxy est à l'origine du clivage de la liaison peptidique via deux chemins réactionnels, diamide (a) et α -amidation (b) (figure 5).

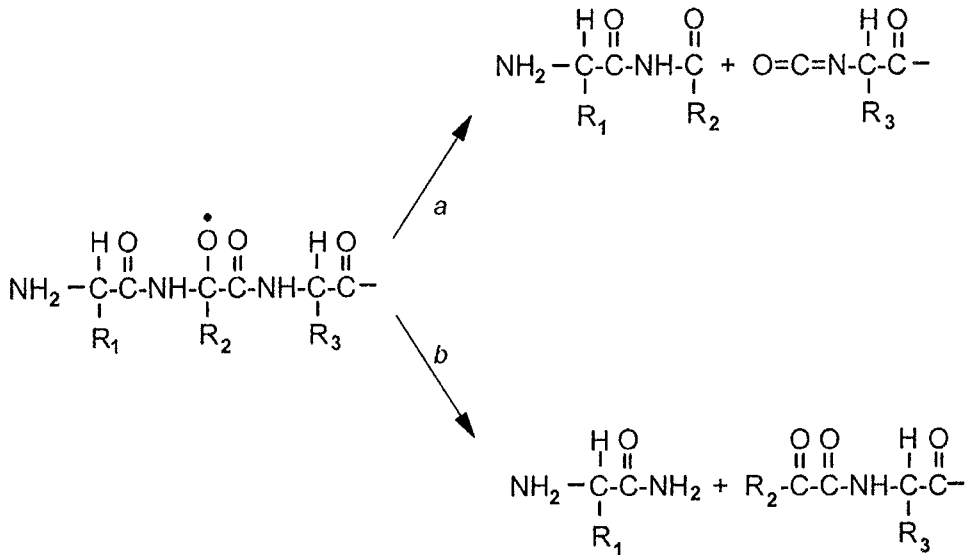


Figure 5 : Clivage des liaisons peptidiques par la voie diamide (a) et α -amidation (b). (d'après Berlett & Stadtman, 1997)

OH^\bullet peut également attaquer la chaîne latérale des résidus glutamyl, aspartyl ou prolyl. Il arrache par exemple l'atome d'hydrogène du carbone γ de la glutamine, générant un radical dont l'évolution conduit à la formation d'acide oxalique et d'un dérivé N-terminal N-pyruvyl (figure 6).

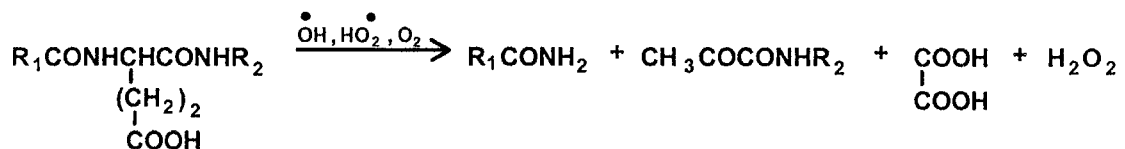


Figure 6 : Rupture de la chaîne polypeptidique au niveau d'un résidu glutamyl initiée par OH^\bullet (d'après Berlett & Stadtman, 1997)

• *Oxydation de la chaîne latérale des acides aminés* : tous les acides aminés d'une protéine sont une cible potentielle d'oxydation par OH^\bullet , cependant les produits d'oxydation de certains résidus n'ont pas encore été totalement caractérisés. Le tableau 1 regroupe les produits de l'oxydation des résidus les plus sensibles à l'oxydation.

Acides aminés	Produits d'oxydation
Cystéine	Pont disulfure, acide cystéique
Méthionine	Méthionine sulfoxyde, méthionine sulfone
Tryptophane	2-,4-,5-,6-, et 7- hydroxytryptophane, nitrotryptophane, kynurenine
Phénylalanine	3,4-Dihydroxyphénylalanine, 2-,3-, et 4-hydroxyphénylalanine
Tyrosine	tyrosine-tyrosine, tyrosine-O-tyrosine, nitrotyrosine
Histidine	2-Oxohistidine, asparagine, acide aspartique
Arginine	Glutamate semi-aldéhyde
Lysine	Semi-aldéhyde α -Aminoadipique
Proline	2-Pyrrolidone, glutamate semi-aldéhyde
Thréonine	Acide 2-amino-3 cétobutyrique
Acide glutamique	Acide oxalique, acide pyruvique

Tableau 1 : Produits d'oxydation des acides aminés les plus sensibles à l'oxydation (d'après Berlett & Stadtman, 1997)

• *Génération de dérivés carbonyles des protéines* : des groupements carbonyles peuvent être introduits dans les protéines par réactions avec des aldéhydes produits par exemple par la peroxydation des lipides ou par des dérivés carbonyles réactifs (cétoamines, cétoaldéhydes, déoxyosone) (figure 7, A,B).

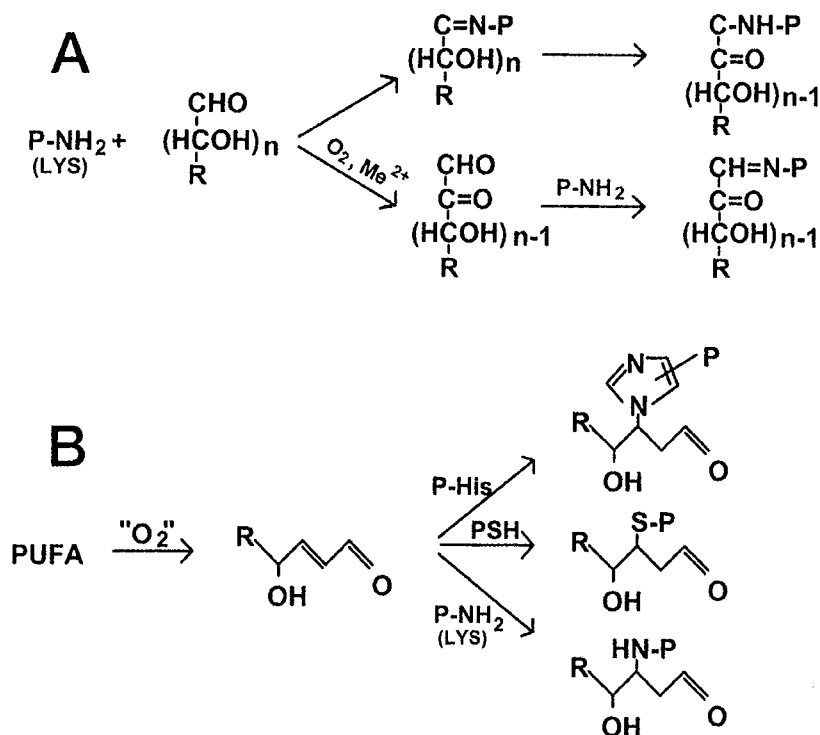


Figure 7 : Formation de dérivés carbonyles de protéines.
A : Réactions d'un sucre avec un résidu lysyl (P-NH_2^+)
B : Addition d'un acide gras insaturé (PUFA) sur différents résidus.
(d'après Berlett & Stadtman, 1997)

- *Accumulation des protéines oxydées* : le niveau intracellulaire de protéines oxydées reflète la balance entre le taux d'oxydation des protéines et le taux de protéines oxydées dégradées et/ou réparées (figure 8)

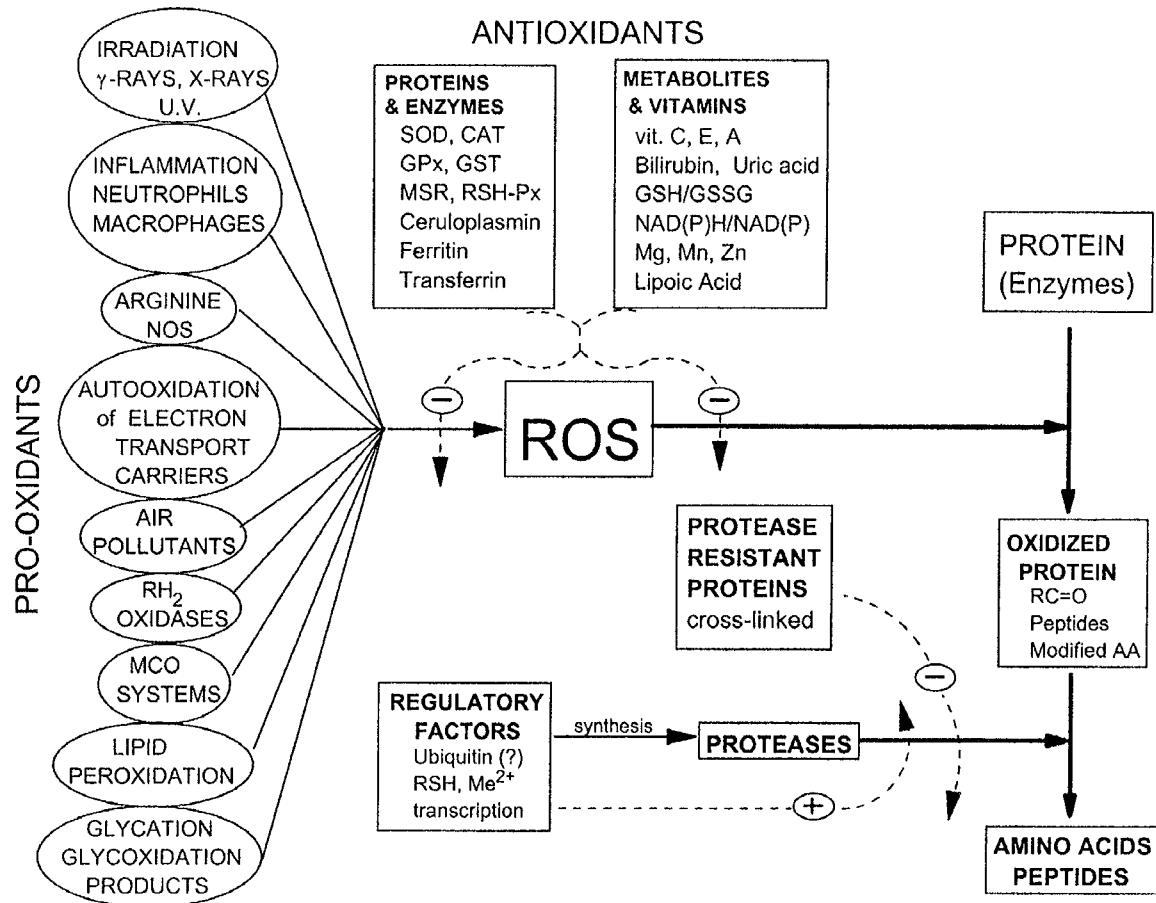


Figure 8 : Schéma illustrant la régulation du nombre de protéines oxydées dans la cellule
 MSR : Methionine sulfoxyde réductase, GPx : glutathione peroxydase ; CAT : catalase ; RSH-Px :
 peroxydase spécifique des thiols ; NOS : nitric oxyde synthase ; SOD : superoxyde dismutase ; GST :
 glutathione transférase. (d'après Berlett & Stadtman, 1997).

En conclusion, au sein d'une cellule soumise à des conditions de stress oxydant, l'ensemble des mécanismes décrits précédemment interfère amplifiant le phénomène. Imlay et Linn ont montré que l'origine des dégâts causés dans la cellule par le stress oxydant dépend directement de la quantité d'ERO en démontrant un mécanisme bimodal de destruction de souche d'*E. coli* par H₂O₂. Les faibles (1 à 3 mM) et fortes (> 20mM) concentrations en H₂O₂ sont plus létales que les concentrations intermédiaires (Imlay & Linn, 1986). A faible concentration, la mort des cellules est attribuée à des dommages sur l'ADN initiés par H₂O₂ et Fe²⁺ produisant un radical ferryl toxique. Cette exposition à une faible concentration en H₂O₂ induit une réponse protectrice des cellules qui activent des

mécanismes de réparation de l'ADN. A forte concentration, la mort des cellules ne serait plus directement liée à des dommages sur l'ADN, mais à l'oxydation de protéines cibles dans la cellule (Imlay & Linn, 1986).

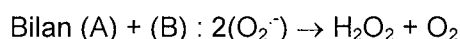
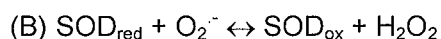
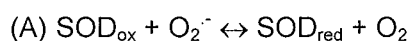
II. Les mécanismes de défense contre le stress oxydant

La défense de la cellule contre le stress oxydant s'organise autour de deux grandes phases. Tout d'abord une phase préventive de capture des ERO et ERN, puis une phase défensive de réparation des dégâts engendrés. L'ensemble de ces mécanismes est induit et régulé génétiquement.

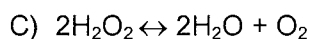
II.1. Capture des ERO et ERN

Des molécules sont constitutivement présentes et produites dans la cellule pour l'aider à maintenir un milieu intracellulaire réducteur et capter les entités réactives. Ces molécules sont notamment les réserves en cofacteurs NADPH et NADH, le β -carotène, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol ou encore le glutathion. Ce dernier est présent à forte concentration dans le milieu intracellulaire et est maintenu sous forme réduite par la glutathione réductase utilisant le NADPH comme source de pouvoir réducteur. Une seconde voie importante dans le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur implique la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase, également couplées aux réserves de NADPH (Jacquot *et al.*, 2002 ; Rouhier *et al.*, 2002).

Des enzymes spécifiques ont pour but de changer l'état d'oxydation de certaines ERO. C'est en particulier le cas des superoxyde réductases (SOD) (réactions A et B).



Dans la plupart des organismes H_2O_2 est éliminée par des activités catalases (réaction C).



D'autres enzymes participent à la protection de la cellule contre le stress oxydant et notamment les glutathion peroxydases et les superoxyde réductases...

La NADH-rubrédoxine oxydoréductase présentée dans la suite de ce manuscrit est proposée avoir entre autres ce type de fonction dans la cellule anaérobie, *Clostridium acetobutylicum*.

II.2. Réparation des dommages induits par le stress oxydant

La cellule possède des systèmes de réparation de l'ADN, des enzymes lipolytiques et protéolytiques afin de palier les inévitables dommages engendrés par le stress oxydant.

Les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN chez *E. coli* ainsi que leurs spécificités sont répertoriées dans le tableau 2.

Enzymes	Spécificité	Nombre de copies par cellules
Exonucléase III	AP endo II, répare en 3'	1000 à 10000
Endonucléase IV	AP endo II, répare en 3'	50 à 1000
Endonucléase III	TG-glycosylase ; β -lyase	500
FAPy glycosylase	FAPy	400
MutM	β -lyase ; dRPase	30
MutY	Adenine glycosylase	30

Tableau 2 : Type et spécificités des enzymes de réparation de l'ADN chez *E. coli*.
 AP : apurinique
 TG : thymine glycol
 FAP : formamidopyrimidine
 dRPase : 5'-déoxyribosephosphodiesterase

La grande variété des modifications sur les protéines engendrées par le stress oxydant impose l'existence de nombreux mécanismes de régénération dont beaucoup ne sont pas encore connus. Cependant, l'oxydation des méthionines au sein des protéines peut être réparée par les méthionine sulfoxyde réductases. L'étude structurale de ces enzymes constitue une partie de ce manuscrit.

Chez les bactéries, les levures, les mammifères et en général tous les organismes aérobies, la réponse au stress oxydant et la régulation des acteurs de lutte contre celui-ci sont contrôlées génétiquement. La figure 9 illustre cette régulation génétique et montre qu'elle est essentiellement organisée autour de deux facteurs de transcription majeurs, *OxyR* et *SoxRS* respectivement spécifiques de la réponse à H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$.

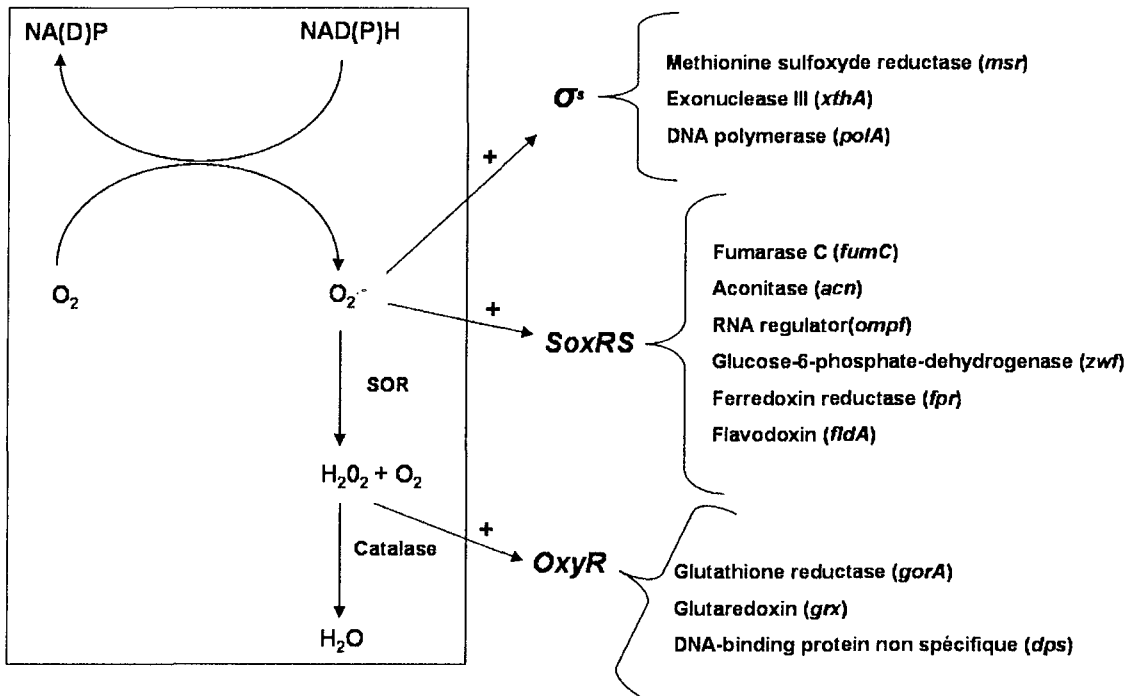


Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation génétique du stress oxydant impliquant les facteurs de transcription *OxyR*, *SoxRS* et σ^S . Le nom des gènes régulés est indiqué entre parenthèses après le type d'activité.

Cette réponse génétique permet aux cellules des différents organismes de développer une réponse adaptative au stress oxydant, c'est-à-dire une capacité d'évaluation des moyens à mettre en jeu pour une défense de plus en plus efficace.

La suite de ce manuscrit décrit les études biochimiques et structurales menées sur deux classes d'enzymes impliquées dans les mécanismes de réparation et régulation des dommages engendrés dans la cellule par le stress oxydant. La première partie se rapporte aux méthionine sulfoxyde réductases qui catalysent la réduction des résidus méthionine oxydés. La seconde partie concerne le système rubrédoxine/NADH rubrédoxine oxydoréductase, potentiellement impliqué dans une voie de régulation du stress oxydant chez la bactérie anaérobie stricte *Clostridium acetobutylicum*.

CHAPITRE A

LES PEPTIDE METHIONINE

SULFOXYDE REDUCTASES

L'étude structurale des méthionine sulfoxyde réductases (Msr) s'inscrit dans le cadre de deux collaborations, l'une avec le groupe d'enzymologie moléculaire dirigé par le professeur G. Branlant au laboratoire de maturation des ARN et enzymologie moléculaire (MAEM), et l'autre avec l'équipe dirigée par le professeur J.-P. Jacquot au laboratoire interactions arbres-microorganismes, à l'UHP de Nancy. Initiée au laboratoire par la résolution de la première structure cristallographique d'une MsrA, celle d'*E. coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000), et par la caractérisation par les enzymologistes de son mécanisme catalytique (Boschi-Muller *et al.*, 2000), cette étude s'est maintenant étendue aux Msr de nombreux organismes.

I. Introduction

Le maintien de l'homéostasie des systèmes physiologiques est basé sur le caractère dynamique des protéines, et requiert un moyen de contrôle de l'activité de celles-ci. Les enzymes peuvent exister dans un état latent, être activées, inhibées ou dans le cas de complexes multiprotéiques nécessiter l'association/dissociation des différents composants pour réguler leurs activités. Certains substrats protéiques nécessitent une modification structurale pour devenir la cible d'une attaque enzymatique (Vogt, 1979). La modification chimique de certains résidus d'une protéine constitue une autre voie de régulation possible. Par exemple, la formation ou la rupture d'un pont disulfure par oxydation/réduction de cystéines, les phosphorylations (Krebs, 1979) ou encore les méthylation (Paik & Kim, 1975) sont des mécanismes connus de régulation de l'activité des protéines *in vivo*. L'oxydation des méthionines en méthionines sulfoxydes (figure 1) au sein des protéines est un mécanisme de régulation découvert plus récemment. Les cystéines, les tryptophanes et les méthionines représentent les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation (Vogt, 1995). L'oxydation de la méthionine sulfoxyde en méthionine sulfone (figure 1) nécessite une catalyse par des agents oxydants plus puissants et n'est que très rarement observée dans des systèmes biologiques (Vogt, 1995). De plus, l'oxydation de la méthionine sulfoxyde en méthionine sulfone est biologiquement irréversible. Expérimentalement, l'oxydation spécifique des résidus méthionines d'une protéine en méthionines sulfoxydes est envisageable du fait de la haute sensibilité des méthionines aux agents oxydants. Cette réaction est réversible par réduction chimique ou via la réaction catalysée par les méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Pendant longtemps, l'oxydation des résidus méthionines au sein des protéines n'a été envisagée qu'en tant que modification rédhibitoire à l'activité enzymatique. La découverte d'un rôle d'activation induit par l'oxydation de résidus

méthionines, et la mise en évidence *in vivo* de la réduction enzymatique des méthionines oxydées, ont suggéré puis démontré le rôle régulateur de cette réaction d'oxydo-réduction.

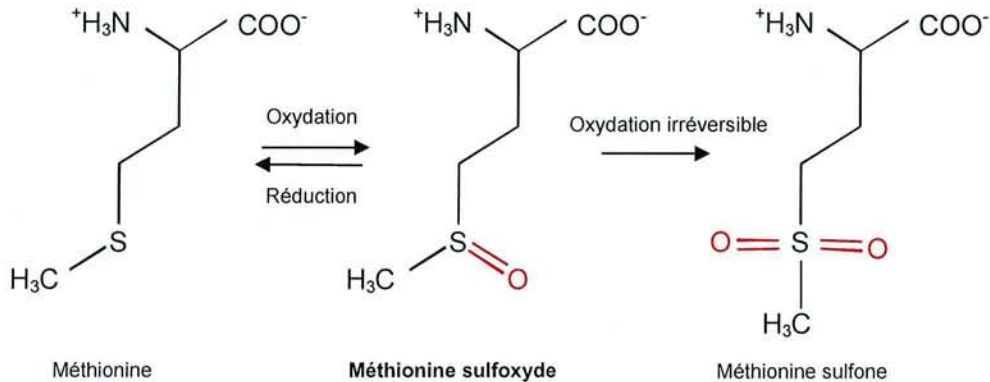


Figure 1 : Représentation schématique des différents états d'oxydation de la méthionine.

L'oxydation de la méthionine (Met) en méthionine sulfoxyde (MetSO) est considérée comme une modification post-traductionnelle non enzymatique des protéines. Elle peut engendrer des réorganisations locales de la chaîne protéique dont l'ultime conséquence est parfois la perte totale de fonction de la protéine. Les conséquences et les rôles physiologiques de l'oxydation des résidus méthionines sont maintenant très étudiés. Quelques exemples représentatifs sont décrits dans la première partie de cette introduction. Le second paragraphe résume les connaissances actuelles sur le rôle des méthionine sulfoxyde réductases (Msr), enzymes catalysant *in vivo* la réduction des méthionines sulfoxydes en méthionines. La troisième partie propose une classification des différentes Msr connues à ce jour et la quatrième partie dresse un bilan des propriétés biochimiques et structurales déjà caractérisées sur cette classe d'enzymes. Enfin, les objectifs de notre étude clôturent cette introduction.

1.1. Oxydation des résidus méthionines : conséquences et rôles physiologiques

1.1.1. Oxydation des résidus méthionines

La méthionine est un résidu particulier, sa chaîne latérale est hydrophobe mais, contrairement aux autres acides aminés de cette famille, sa chaîne latérale est flexible. Cette spécificité permet au groupe thioéther de s'adapter lors de phénomènes de reconnaissances structurales avec d'autres protéines et représente sans doute la raison pour laquelle les méthionines sont souvent impliquées dans la formation de centres réactifs. L'oxydation de la méthionine conduit à une méthionine sulfoxyde moins flexible et plus hydrophile. La probabilité d'oxydation d'une méthionine au sein d'une protéine et les conséquences

physico-chimiques engendrées varient en fonction de sa position dans le repliement de la chaîne polypeptidique. Si la méthionine se positionne à la surface de la protéine, elle sera très accessible et son oxydation conduira à une augmentation de l'hydrophilie de la protéine. Au contraire, si la méthionine est enfouie au cœur de la structure dans une poche, avec d'autres groupements hydrophobes, elle sera davantage protégée contre l'oxydation. Si toutefois elle s'oxyde, l'ensemble des groupements hydrophobes avoisinants peut être contraint à se réorganiser et, la poche s'ouvrant, l'hydrophobie globale de la protéine peut augmenter (Chao *et al.*, 1997).

a) Oxydation par des agents chimiques

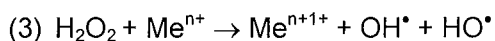
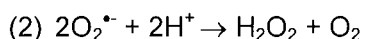
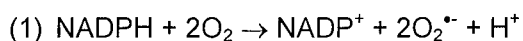
Certaines oxydations de résidus méthionines au sein de protéines peuvent se former « spontanément ». Ainsi, environ 10 % des méthionines C-terminales de préparation de Met-enkephaline sont observées oxydées en méthionine sulfoxyde après extraction et stockage (Clement-Jones *et al.*, 1980). De nombreux oxydants sont capables d'oxyder les méthionines, cependant certains sont plus spécifiques de celles-ci et laissent les autres constituants de la protéine intacts.

Dans un environnement acide, le peroxyde d'hydrogène oxyde plus sélectivement les résidus méthionines (Caldwel *et al.*, 1964 ; Brot *et al.*, 1983 ; Shechter *et al.*, 1986). Les meilleurs oxydants spécifiques des méthionines sont la chloramine T et le N-chloro-succinimide (Shechter *et al.*, 1975). Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) est également un oxydant relativement spécifique des méthionines (Shechter *et al.*, 1986), la réaction nécessitant un environnement fortement acide : pour une conversion complète et rapide en méthionine sulfoxyde, à 22°C, 1M HCl est nécessaire. Les cystéines sont aussi oxydées par le DMSO mais à un taux beaucoup plus faible (Shechter *et al.*, 1986).

b) Oxydation par des agents oxydants d'origine biologique

L'ensemble des agents oxydants biologiques tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, produits ou présents dans la cellule en condition de stress oxydant, est capable d'oxyder les résidus méthionines. Seul le radical $O_2^{\bullet-}$ ne le permet pas directement (Vogt, 1995). En condition de stress oxydant la cellule est confrontée à une multiplication d'espèces hyper-réactives. Dans le cas des cellules du système immunitaire par exemple, le système NADPH oxydase est activé afin de réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (réaction 1). Par dismutation spontanée, accélérée par une superoxyde dismutase, l'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

(réaction 2). Les métaux de transition sont essentiels pour générer le radical hydroxyle (OH^\bullet) à partir d' H_2O_2 (réaction 3).



L'auto-oxydation du fer divalent conduit à la production de radical OH^\bullet , via la réduction de l'oxygène et la dismutation de l'anion superoxyde résultant (Halliwell *et al.*, 1981). La présence de quantités catalytiques de cuivre ou de fer diminue drastiquement les concentrations en peroxyde d'hydrogène nécessaire à l'oxydation des méthionines via le radical hydroxyle. Le cuivre est un excellent catalyseur pour la génération de radicaux hydroxyles, car il est plus soluble et fixé moins fortement que le fer au sein des protéines.

L'anion hypochlorite (ClO^-) est un des oxydants biologiques les plus importants des méthionines. Il est généré à partir de l'anion chlorure et du peroxyde d'hydrogène par une myéloperoxydase (Clark *et al.*, 1981). ClO^- peut former des chloramines à partir d'amines. Par exemple, les leucocytes, lors de la réponse immunitaire, génèrent de la chloramine taurine à partir de la taurine. La chloramine taurine est plus stable et plus agressive que l'anion hypochlorure et peut voyager assez loin de son lieu de formation pour oxyder les méthionines en méthionines sulfoxydes (Weiss *et al.*, 1983).

Enfin, le monoxyde d'azote et toutes les entités nitrées réactives en dérivant sont capables d'oxyder les méthionines (Beckman *et al.*, 1990 ; Moskovitz *et al.*, 2001).

I.1.2. Conséquences et rôles physiologiques de l'oxydation des Met en MetSO

D'un point de vue fonctionnel, l'oxydation d'un résidu méthionine peut avoir différentes conséquences. Si la méthionine est directement impliquée dans la fixation de deux partenaires ou contribue à la formation d'un centre réactif, son oxydation conduit dans la majorité des cas observés à la rupture des forces de liaison et à l'inactivation de la protéine (Vogt, 1995). Néanmoins, certaines activités catalytiques peuvent être amplifiées par la présence d'un ou plusieurs résidus méthionine oxydés, comme observé pour les analogues de Met-enképhaline (Ling *et al.*, 1976). Enfin, l'oxydation d'un résidu méthionine peut permettre de rendre un site actif ou un site de fixation plus accessible, comme décrit pour la forme oxydée du 5^{ème} composant du complément humain (C5) (Vogt *et al.*, 1992).

a) Conséquences de l'oxydation des méthionines

Les études portant sur les conséquences physiologiques de l'oxydation des méthionines se sont multipliées depuis le début des années 90, ce paragraphe ne se veut pas exhaustif mais regroupe quelques exemples significatifs.

L'affinité de l'inhibiteur de l'élastase, α_1 -antitrypsine, est diminuée par l'oxydation de deux de ces résidus méthionine. Cette dérégulation de l'activité élastase est en particulier observée dans les phénomènes inflammatoires couplés à l'emphysème pulmonaire (Taggart *et al.*, 2000).

L'oxydation de deux résidus méthionines de l'apolipoprotéine A₁ conduit à une diminution de sa stabilité thermodynamique ainsi qu'à une sensibilité protéolytique accrue. Constituant majoritaire des HDL (lipoprotéines de haute densité), son oxydation pourrait jouer un rôle dans la formation des athéromes (Sigalov & Stern, 2001).

L'oxydation de l' α_2 -macroglobuline par la N-chloramine au niveau de six résidus méthionines et d'un résidu tryptophane, entraîne la dissociation de la forme homotétramérique en forme dimérique dépourvue d'activité protéolytique (Reddy *et al.*, 1994).

Enfin, chez les plantes, il a été démontré que l'oxydation des résidus méthionines de la protéine Hsp21 entraîne une perte totale d'activité de type chaperon suite à une réorganisation structurale de la protéine (Harndahl *et al.*, 2001). De la même façon, l'oxydation de la méthionine N-terminale du polypeptide α d'un des complexes photosynthétiques de la bactérie pourpre *Rhodospirillum rubrum* provoque une diminution de la stabilité du complexe multiprotéique via des changements conformationnels (Wang *et al.*, 2001).

b) Fonction régulatrice

Les premiers exemples de régulations liées à l'oxydation des résidus méthionines ont été décrits pour les canaux à potassium ou sodium voltage-dépendant dans la transduction du signal. Dans de nombreux cas, l'oxydation d'une ou plusieurs méthionines conduit à une diminution du temps d'inactivation des canaux (Ciorba *et al.*, 1997 ; Ciorba *et al.*, 1999 ; Quinonez *et al.*, 1999 ; Rohl *et al.*, 1999). Sur des canaux potassiques dépendants de la concentration en calcium, l'oxydation d'une méthionine régule positivement l'amplitude du signal traversant les canaux (Tang *et al.*, 2001).

L'oxydation de méthionines peut conduire comme dans le cas de la calmoduline à une réorganisation globale du repliement de la protéine modifiant son activité (Gao *et al.*, 1998). La calmoduline oxydée modifie ses interactions avec les ATPases membranaires en se fixant sur un site différent de son site fonctionnel bloquant les transitions structurales nécessaires à l'activation du complexe macromoléculaire membranaire (Gao *et al.*, 2001).

c) Fonction de préparation à la dégradation des protéines et rôle antioxydant

Le protéasome dégrade les protéines via une reconnaissance spécifique de régions hydrophobes sur les protéines à éliminer. Les réorganisations structurales locales ou globales engendrées par l'oxydation des méthionines peuvent favoriser l'exposition de zones hydrophobes et donc la protéolyse par la machinerie protéasomique (Davies, 2001).

L'oxydation des méthionines peut cependant participer à la protection cellulaire contre les espèces hyper-réactives oxydantes en fixant ces entités afin d'éviter qu'elles n'oxydent les résidus des centres réactionnels (Levine *et al.*, 1999). Par exemple, l'oxydation préférentielle de deux résidus méthionines à la surface des « *stem cell factor* » n'affecte pas leur fonction biologique contrairement à l'oxydation d'une méthionine plus protégée au sein de la protéine (Hsu *et al.*, 1996).

I.2. Rôles physiologiques des méthionine sulfoxyde réductases

La réduction d'une méthionine sulfoxyde en méthionine est catalysée par les méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Pour le maintien et la régénération de l'activité catalytique, les Msr doivent être couplées à un système accepteur d'électrons. *In vivo*, les Msr sont couplées via le système thiorédoxine, thiorédoxine réductase et NADPH au système redox cellulaire (figure 2). Les Msr sont des protéines ubiquitaires, elles sont caractérisées dans de nombreux organismes allant des bactéries (Moskovitz *et al.*, 1995), aux plantes (Sadanandom *et al.*, 2000) et mammifères (Moskovitz *et al.*, 1996) dont l'Homme (Kuschel *et al.*, 1999).

Les Msr participent à des fonctions physiologiques spécifiques, comme le montre la répartition de l'expression de cette enzyme dans les différents tissus différenciés. Chez le rat, des marquages immunocytochimiques révèlent la présence de Msr dans le foie, le rein, le cœur et le cerveau (Moskovitz *et al.*, 1996). Chez l'humain adulte, de forts taux d'ARN messagers (ARNm) codant une Msr sont observés dans ces mêmes tissus (Kuschel *et al.*, 1999). La forte expression de cette enzyme dans le foie et les reins, des organes de détoxification, suggère le caractère anti-oxydant des Msr. La répartition de l'activité Msr n'est pas homogène dans les différentes régions du cerveau. Cette hétérogénéité géographique suggère un rôle des Msr dans les fonctions neuronales, cependant celui-ci reste à élucider.

Le rôle régulateur des Msr est montré par leur capacité à annuler l'effet de l'oxydation des méthionines des canaux à potassium voltage-dépendant d'œufs de Xénope, comme cela a été montré avec la MsrA bovine (Ciorba *et al.*, 1997; Ciorba *et al.*, 1999) et la MsrB humaine

(Jung *et al.*, 2002). Cette inversion des effets de l'oxydation par la MsrA a également été observée dans le cas des canaux à potassium dépendant du calcium (Tang *et al.*, 2001) et dans la restauration de la capacité de la calmoduline à fixer le calcium (Sun *et al.*, 1999).

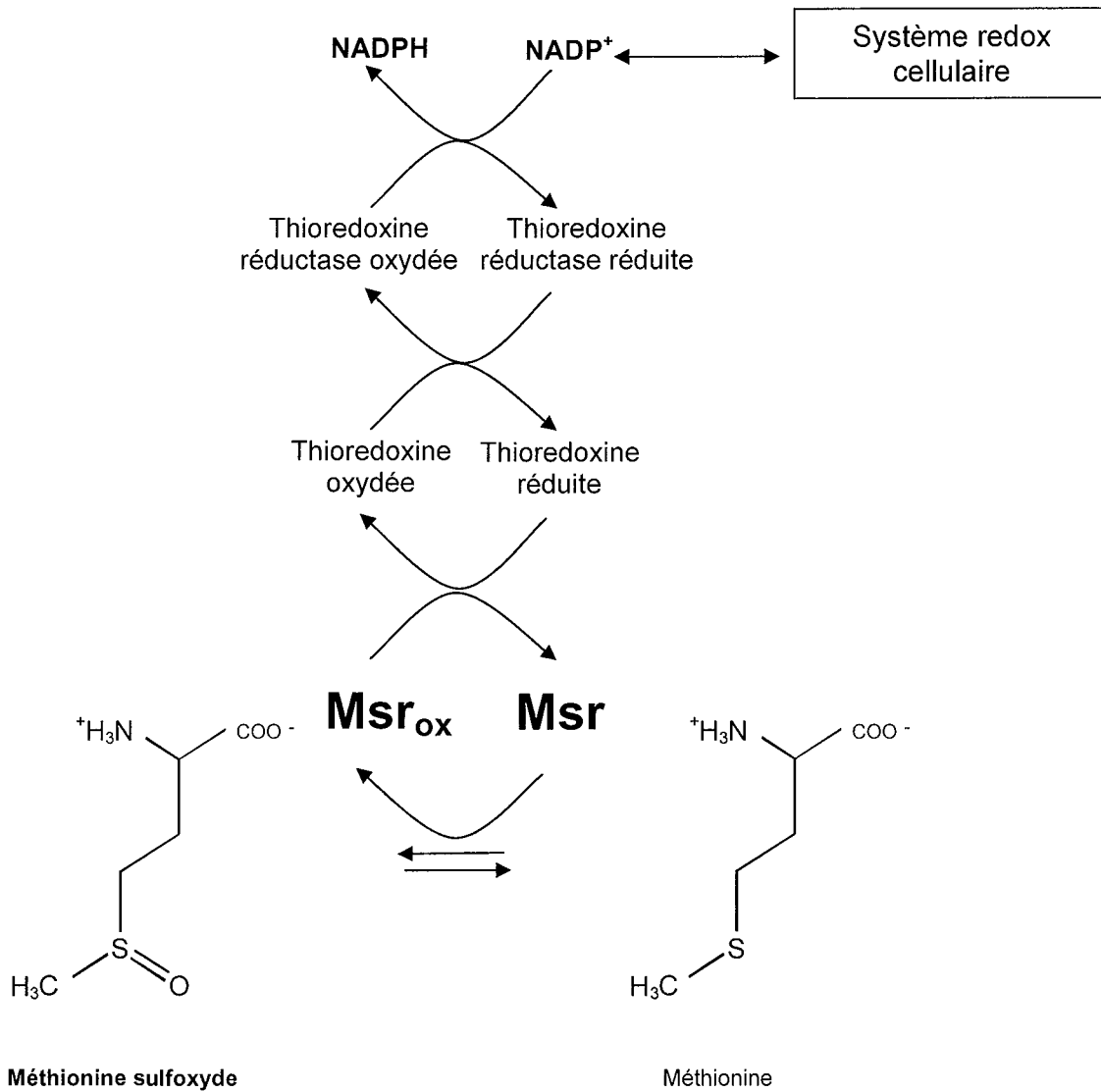


Figure 2 : Réaction catalysée par les méthionine sulfoxyde réductases (Msr)
D'après Hoshi & Heinemann, 2000

I.2.1. Implication dans les phénomènes de résistance au stress oxydant et lien avec le vieillissement

Les Msr ont un rôle général de protection contre le stress oxydant en catalysant le recyclage des MetSO de surface en méthionine. Ces résidus méthionine sont supposés « absorber » un choc oxydant et de par leur localisation périphérique constituent un substrat privilégié des Msr (Levine *et al.*, 1996).

Le stress oxydant généré par les cellules du système immunitaire en réaction à une invasion bactérienne est supposé inactiver les agents pathogènes, cependant l'activité chronique du système immunitaire dans des contextes d'arthrite rhumatoïde par exemple, peut induire des dommages cellulaires importants. Une grande partie du pouvoir destructeur du stress oxydant dans les pathologies du type arthrite rhumatoïde (Chidwick *et al.*, 1991) ou emphysème pulmonaire (Janoff *et al.*, 1979 ; Johnson & Travis, 1979) incombe à l'inhibition de l' α 1-antiprotéase. L'incubation de l'inhibiteur de l' α 1 protéase oxydé avec une Msr restaure son activité et supprime l'activité protéolytique (Mohsenin & Gee, 1989). Ce rôle général des Msr dans la protection contre le stress oxydant a été confirmé par des expériences d'interruption du gène *msrA*, chez *E. coli* et *S. cerevisiae*, qui ont montré que ces souches avaient une plus grande sensibilité à H₂O₂ (Moskovitz *et al.*, 1995; Moskovitz *et al.*, 1997). Une souris mutante, déficiente en MsrA, présente une plus grande sensibilité à l'hyperoxie ainsi qu'une forte accumulation de protéines oxydées dans les tissus (Moskovitz *et al.*, 2001). Inversement, une surexpression du gène *msrA* dans les lymphocytes T humains leur confère une plus grande résistance à H₂O₂ (Moskovitz *et al.*, 1998).

Le niveau intracellulaire de protéines oxydées augmente avec l'âge (Stadtman & Berlett, 1999). Ce phénomène a été observé dans le cerveau humain (Carney *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1991), dans certaines cellules des yeux (Garland *et al.*, 1988) et les erythrocytes (Oliver *et al.*, 1987). La quantité de protéines oxydées est estimée augmentée de 50 % chez un humain de 80 ans (Stadtman, 1992). En particulier, le processus de vieillissement augmenterait le nombre de MetSO dans les protéines humaines (Chao *et al.*, 1997). De plus, le taux de MsrA diminue dans différents organes du rat au cours de son vieillissement, principalement au niveau du cerveau (Petropoulos *et al.*, 2001). Des souris mutantes ne produisant plus de MsrA présentent une espérance de vie réduite de 40% (Moskovitz *et al.*, 2001), alors que les drosophiles surexprimant la MsrA bovine, en particulier au niveau du cerveau, ont une espérance de vie augmentée de 40%, avec une activité physique normale et une capacité de reproduction prolongée dans le temps (Ruan *et al.*, 2002). Enfin, les conséquences de l'oxydation des protéines et des méthionines en particulier sont un aspect important dans les travaux sur les pathologies dégénératives comme la maladie de Parkinson (Cohen *et al.*, 1999), la maladie d'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996) ou encore

certain types de cataracte (Garland, 1991). Dans ces processus, l'oxydation/réduction des résidus méthionines et l'expression des Msr pourraient jouer un rôle non négligeable. En effet, des taux de Msr particulièrement faibles et décroissants avec l'avancement de la maladie ont été observés dans des échantillons de cerveau (Gabbita *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la surexpression des Msr pourrait conduire à des conséquences bénéfiques sur l'évolution de la maladie.

1.2.2. Msr et pathogénicité bactérienne

Différentes études démontrent l'implication directe des Msr dans la pathogénicité de certaines bactéries. Il a été montré, par exemple, que des souches mutantes d'*Erwinia chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) dont le gène *msrA* a été désactivé (en le remplaçant par un allèle inactif) sont incapables de provoquer une invasion systématique de la plante (Hassouni *et al.*, 1999). Des souches mutantes de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) et de *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) n'exprimant pas de MsrA présentent une baisse significative de leur adhérence sur les cellules pulmonaires et endothéliales (Wizemann *et al.*, 1996). De même, l'inactivation du gène *msrA* conduit à une diminution de l'adhérence de *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) sur les érythrocytes de mouton (Dhandayuthapani *et al.*, 2001).

1.3. La famille des Msr

1.3.1. Les différentes classes de Msr

L'oxydation des Met en MetSO produit un mélange racémique des deux stéréoisomères (figure 3) de configuration R et S sur l'atome de soufre de géométrie sp_3 de la MetSO. La réduction des L-MetSO formées *in vivo* pourrait être envisagée selon trois processus :

- 1) l'existence d'une Msr réduisant les deux stéréoisomères
- 2) l'existence d'une racémase qui permettrait un changement de stéréochimie vers une forme réductible par une Msr spécifique de l'une des deux formes
- 3) l'existence de deux classes de Msr, chacune spécifique d'un des deux stéréoisomères

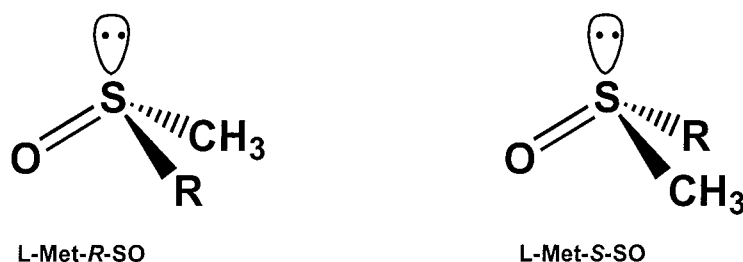


Figure 3 : Représentation en perspective cavalière de la Met-R-SO et de la Met-S-SO

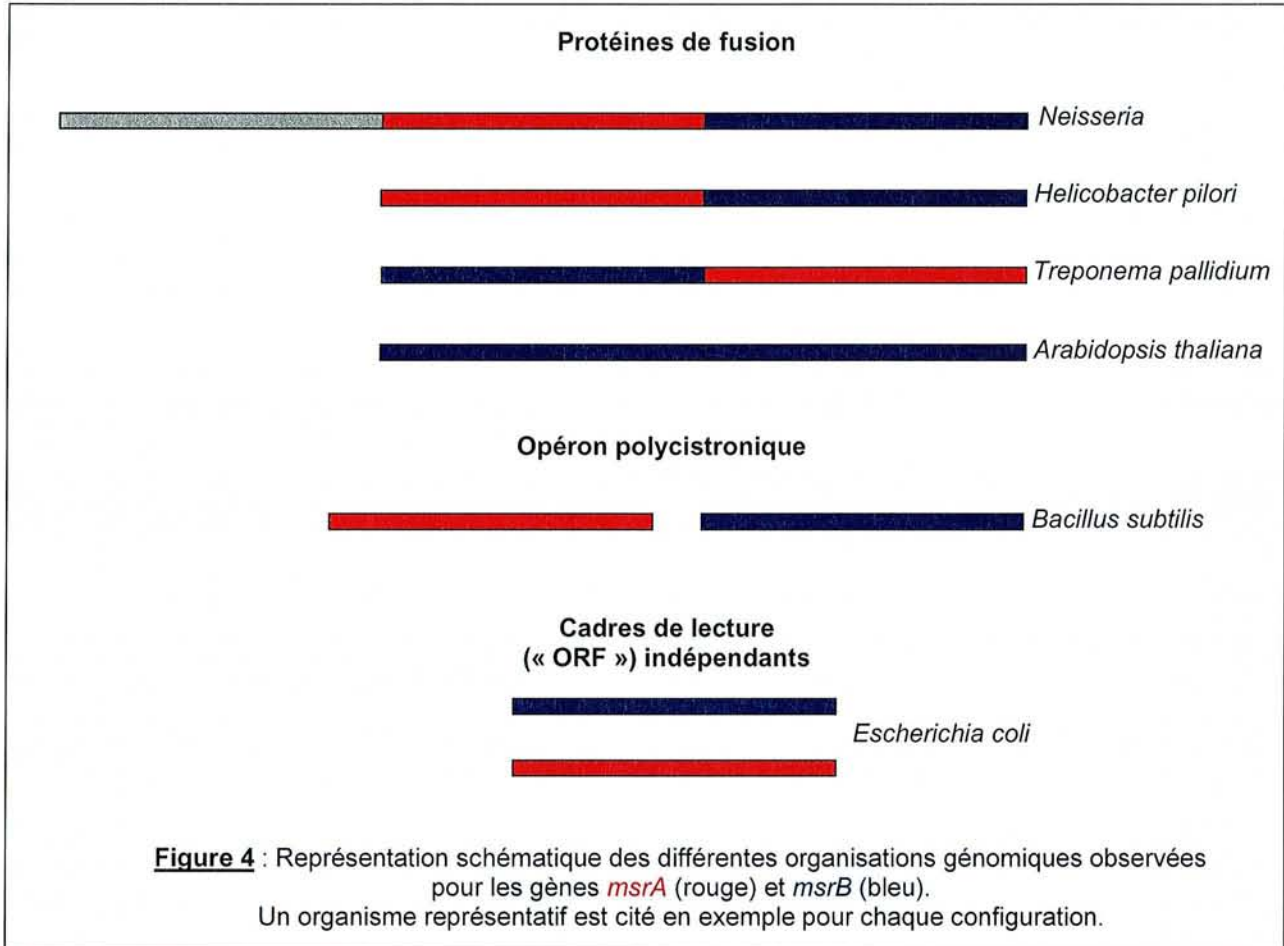
Deux activités Msr de stéréospécificité inverse ont été isolées à ce jour. Les MsrA sont stéréospécifiques des Met-S-SO libres ou incluses dans une chaîne polypeptidique. Cette spécificité a été montrée sur la MsrA de *Bos taurus* (*B. taurus*) (Sharov *et al.*, 1999), puis ensuite sur les MsrA de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *E. coli*, *N. meningitidis* et *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (Moskovitz *et al.*, 2000; Moskovitz *et al.*, 2002; Olry *et al.*, 2002). Les MsrB identifiées plus récemment, en premier lieu chez *E. coli* par l'équipe du professeur F. Barras à Marseille, puis chez *N. meningitidis* par l'équipe du professeur G. Branlant à Nancy, se sont avérées être stéréospécifiques des Met-R-SO liées à une protéine ou libres (Grimaud *et al.*, 2001; Olry *et al.*, 2002). De plus, les travaux chez *E.coli* menés sur une protéine modèle, la calmoduline, ont montré que seule l'action conjuguée de l'activité MsrA et de l'activité MsrB permet la réduction totale des huit résidus méthionine oxydés (Grimaud *et al.*, 2001).

Deux nouvelles Msr ont été décrites comme étant spécifiques des Met-S-SO libres pour les FSMsr (« free SMr ») et des Met-R-SO libres pour les FRMsMr (« free RMsMr »). Ces deux nouvelles activités, FSMsr et FRMsMr, ont été respectivement détectées lors de purifications partielles d'extraits bruts d'*E. coli* sur des souches *mrsA*⁻ ou *mrsA*⁻ / *mrsB*⁻ (Moskovitz *et al.*, 2000; Etienne *et al.*, 2003). Il existe enfin une autre activité Msr, isolée à partir d'une souche *mrsA*⁻ / *mrsB*⁻, qui est décrite comme étant spécifique des membranes. Elle serait spécifique des MetSO libres ou liées, qu'elles soient de stéréochimie R ou S, sans savoir si cette activité est due à une ou plusieurs enzymes distinctes (Spector *et al.*, 2003).

1.3.2. Organisation génomique

La complémentarité fonctionnelle des MsrA et MsrB dans la réduction des Met-R,S-SO pourrait privilégier une même régulation transcriptionnelle. En effet, les gènes *mrsA* et *mrsB* peuvent adopter diverses organisations génomiques (figure 4). Dans le cas de *Bacillus subtilis*, ils sont localisés dans un même opéron. Dans le cas d'*Helicobacter pylori*, un seul cadre de lecture (« ORF ») conduit à l'expression d'une protéine fusionnée MsrA-MsrB. Enfin, pour *N. meningitidis*, cette organisation est retrouvée hormis la présence d'une

séquence supplémentaire en 5' codant un domaine présentant des homologues de séquence avec des oxydoréductases DsbE (« disulfide bond reductase E »). Cependant, dans la majorité des cas, comme chez *E. coli*, les deux gènes sont indépendants. Enfin, il est à noter que quelques archaeons et des bactéries hyperthermophiles ne présentent aucun de ces gènes *msr*. Aucune corrélation avec le caractère aérobie ou non de l'organisme ne se dégage de cette observation (Kryukov *et al.*, 2002).



1.3.3. Classification des Msr en fonction du nombre de cystéines

Un même mécanisme catalytique a été démontré pour les Msr de classes A et B (voir chapitre 1.4.1). L'activité réductase est gouvernée par une cystéine catalytique qui doit être régénérée avant un nouveau cycle. Cette régénération est différente selon les organismes mais fait dans la majorité des cas appel à une ou deux autres cystéines dont les positions varient d'un modèle à l'autre. C'est pourquoi le nombre et la position des cystéines dans les Msr constituent une base logique de classification de ces enzymes.

a) Les MsrA

La comparaison des séquences de MsrA permet de distinguer au moins six sous-classes dans cette famille d'enzymes en fonction du nombre et de la position des cystéines conservées (figure 5, tableau 1).

	CYSTEINES			
	A (51)	B (54)	C (198)	D (206)
<i>Escherichia coli</i> <i>Bos taurus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-	+	+
<i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i>	+	+	+	-
<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	+	-	-	-
<i>Gracilaria gracilis</i>	+	-	-	+

Tableau 1 : Illustration du nombre et de la position des cystéines dans différents organismes représentatifs des six sous-classes de MsrA.

+ : présence de cette cystéine

- : absence de cette cystéine

La numérotation de la MsrA d'*E. coli* est indiquée entre parenthèses sous chacune des positions des cystéines.

La cystéine catalytique **A** semble conservée dans toutes les séquences de MsrA issues des différents règnes et se situe dans une signature **GCFW** conservée. Notre étude s'est tout d'abord intéressée à la sous-famille à trois cystéines (**A,C** et **D**) dont un des modèles d'étude est la MsrA d'*E. coli*. Cette sous-famille regroupe également la plupart des MsrA d'origine végétale et en particulier celle du peuplier qui a fait l'objet d'une partie de nos travaux. Ces derniers ont également porté sur la sous-famille de MsrA à deux cystéines (**A** et **C**) et plus précisément sur le module MsrA de la protéine PILB de *N. meningitidis*.

Ec	1	-----MSLFDKKHLVSPADALPGRNTPMPVATLHAVNG-HSM--TN	39
Bt	1	MLSVTRRALQ--LFHSLFPIPRMGDSAQIVSPQEALPGRKEPLVVAAKHHVNGNRTV--EP	58
At	1	-----MNILNKLIGIG---SSR-QTNMDPSPIAQVIDD-----EA	30
Dr	1	-----MGWHPLGEHGAPHNSSMTQQTNSQ----G-----TQ	28
Ss	1	-----	
Sc	1	-----MSSLISKTIKY-----D	12
Nm	131	AQSLNISVYPSWALIGKGDVQRIVKGSINEAQALALIRDPNADLGLSKHSFYKPDQTKKDS	193
Bs	1	-----	
Sa	1	-----	
Rc	1	-----MRRLVLALALALATPAFAEEFRVIPPAAVD-----AA	32
Gg	226	GSDDVHGLDARNELIPLMTSAAASVSSPAATEVLSAEETETDTALPADVSE-----EK	282
Ec		VPDGMEDIAIFAMGCFWGVVERLFWQLPG--VYSTAAGYTGG---YTPNPT---YREVCSGDTG	92
Bt		FPEGTQMAVFMGMCFWGAERKFWTLKG--VYSTQVGFAGG---YTPNPT---YKEVCSGKTG	112
At		PAPGNQFTQFGAGCFWVSELAYQRVPG--VTQTEVGYSGQ---ITHDPS---YKDVCSGTTN	84
Dr		PGAAEQAI FAGGCFWCTEAVMQDLRG--VQKVESGYIGG---TVPNPD---YRSVCGGQTG	81
Ss		----MEVATLGGGCFWCTEAVYKRVKG--VISVKPGYSGG---HVPNPT---YEDVCTDTTG	50
Sc		P-AKDKLITLACGCFWGTETMYRKYLNDRIVDCKVGYANGEESKSDSPSSVSYKRVCGGDTD	73
Nm		KIMNTRTIYLAGGCFWGLEAYFQRIDG--VDAVSGYANG---NTKNPS---YEDVSYRHTG	247
Bs		MSEKKEIATFAGGCFWCMVKPFDEQPG--IEKVVSGYTGG---HTENPT---YEEVCSETTG	54
Sa		--MTKEYATLAGGCFWCMVKPFTSYPG--IKSVVSGYSGG---HVDNPT---YEQVCTNQTG	52
Rc		ALTGPETAIFAGGCFWGVQGVFQHLNG--VISATSGYAGG---TAATAH---YDQVSGGETG	86
Gg		PKTETKEIVFGAGCFWGVVELAFQRVAG--VLKTEVGYSGG---KMSRVT---YDAICTGATG	335
		**** * * *	
Ec		HAEAVRIVYDPSVIVSYEQLLQVFWEN-HDPAQGMROGNDHGTYRSAIYPLTPEQDAAARAS	153
Bt		HAEVVRVVFQPEHISFEELLKVFWEEN-HDPTQGMROGNDHGSQYRSAIYPTSAEHVGAALKS	173
At		HAEIVRVQYDPKECSYQSLLDLFWFSK-HDPTTLNRQGNVGTQYRSGIYFYNPEQEKLARES	145
Dr		HAEAVRVTFDPNQISYRDLLGLFFAT-HDPTSLNRQGNVGTQYRSGIFPLTQEQEQTAREM	142
Ss		HAEVVQITFDSSIIISYREILEIFFEI-HDPTTLNRQGNVGTQYRSIILYHNEEQRKIAEEM	111
Sc		FAEVLQVSYNPKVITLRELTDFFRFRI-HDPTTNSQGPDKGTQYRSGLFAHSDADLDELAKI	134
Nm		HAETVKVTYDADKLSLDDILQYFFRV-VDPSTLNKQGNVGTQYRSGVYYTDPAEKAVIAAA	308
Bs		HREAVQITFHPDVFVPEKLELFWQQ-IDPTDAGGQFADRGSSYRAAIFYHNDKQKELAEAS	115
Sa		HVEAVQITFDPEVTSFENILDYFKT-FDPTDDQGGQFDRGESYQPVIFYHDEHQKKADEFK	113
Rc		HAEAVQVVFDPKQISYGDLLQVFFSVAHDPTQLNRQGNVGTQYRSGVYYTDPAEKAVIAAA	148
Gg		SAEVVRVWYDPSVLFKQLLEVWESR-HDPTSLNKQGNVGTQYRSGVYYTDPAEKAVIAAA	396
		* * * * *	
Ec		LERFQAAMLAADDDRHITTEIANATPFYEAEDDQYQLHKNPY-GYCGIGGIGVCLPPEA--	212
Bt		KEDYQKVLSEHGFG-LITTDIREGQTFYEAEDYHQYLSKDPD-GYCGLGGTGVSCLPLGIKK	233
At		LERHQQ---Q-VDRKVVTEILPAKKFYRAEEHHQYLSKGGFRFLKQSTKGCNDPIRCYG	202
Dr		IEQLGT---EDVFRPIVTSIEPASTFYVAEDYHQYNYKNNPGQGYCMAVISPKVAKLRQYY	201
Ss		IREV-----EKRIGKVVTELKPFVFEYEAEDYHDFYDKHKYNPYCRVISPVKKFMKLF	168
Sc		KEEQP---K-WGNKIATVIEPIKNFYDAEYHQYLDKPNQGYACPTHYLRM-----	184
Nm		LKREQQ---K-YQLPLVVENEPKNFYDAEYHQDYLIKPNP-GYCHIDIRKADEPLPGKT	364
Bs		KQRLAE---SGIFKDPVITDILKAEPFYEAEGYHQHFYKKNPAHYQRYRTGSGRAGFISEHW	174
Sa		KQQLNE---QGIFKPKVITPIKPYKNFYPAEDYHQDYKKNPVHYYQYQYRGSGRKAFIESHW	172
Rc		IDQLGR---ARAFDAAIVTQLDPGAIFYPAEAYHQNFLLNPDHPYIVQVDMPKIAALERMF	207
Gg		ISEAST---R-HTKEIVTEVAAIKNYCAEEYHQRYLEKKG----QSAEKSSASIRCYG	448
		** *	
Ec		-----	212
Bt		-----	233
At		-----	202
Dr		GDKLR-----	206
Ss		PDKVKIHEG-----	177
Sc		-----	184
Nm		KTAPQGGKGFDAATYK	379
Bs		GAK-----	177
Sa		GNQNA-----	177
Rc		PQDWREVPVLLPVAD	222
Gg		-----	448

Figure 5: Alignement des séquences de quelques MsrA représentatives des différentes sous-classes.

Ec : *Escherichia coli*, **Bt** : *Bos taurus*, **At** : *Arabidopsis thaliana*, **Dr** : *Deinococcus radiodurans*, **Ss** : *Sulfolobus solfataricus*, **Sc** : *Saccharomyces cerevisiae*, **Nm** : *Neisseria meningitidis*, **Bs** : *Bacillus subtilis*, **Sa** : *Staphylococcus aureus*, **Rc** : *Rhodobacter capsulatus*, **Gg** : *Gracilaria gracilis*.

Les étoiles noires soulignent les résidus conservés, le code couleur des cystéines correspond au tableau 1.

b) Les MsrB

Deux sous-familles de MsrB peuvent être distinguées en considérant le nombre et la position des résidus cystéines (figure 6, tableau 2). Cette classification peut-être complétée en répertoriant la présence ou non d'un motif de fixation de cation métallique.

	A (128)	B (74)	U (128)	CATION METALLIQUE
<i>Homo sapiens SEL X</i> <i>Mus musculus SEL R</i>	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	+	+	-	+
<i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+
<i>Bacillus halodurans</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	+	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> <i>Pseudomonas europae</i>	+	-	-	-

Tableau 2 : Nombre et position des cystéines dans différents organismes représentatifs des sous-classes de MsrB.

+ : présence de cette cystéine ou du site métallique

- : absence de cette cystéine ou du site métallique

La numérotation de la MsrB d'*E. coli* est indiquée entre parenthèses sous chacune des positions des cystéines **A** et **B**.

U symbolise une sélénocystéine.

Les MsrB de mammifères (SELX chez l'homme et SELR chez la souris) peuvent être classées dans une famille particulière puisque possédant une sélénocystéine (**U**) en lieu et place de la cystéine catalytique (**A**).

La première sous-famille possède une deuxième cystéine (**B**), en plus de la cystéine catalytique (**A**), impliquée dans le mécanisme de recyclage de l'activité réductase. C'est le cas de la MsrB de *N. meningitidis* ou d'*E. coli*. Notre contribution à l'étude structurale des MsrB concerne cette sous-famille et en particulier le module MsrB de la protéine PILB de *N. meningitidis*. L'autre sous-classe, qui représente 40% des MsrB putatives, ne possède pas de cystéine de recyclage. C'est le cas par exemple des MsrB de *Rhodobacter capsulatus* ou *Legionella pneumophila*. Enfin, ces deux sous-familles peuvent être subdivisées en tenant compte de la présence ou non de quatre cystéines supplémentaires, situées dans des signatures CXXC, dont le rôle est de fixer un métal de type zinc ou fer. C'est en particulier le cas de la MsrB d'*E. coli*.

I.4. Propriétés des Msr

I.4.1. Le mécanisme catalytique

Les MsrA et MsrB présentent un même mécanisme catalytique à trois étapes schématisées sur la figure 7.

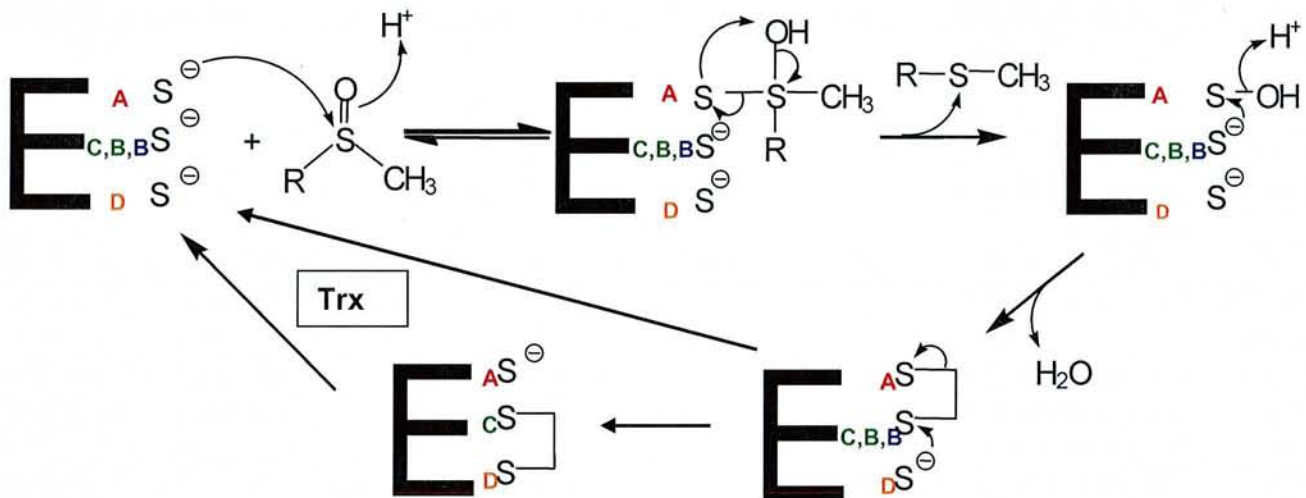


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des Msr (d'après Boschi-Muller *et al.*, 2000 et Oly *et al.*, 2002)

Le code couleur pour les cystéines correspond à celui des tableaux 1 et 2.

Dans une première étape, un complexe michaelien formé entre la Msr et la MetSO précède la formation d'un intermédiaire ou/et état de transition entre la cystéine **A** et la MetSO, qui conduit ensuite à un intermédiaire acide sulfénique et au relargage d'une mole de méthionine par mole d'enzyme. Dans une seconde étape, la cystéine **B** ou **C** pour les MsrA et la cystéine **B** pour les MsrB attaque l'intermédiaire acide sulfénique conduisant à la formation d'un pont disulfure intramolécule et à la libération d'une molécule d'eau. Dans la

troisième étape, la formation d'un complexe michaélien entre la Msr oxydée sous forme pont disulfure intramoléculaire et la thiorédoxine (Trx) réduit la Msr. La Trx sera réduite par le système thiorédoxine réductase/NAPDH. Le mécanisme proposé est en accord avec un mécanisme de type ping-pong et est décrit pour la MsrA d'*E. coli* (Boschi-Muller *et al.*, 2001) et la MsrB de *N. meningitidis* (Olry *et al.*, 2002).

Dans le cas des MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus*, la formation du pont disulfure **A-C** intramoléculaire est suivie par la formation d'un second pont disulfure intramoléculaire **C-D**, lui même réduit par la Trx.

L'existence des MsrB ne possédant pas de cystéine **B** pour la régénération de la cystéine catalytique suggère l'existence d'un mécanisme différent. La thiorédoxine pourrait par exemple directement réduire l'acide sulfénique formé dans la deuxième étape de la réaction (Jung *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2002). Cependant un tel mécanisme n'a pas encore été démontré dans le cas des Msr. Il est par contre établi que certaines glutarédoxines (Grx) sont capables de réduire directement l'acide sulfénique formé sur la cystéine catalytique d'un de leurs partenaires, les peroxyrédoxines (Prx) (Rouhier *et al.*, 2002). Notons enfin que la MsrA de l'algue rouge *Gracilaria gracilis* est fusionnée à deux modules Grx en position N-terminale.

1.4.2. Spécificité de substrat

Comme indiqué précédemment, les MsrA et les MsrB sont respectivement spécifiques des isomères *R* et *S* de la MetSO. Les études réalisées dans le groupe du professeur G. Branlant sur les modules MsrA et MsrB de *N. meningitidis* incluant la détermination des constantes k_{cat} et K_M pour la MetSO à l'état stationnaire ont montré que :

- 1) La présence de l'oxygène de la fonction sulfoxyde est indispensable à la fixation de la MetSO, la methionine n'étant pas inhibiteur.
- 2) La poche de spécificité impliquée dans la reconnaissance du méthyle est sélective, l'affinité apparente de l'analogue avec un groupement éthyle étant plus faible.
- 3) La présence d'au moins deux carbones entre le carbone α et l'atome de soufre du sulfoxyde est nécessaire.
- 4) La stéréochimie au niveau du carbone α n'est pas essentielle.
- 5) La protection des groupements NH_2 et $COOH$ sous forme de liaison amide améliore l'affinité apparente du substrat. C'est le cas pour la MsrB et plus particulièrement lorsque le groupement NH_2 est protégé (Olry *et al.*, 2002).

Les enzymologistes ont également démontré que l'étape limitante de la réaction est liée à la réduction par la thiorédoxine et que les étapes de formation de l'acide sulfénique et de

formation du pont disulfure intramolécule **A-C** s'effectuent dans le même ordre de grandeur de vitesse (Antoine *et al.*, 2003).

I.5. Contexte structural et objectifs de notre étude

Lorsque nous avons débuté notre étude, seules les structures des MsrA d'*E.coli* et de *Bos taurus* (*B.taurus*) étaient résolues (Tête-Favier *et al.*, 2000 ; Lowther *et al.*, 2000). La MsrA d'*E.coli*, résolue au laboratoire à 1.9 Å de résolution par la méthode MAD, est un monomère de 211 résidus présentant un repliement de type α/β composé de 18.5 % d'hélices α , 16,6 % de brins β et 65 % de régions sans structure secondaire (figure 8).

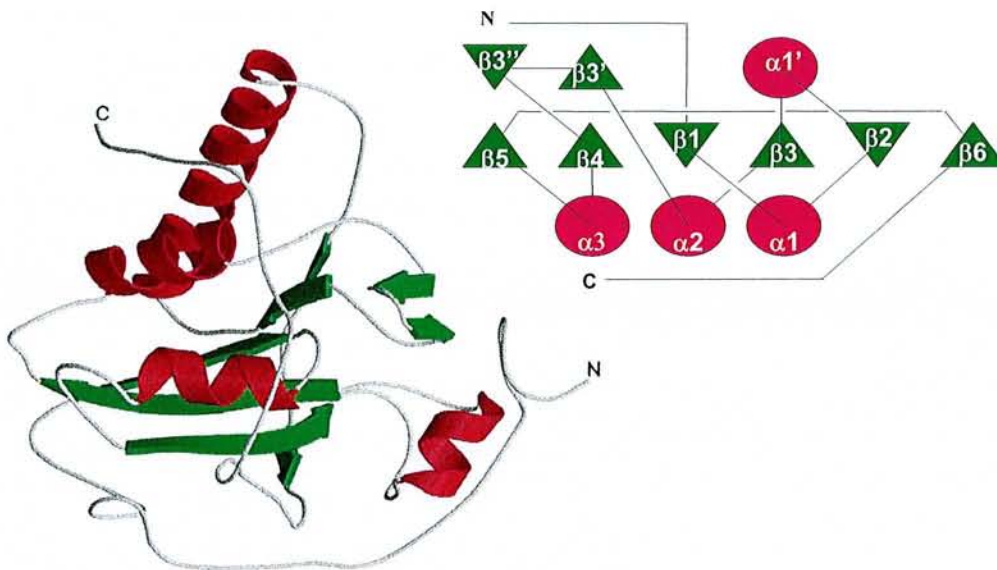


Figure 8 : Structure et diagramme de topologie de la MsrA d'*E.coli*
Les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β en vert et les régions non structurées en gris.

La cystéine catalytique **A** (Cys51) se trouve dans une région N-terminale accessible au solvant. Une molécule de diméthyl arsenate (issue du tampon cacodylate de cristallisation) est fixée covalentement sur l'atome de soufre S_γ de cette cystéine **A**. Cette modification pourrait mimer un état de transition. Cet aspect sera développé plus loin dans le manuscrit. Les deux autres cystéines impliquées dans le mécanisme catalytique sont observées comme pour la MsrA bovine dans la partie C-terminale à des distances de la cystéine catalytique non compatibles avec le mécanisme proposé.

Pour tenter d'améliorer notre compréhension de ce mécanisme, nous avons étudié d'autres Msr de différentes classes. Les séquences des MsrB ne présentent que peu d'homologie avec les séquences de MsrA et aucune structure tridimensionnelle de cette classe d'enzyme

n'avait été résolue. Aussi, nous avons entrepris la résolution de la structure du module MsrB de la protéine PILB de *N. meningitidis* que nous avons complété par la résolution de la structure d'une forme oxydée de l'enzyme dans le but de confirmer et d'affiner nos connaissances du mécanisme catalytique. L'étude du module MsrA, appartenant à la sous-famille à deux cystéine **A** et **C**, a également été envisagée toujours dans l'optique de la compréhension de la mécanique moléculaire intervenant dans les différentes étapes de la réaction catalysée par ces enzymes.

Dans la sous-famille à trois cystéines **A**, **C** et **D**, nous avons résolu la première structure d'une MsrA de plante, issue de chloroplastes de peuplier et présentant des différences en séquences essentiellement dans la partie C-terminale, et notamment dans le nombre de résidus glycine (plus faible dans les séquences de plantes que dans les séquences issus de microorganismes). De plus l'espacement entre les cystéines **C** et **D** n'est que de cinq résidus contre sept dans la grande majorité des autres membres de la sous-famille. Ces différences laissaient supposer une organisation différente de la partie C-terminale permettant peut-être d'élucider l'étape de régénération de la cystéine catalytique.

Le chapitre de ce manuscrit concernant les Msr s'articule autour de deux parties. La première concerne l'étude structurale des domaines MsrB et MsrA de la protéine PILB de *N. meningitidis*. La seconde partie décrit, sous la forme d'un article en préparation, l'étude structurale de la MsrA chloroplastique de peuplier.

II. Etude structurale des domaines MsrB et MsrA de la protéine PILB de *N. meningitidis*.

II.1. Introduction : données biochimiques et enzymologiques sur les activités méthionine sulfoxyde réductases de PILB.

La protéine PILB est constituée de 522 résidus qui forment trois domaines (figure 9). La séquence des 194 résidus N-terminaux présente des similitudes avec des oxydoréductases du type DsbE (« disulfide bond reductase E»). La partie centrale (195-388) est orthologue aux MsrAs d'*E.coli* et *S.cerevisiae* alors que le domaine C-terminal (390-522) s'aligne sur les séquences primaires des MsrB d'*E.coli* et *S.aureus* (figure 10).

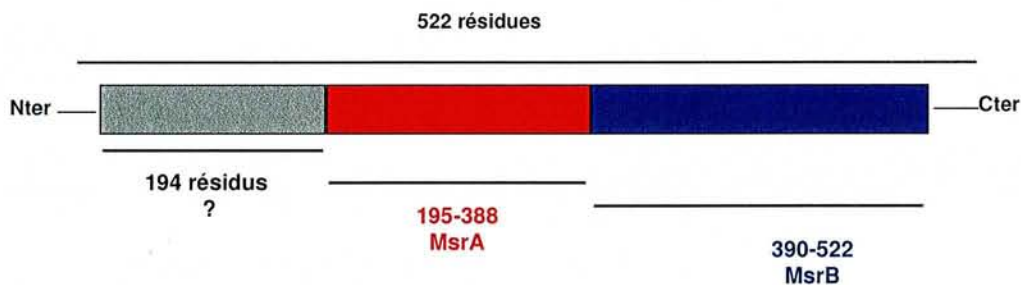


Figure 9 : Schéma de l'organisation de la protéine de fusion PILB de *N. meningitidis*

Les domaines MsrA, MsrB et leur fusion MsrA-MsrB ont été surexprimés et purifiés sous forme d'entités repliées par A. Olry sous la direction de S. Boschi-Muller dans le groupe du professeur G. Branlant. Les troncatures en position 194 et 389 génèrent un module MsrA (résidus 195-388) soluble, mais un module C-terminal insoluble (résidus 390-522), bien que s'alignant sur la séquence de la MsrB putative de *Klebsiella pneumoniae*. Une seconde construction génétique, basée sur l'alignement avec la partie N-terminale de la MsrB d'*E. coli* (Grimaud *et al.*, 2001) et correspondant aux résidus 376 à 522, leur a permis de produire un module MsrB replié soluble (Olry *et al.*, 2002).

Les travaux du groupe d'enzymologie moléculaire du MAEM ont permis de montrer que le domaine MsrB de PILB réduit l'isomère R de la méthionine sulfoxyde via un mécanisme catalytique à deux étapes identique à celui démontré pour les MsrA (Boschi-Muller *et al.*, 2000) impliquant la chimie des acides sulféniques. La première étape conduit à la réduction de la Met-R-SO en méthionine en formant un acide sulfénique sur la cystéine **A** (Cys494).

Chapitre A : Les peptide methionine sulfoxyde réductases

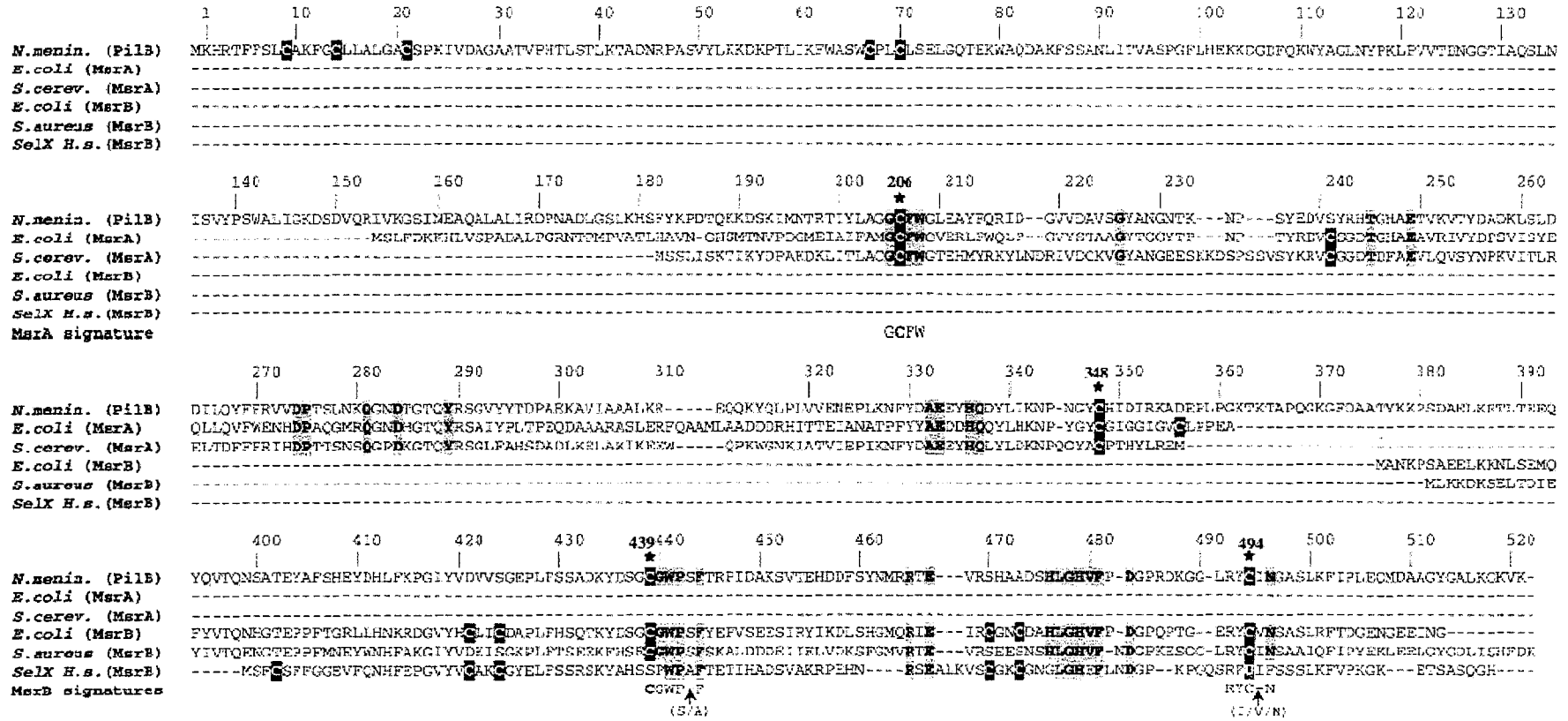


Figure 10 : Alignement des séquences de PILB de *N. meningitidis*, des MsrAs d'*E.coli* et *S. cerevisiae* et des MsrBs d'*E.coli*, *S. aureus* et d'origine humaine (SelX). Les cystéines sont représentées sur fond noir et les résidus conservés dans les séquences de PMSR putatives (>90% sur 35 séquences de MsrA et 65 séquences de MsrB) sur fond gris. Les étoiles noires indiquent les résidus cystéines impliqués dans le mécanisme catalytique.

La seconde étape consiste à régénérer la cystéine **A** par formation d'un pont disulfure avec la cystéine **B** (Cys439) qui sera réduit par la thiorédoxine.

La stéréospécificité envers les isomères *R* et *S* de la méthionine sulfoxyde des modules MsrB et MsrA de PILB a également été démontrée. Celle-ci permet *in vivo* la réduction totale des Met-*R,S*-SO en méthionine. Il est également démontré que la présence de la fonction sulfoxyde est un pré-requis à la fixation aux deux types de Msr et que l'efficacité catalytique du module MsrB est significativement inférieure à celle du module MsrA. Enfin, les résultats biochimiques suggèrent que la L-Met-SO au sein d'une protéine est un meilleur substrat que la L-Met-SO libre et ceci en particulier pour le module MsrB. Le tableau 3 présente les caractéristiques cinétiques des modules MsrA et MsrB de PILB (Olry *et al.*, 2002).

Enzymes	Substrats	k_{cat} s^{-1}	$K_{sulfoxyde}$ mM	$K_{cat}/K_{sulfoxyde}$ $M^{-1}.s$	K_{Trx} μM
PILB-MsrA	DL-Met- <i>R,S</i> -SO	3.7 ± 0.4	9 ± 4	410 ± 200	75 ± 15
	L-Met- <i>S</i> -SO	2.5 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1200 ± 150	ND
	D-Met- <i>S</i> -SO	2.5 ± 0.1	6.0 ± 0.2	400 ± 100	ND
	L-Met- <i>R</i> -SO	-	-	-	-
	D-Met- <i>R</i> -SO	-	-	-	-
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	3.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	5600 ± 200	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO	2.1 ± 0.2	8 ± 2	250 ± 40	ND
	L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1200 ± 200	ND
PILB-MsrB	DL-Met- <i>R,S</i> -SO	0.2 ± 0.1	56 ± 7	4 ± 2	34 ± 6
	L-Met- <i>S</i> -SO	-	-	-	-
	D-Met- <i>S</i> -SO	-	-	-	-
	L-Met- <i>R</i> -SO	0.36 ± 0.01	19 ± 2	19 ± 6	ND
	D-Met- <i>R</i> -SO	0.30 ± 0.03	122 ± 13	2 ± 1	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	0.46 ± 0.04	1.2 ± 0.4	380 ± 60	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO	0.28 ± 0.01	1.6 ± 0.2	175 ± 50	ND
	L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	0.17 ± 0.01	4.5 ± 0.5	40 ± 100	ND

Tableau 3 : Paramètres cinétiques des activités MsrA et MsrB de PILB (d'après Olry *et al.*, 2002). Les données expérimentales ont été ajustées au modèle de Michaelis-Menten.

Concentrations en enzymes : 0.5 μM MsrA ; 2-6 μM MsrB

ND = non déterminé

Les valeurs en gras doivent être divisées par 2 pour le $K_{sulfoxyde}$ et multipliées par 2 pour le $K_{cat}/K_{sulfoxyde}$ en considérant que l'un des stéréoisomères est substrat et que l'autre n'est pas inhibiteur.

La cystéine catalytique **A** se situe dans une signature RYC(I/V/M)N laissant supposer que le site catalytique du module MsrB est différent de celui observé dans la MsrA d'*E. coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000). La détermination de la structure du module MsrB de PILB pouvait donc permettre de caractériser non seulement les déterminants structuraux du mécanisme catalytique mais également ceux de la stéréospécificité de substrat.

II.2. Cristallisation, collecte des données de diffraction des rayons X et affinement des structures.

I.2.1. Le domaine MsrB de PILB sous forme réduite

Dans l'optique de résoudre le problème cristallographique de la phase en utilisant le signal anomal d'atomes de sélénium, l'équipe du professeur G. Branlant nous a préparé en plus de la protéine native, un lot de protéine sélénée sur les résidus méthionine. La séquence du module MsrB de PILB présente deux méthionines sur un total de 146 résidus. Des cristaux identiques des formes native (photo1) et sélénée ont été obtenus dans les mêmes conditions de cristallisation, décrites dans le tableau 4.

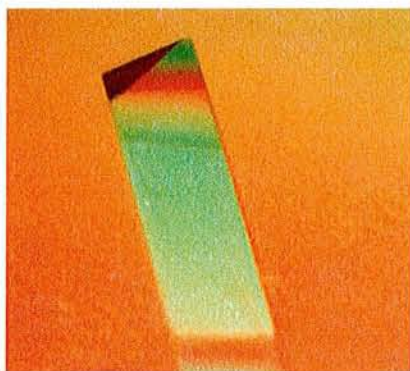


Photo 1 : Cristaux orthorhombiques du module MsrB de PILB (630 x 250 x 250 μm^3)

Méthode de cristallisation	Diffusion de vapeur en goutte suspendue
Température	20°C
Solution protéique	75 mg/ml
Solution de cristallisation	Tampon Tris HCl 0.1M pH 8
Composition des gouttes	0,5 M KH_2PO_4
Solution de cryoprotection	2 μl de solution protéique + 2 μl de puits
Paramètres de mailles	2 0% MPD (V/V)
Groupe d'espace	a=44.0 Å, b=118.6 Å, c=138.5 Å
Unité asymétrique	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Coefficient de Matthews V _m	4 molécules
Pourcentage de solvant	2.76 Å ³ /Da
Limite de diffraction	51 %
	1.80 Å

Tableau 4 : Conditions de cristallisation et propriétés des cristaux du module MsrB de PILB (Kauffmann *et al.*, 2002)

Les données de type MAD (**M**ultiwavelength **A**nomalous **D**iffraction) ont été collectées sur la ligne de lumière FIP (BM30A) de l'ESRF. Aucun jeu de données n'a été collecté sur la forme native de la protéine. Les données ont été mesurées à 100 K et trois longueurs d'onde ont été choisies selon le spectre de fluorescence calculé par le programme *CHOOCH* (Evans & Pettifer, 2001) (figure 11).

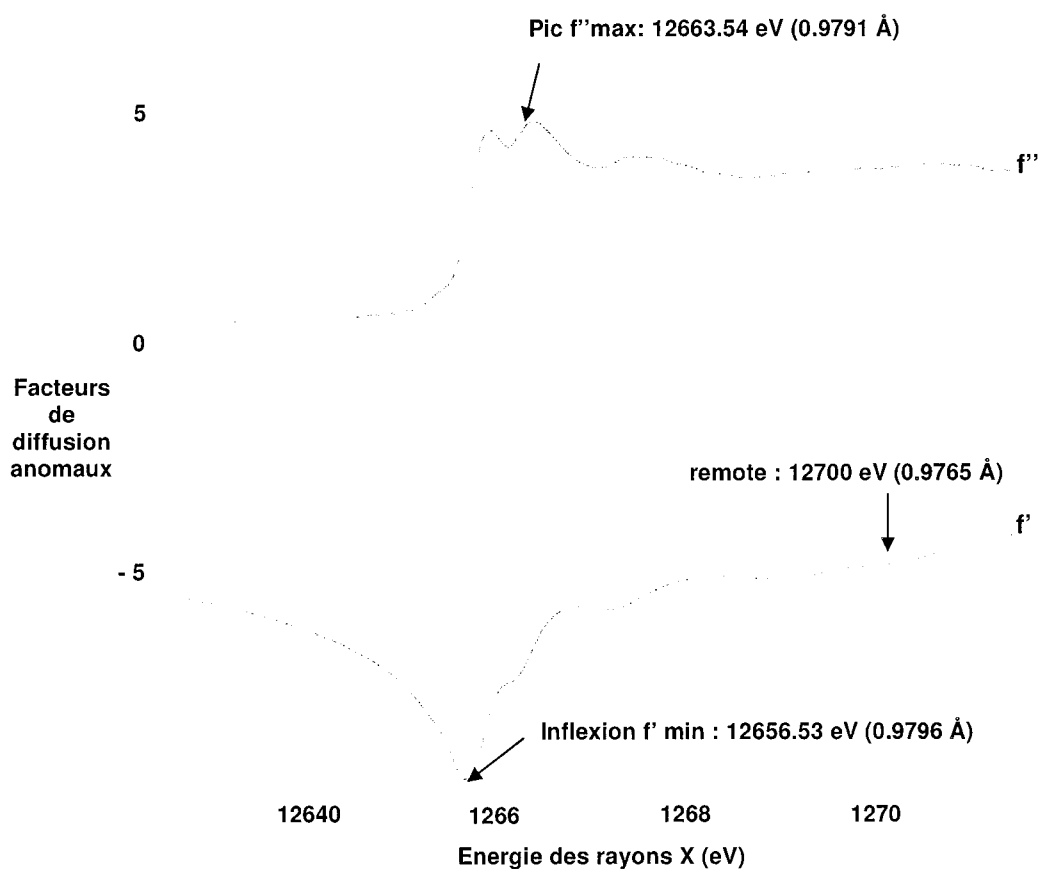


Figure 11: Variations de f' et f'' autour du seuil K d'absorption du sélénium pour les cristaux de la forme sélénée du domaine MsrB de PILB

Les intensités diffractées ont été indexées et intégrées avec le logiciel *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) puis mises à l'échelle avec le programme *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997). Le détail des statistiques sur les différentes données mesurées est présenté dans le tableau 5.

<u>Données</u>	[SeMet]-MsrB (ESRF, BM30A)		
Longueur d'onde (Å)	0.9796 (inflexion) 12656.83 eV	0.9791 (pic) 12663.54 eV	0.9765 ("remote") 12700 eV
Résolution (Å)	30-1.82 (1.86-1.82)	30-1.82 (1.86-1.82)	30-1.82 (1.86-1.82)
Nombre de réflexions	121316	116823	121337
Complétude	97.2 (91.8)	93.6 (84.1)	97.1 (90.2)
R _{sym} (%)	4.5 (21.2)	5.8 (22.2)	4.2 (18.9)
$\langle I \rangle / \langle \sigma_I \rangle$	12.7 (3.1)	16.1 (2.5)	13.1 (2.9)
<u>Pouvoir de Phasage</u>			
<u>(acentriques)</u>			
Iso	2.96	2.49	
Ano	1.36	1.50	1.11
R _{cullis}	0.46	0.57	

Tableau 5 : Statistiques des données MAD mesurées sur les cristaux du module MsrB de PILB sélénié. Les données entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

La résolution de la substructure constituée par les atomes de sélénium à été réalisée à l'aide du programme *Shake-and-Bake (SnB)* Version 2.1 (Weeks *et al.*, 1999) sur les données mesurées au pic d'absorption. 500 réflexions ont été sélectionnées par *SnB* dans l'intervalle de résolution 25-1.82 Å, 5000 invariants et 1000 essais de 20 cycles chacun ont permis de trouver 61 fois une solution pour la recherche d'un maximum de huit positions pour les atomes de sélénium. La meilleure figure de mérite calculée par *SnB* est de 19.6 % (figure 12).

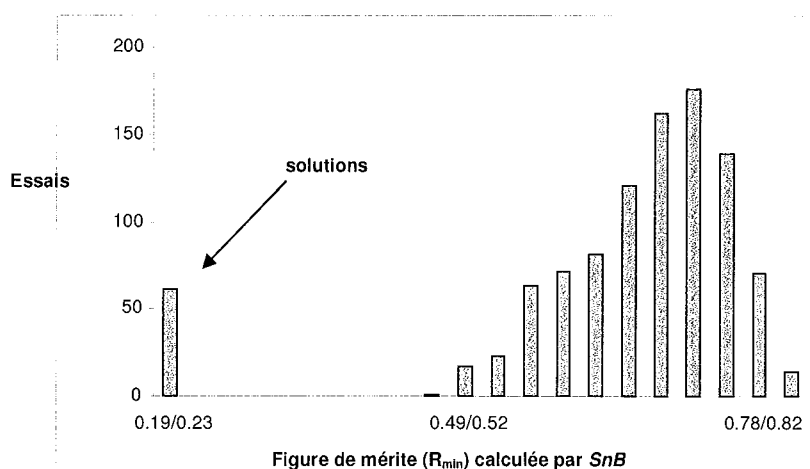


Figure 12 : Diagramme des solutions calculées par *SnB* sur les données collectées au pic d'absorption du sélénium

Les phases du premier modèle de la MsrB ont été obtenues à 2Å de résolution avec le logiciel *SHARP* (Bricogne *et al.*, 2000) et étendues à 1.82 Å par la procédure de nivellement de solvant du programme *SOLOMON* (Abrahams & Leslie, 1996). Compte tenu de la résolution et de la bonne qualité des phases, la procédure de reconstruction automatique implémentée dans le logiciel *ARP/wARP* version 5.1 (Perrakis *et al.*, 1999) a permis de reconstruire 465 des 588 résidus de l'unité asymétrique (figure 13).

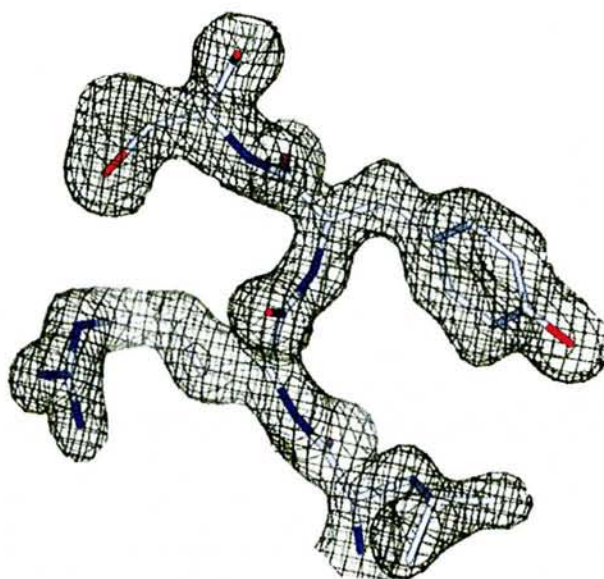


Figure 13 : Carte de densité électronique $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contour 2σ) calculée par *ARP/wARP* après docking de la séquence de la MsrB

La structure du module MsrB a été affinée avec le logiciel *CNS* version 1.2 (Brünger *et al.*, 1998) en incluant les huit atomes de sélénium par unité asymétrique (deux par molécule). 627 molécules d'eau et deux ions phosphate ont été modélisés dans la densité électronique. Les écart-types moyens (r.m.s.d) sont de 0.01 Å sur la longueur des liaisons et de 1.01° sur les angles dièdres. Les facteurs d'accord cristallographique finaux sont de 21.1 % et 22.4 % respectivement pour les R_{crys} et R_{free} à 1.82 Å de résolution.

II.2.2. Le domaine MsrB de PILB sous forme oxydée

L'enzyme, préparée dans le groupe du professeur G. Branlant, est directement oxydée par un excès de MetSO, éliminé par la suite par chromatographie d'exclusion de taille.

Le domaine MsrB sous forme oxydée a été cristallisé en utilisant une méthode en micro-batch dans une huile faiblement visqueuse. Cette technique dérive de la procédure utilisée par certains robots de cristallisation et utilise des microplaques de 72 puits. La solution de cristallisation issue des matrices de cristallogénèse de la société Jena Bioscience (JBS screen 3, condition B4) est composée de PEG 4000 à 20% et de sulfate d'ammonium à 0.2 M. Des cristaux de forme hexagonale (groupe d'espace P622) germent en trois jours et atteignent une taille maximale d'environ 0.2x0.1x0.2 mm³ en une semaine (photo 2). Le tableau 6 regroupe les caractéristiques cristallographiques et les conditions expérimentales d'obtention des cristaux de la forme oxydée de la MsrB.

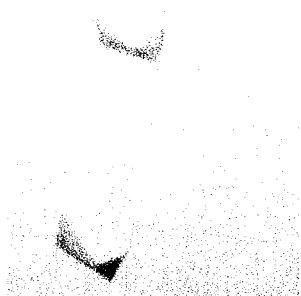


Photo 2 : Cristaux hexagonaux du module MsrB oxydé de PILB (200 x 100 x 200 m³)

Préparation protéique	2 l d'une solution concentrée à 15 mg/ml (tampon Tris HCl pH 8)
Solution de cristallisation	2 l d'une solution composée de 20% PEG4000 et 0.2M sulfate d'ammonium
Température	20°C
Solution de cryoprotection	Huile
Paramètres de maille	a=111.71 Å, b=111.71 Å, c=54.55 Å
Groupe d'espace	P622
Unité asymétrique	1 molécule
Coefficient de Matthews V _m	2.89 Å ³ /Da
Pourcentage de solvant	58 %
Limite de diffraction	3.0 Å

Tableau 6 : Conditions de cristallisation et propriétés des cristaux du module MsrB oxydé de PILB

Les données de diffraction des rayons X ont été collectées sur la ligne de lumière BM14 de l'ESRF à Grenoble. Un jeu de données de qualité moyenne a pu être mesuré sur un cristal

malgré le faible pouvoir diffractant que semble présenter cette forme cristalline. En effet, la diffraction de nombreux cristaux a été testée sans succès, sur la ligne de lumière avant de réussir à mesurer des données de qualité raisonnable à 3.0 Å. Notons enfin que dans les conditions de cette expérience, ni l'ajout de glycérol, de methyl-pentane-diol (MPD) ou d'une concentration supérieure en PEG4000 n'a permis de définir une condition de cryoprotection efficace pour la collecte à 100K. Le cristal collecté a directement été prélevé dans sa goutte initiale immergée dans l'huile, dans une boucle en nylon de taille légèrement inférieure à la taille de celui-ci afin de prélever un minimum de solution de cristallisation et un maximum d'huile, cryoprotectrice.

Les intensités diffractées ont été indexées, intégrées puis mises à l'échelle par le logiciel XDS (Kabsch, 2001). Les statistiques sont présentées dans le tableau 7.

La structure a été résolue par remplacement moléculaire à l'aide du modèle de la forme réduite avec le logiciel MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) et affiné avec le logiciel CNS version 1.2 (Brünger *et al.*, 1997). Les statistiques d'affinement sont également reportées dans le tableau 7.

Intervalle de résolution	30-3.0 Å
Longueur d'onde	0.88560 Å
Nombre de réflexions	4245
R _{sym}	11.3 % (27.0 %)
I/ I	11.3 (4.2)
Complétude	99.5 % (99.2 %)

R _{crys}	25.5 %
R _{free}	29.2 %
r.m.s.d liaisons	0.008
r.m.s.d angles	1.1 °
Molécules d'eau	10
Pont disulfure	1 (Cys63-Cys117)

Tableau 7 : Principales statistiques sur le jeu de données collecté à 3.0 Å de résolution sur la forme oxydée du module MsrB de PILB. La deuxième partie du tableau regroupe les statistiques d'affinement de la structure.

Les valeurs entre parenthèses indiquent les statistiques dans la dernière couronne de résolution.

Une molécule de méthionine sulfoxyde a également été modélisée dans le site actif de l'enzyme pour tenir compte de la densité électronique, les conséquences de cette observation seront discutées plus loin dans le manuscrit.

L'empilement cristallin dans la maille hexagonale P622 est représenté sur la figure 14. Les molécules sont assemblées circulairement autour de l'axe c délimitant un canal de solvant d'environ 50 Å de diamètre.

Le pourcentage de solvant relativement élevé dans cette forme cristalline, estimé à environ 60 %, peut expliquer en partie le faible pouvoir diffractant de ces cristaux.

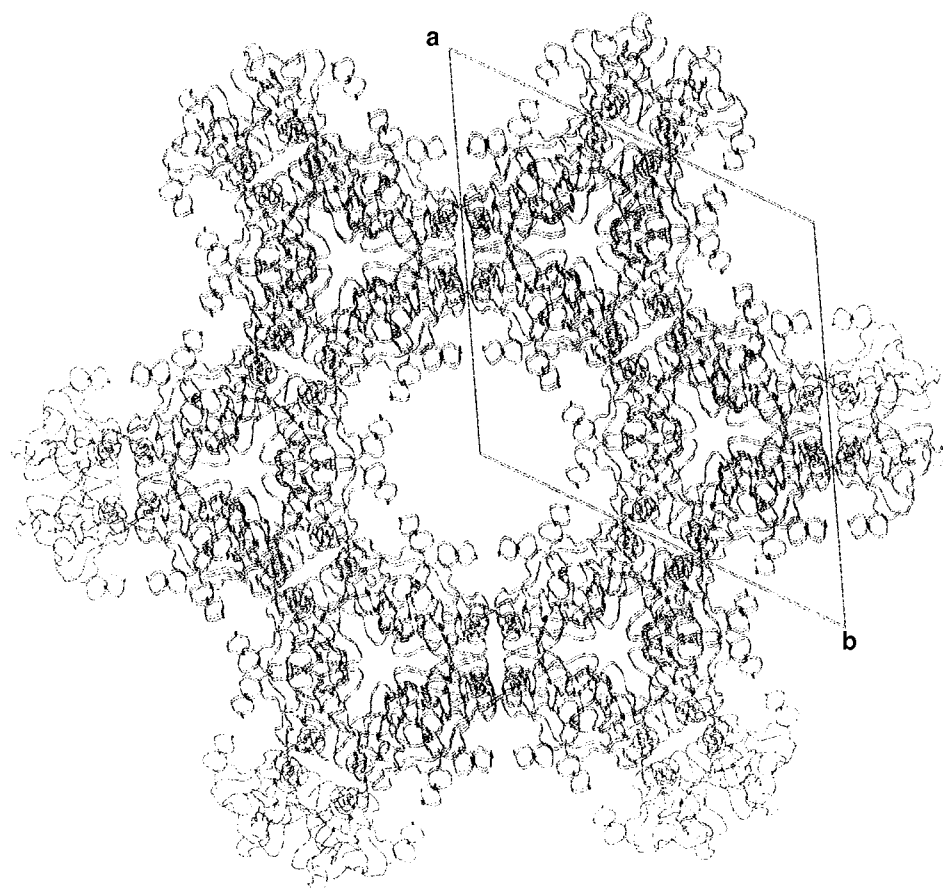


Figure 14 : Représentation selon l'axe c de l'empilement cristallin des molécules de MsrB oxydée dans la maille hexagonale P622.

II.2.3. Le domaine MsrA de PILB sous forme oxydée

Le domaine MsrA de PILB sous forme oxydée a été préparé dans le groupe du professeur G. Branlant dans les mêmes conditions que le module MsrB. La même méthode de cristallisation en micro-batch immergé dans l'huile a permis d'obtenir en quelques jours, des cristaux de forme orthorhombique de taille suffisante pour une expérience par diffraction des rayons X (photo 3). La condition optimale d'obtention des cristaux dérive d'une solution

de la matrice d'échantillonnage JBS « screen 3 » (condition D4) de la société Jena Bioscience. Les conditions expérimentales exactes sont résumées dans le tableau 8.

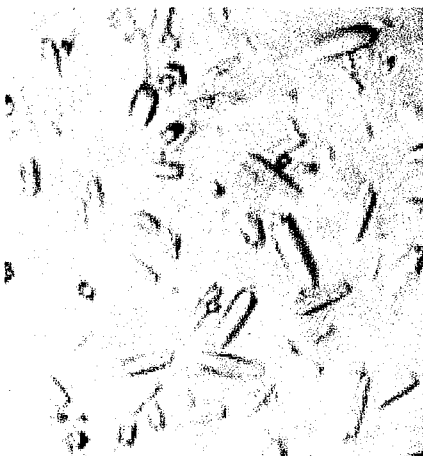


Photo 3 : Cristaux orthorhombiques du module MsrA oxydé de PILB (100 x 100 x 500 μm^3 pour le cristal collecté)

Préparation protéique	2 l d'une solution concentrée à 10 mg/ml (tampon Tris HCl pH 8)
Solution de cristallisation	2 l d'une solution composée de 30% PEG4000 et 0.2M sulfate d'ammonium dans un tampon acétate de sodium 0.1 M pH 4.
Température	20 °C
Solution de cryoprotection	huile
Paramètres de mailles	$a=43.69 \text{ \AA}$, $b=47.85 \text{ \AA}$, $c=66.36 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unité asymétrique	1 molécule
Coefficient de Matthews Vm	1.82 $\text{\AA}^3/\text{Da}$
Pourcentage de solvant	28 %
Limite de diffraction	1.85 \AA

Tableau 8 : Conditions de cristallisation et propriétés des cristaux du module MsrA oxydé de PILB

Un jeu de données a été collecté à 2 \AA de résolution sur la ligne de lumière BM14 de l'ESRF et traité à l'aide des logiciels *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) pour l'indexation et l'intégration des intensités diffractées puis *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997) pour la mise à l'échelle (tableau 9).

Comme pour le module MsrB oxydé, le cristal collecté a directement été prélevé dans sa goutte initiale et aucun agent cryoprotectant, autre que l'huile prélevée dans la boucle avec le cristal, n'a été nécessaire pour la collecte des données à 100 K.

Intervalle de résolution	30-2.0 Å
Longueur d'onde	0.88560 Å
Nombre de réflexions	9557
R _{sym}	8.6 (32.7 %)
I/ I	16.7 (11.2)
Complétude	99.1 % (91.9 %)

R _{crys}	21.5 %
R _{free}	26.2 %
r.m.s.d liaisons	0.005 Å
r.m.s.d angles	1.1°
Molécules d'eau	74
Pont disulfure	1 (Cys51-Cys198)
	Numérotation MsrA <i>E.coli</i>

Tableau 9 : Principales statistiques sur le jeu de données collecté à 2.0 Å de résolution sur la forme oxydée du module MsrA de PILB. La deuxième partie du tableau regroupe les statistiques d'affinement de la structure. Les valeurs entre parenthèses indiquent les statistiques dans la dernière couronne de résolution.

La structure a été résolue par remplacement moléculaire à partir du modèle de la MsrA d'*E.coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000) et affinée en utilisant le logiciel CNS version 1.2 (Brünger *et al.*, 1997) . Trente résidus faisant suite dans la séquence à la cystéine de régénération C (Cys198 chez *E.coli*) n'ont pu être modélisés correctement dans les cartes de densité électronique du fait de leur trop grande agitation thermique et ont été affinés en alanine. Ceci peut expliquer en partie les valeurs assez élevées des facteurs d'accord cristallographique R_{crys} et R_{free} (Tableau 9).

II.3. Etude structurale de la forme réduite du domaine MsrB de PILB

De part l'importance physiologique de la réaction catalysée par les Msr et le caractère pathogène des micro-organismes du genre *Neisseria*, une forte compétition internationale sur les recherches dans ce domaine s'est établie. Concomitamment à nos travaux, une équipe américaine a résolu la structure du domaine MsrB de PILB de *Neisseria gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae*) (Lowther *et al.*, 2002) qui présente 95 % d'identité de séquence avec le module MsrB de *N. meningitidis* (figure 15). Leur approche d'étude de ce domaine ainsi que les outils cristallographiques utilisés ont été très similaires aux nôtres. La première partie de ce chapitre, consacré à l'étude structurale des Msr, compare les observations faites dans les conditions expérimentales des deux équipes sur les formes réduites de ce domaine, et complète l'étude par l'analyse de la structure de la forme oxydée du module MsrB obtenue pour *N. meningitidis*.

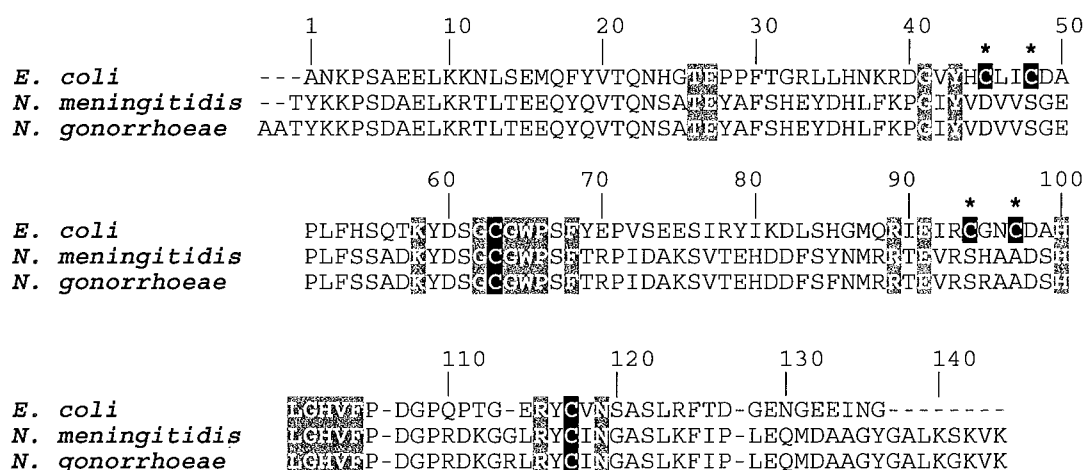
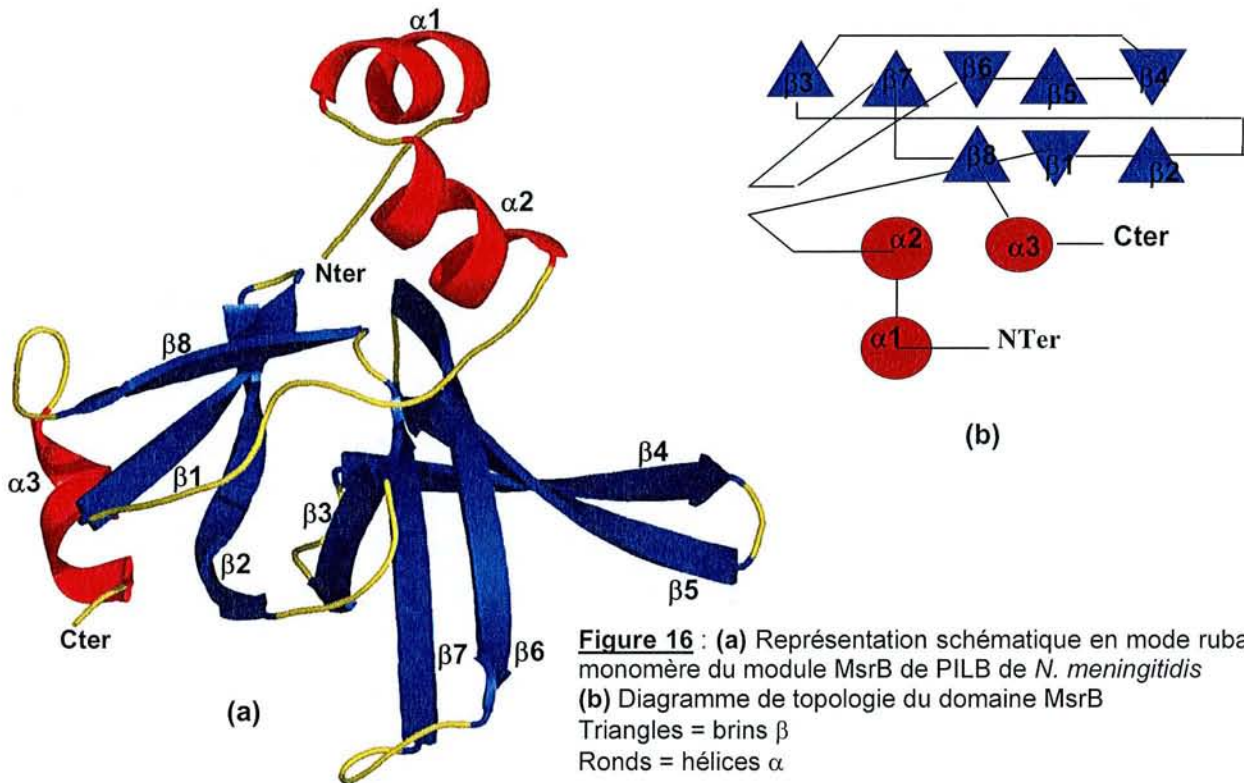


Figure 15 : Alignement des structures primaires des MsrB d'*E.coli*, *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Les cystéines sont représentées sur un fond noir, les étoiles indiquent les cystéines impliquées dans le site de fixation du cation métallique.

II.3.1. Description générale de la structure

La structure du domaine MsrB de PILB est organisée autour de deux feuillets β antiparallèles. Le premier feuillet est constitué de trois brins β : β_1 , β_2 et β_8 et le second de cinq brins β : β_3 à β_7 . Trois hélices α , situées aux extrémités N- (α_1 et α_2) et C-terminales (α_3), complètent la topologie du domaine (figure 16).



La déviation standard sur la position des atomes de carbone α (r.m.s.d) entre les structures des modules MsrB des deux espèces du genre *Neisseria* est de 0.96 Å. Seules les boucles connectant les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ ne se superposent pas (figure 17). La conformation de cette boucle très exposée au solvant est très contrainte par l'empilement cristallin dans notre modèle. En effet, la boucle de chacune des quatre molécules de l'unité asymétrique partage des liaisons hydrogène avec des résidus du site actif d'une molécule voisine. Cette particularité et ses conséquences seront développées plus loin.

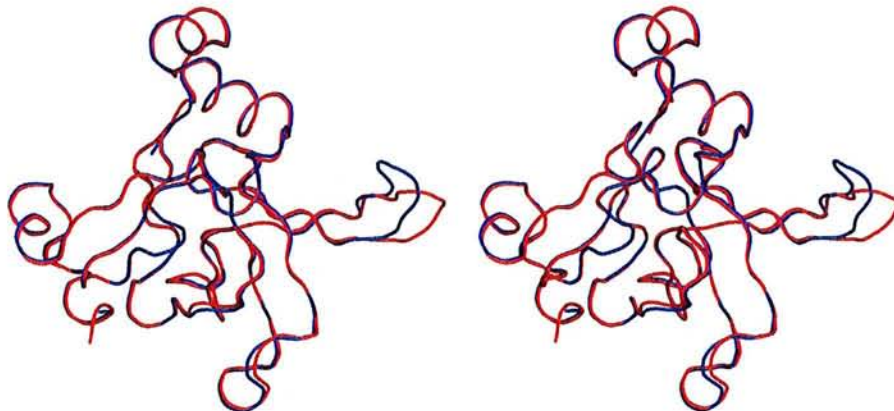


Figure 17 : Superposition des traces $C\alpha$ des domaines MsrB de *N. meningitidis* (rouge) et *N. gonorrhoeae* (bleu)

La résolution de la première structure au sein d'une famille de protéines soulève la question de l'originalité du repliement. La soumission des coordonnées atomiques du modèle à la banque de données DALI (Holm & Sander, 1995) mais également au serveur CE (Combinatorial Extension ; Godzik, 1995) a permis d'identifier deux homologues structuraux :

- la protéine Mss4 humaine (guanine-nucleotide-exchange factor) (code PDB : 1HXR). Cette protéine permet l'échange GDP/GTP au sein des GTPases de type Ras et régule positivement les fonctions de ces dernières (Yu & Schreiber, 1995). Les séquences de Mss4 et MsrB présentent 6 % d'identité de séquences et un écart-type (r.m.s.d) sur la position des carbones α de 2.5 Å.

- la protéine TCTP ("translationally controlled tumor-associated proteins") de *Schizosaccharomyces pombe* (code PDB : 1H6Q ; structure RMN) dont les fonctions dans la cellule ne sont pas encore élucidées (Thaw *et al.*, 2001). L'écart-type (r.m.s.d) sur la position des atomes de carbone α est de 3 Å pour une structure primaire qui partage 13 % d'identité de séquence avec le domaine MsrB de PILB.

Ces deux protéines sont répertoriées dans une grande famille sous le nom de « guanine nucleotide-free chaperones (GFC) », essentielle au transport vésiculaire et impliquée dans de nombreuses tumeurs chez l'homme (Novick & Brennwald, 1993). Un point commun structural entre ces protéines est la présence d'un site de fixation du zinc (Zn^{2+}) généré par deux motifs Cys-X-X-Cys pour la stabilisation de la structure. Un tel motif n'est retrouvé que dans les structures primaires de quelques MsrB dont *E.coli* ou la drosophile (Kumar *et al.*, 2002) (figure 18). Aucun résidu essentiel à l'activité méthionine sulfoxyde réductase n'est retrouvé dans les structures de Mss4 et TCTP et aucune fonction de protéine chaperonne n'a été démontrée pour les MsrB.

Au double motif Cys-X-X-Cys de Mss4 se substituent les séquences Asp-X-X-Ser et Ser-X-X-Ala dans la séquence des MsrB des deux espèces du genre *Neisseria* (figure 15). Le rôle du cation dans la structure des MsrB n'est pas encore totalement élucidé, cependant sa position diamétralement opposée au site actif suggère un rôle davantage structural que catalytique. La mutation d'une des quatre cystéines complexant l'atome de Zn^{2+} dans la MsrB de drosophile suffit à annihiler totalement l'activité catalytique de l'enzyme (Kumar *et al.*, 2002), les auteurs attribuent à l'atome de Zn^{2+} un rôle de stabilisation de la structure. Les études préliminaires par mutagenèse dirigée menées dans le groupe du professeur G. Branlant montrent que la mutation des quatre cystéines complexant l'atome de Zn^{2+} de la MsrB d'*E.coli* est inactif. Le quadruple mutant MsrB de *N. meningitidis* dans lequel quatre cystéines complexant un cation métallique ont été introduites serait quant à lui faiblement actif. Une hyperstabilisation de la structure, apportée par le centre métallique, expliquerait cette faible activité catalytique mesurée. La résolution d'une structure complexée à un cation métallique devrait permettre de contribuer à élucider le rôle de celui-ci. Des études

préliminaires de cristallisation de la MsrB d'*E. coli* menées au laboratoire n'ont pas encore permis d'obtenir des cristaux de taille suffisante pour une expérience par diffraction des rayons X.

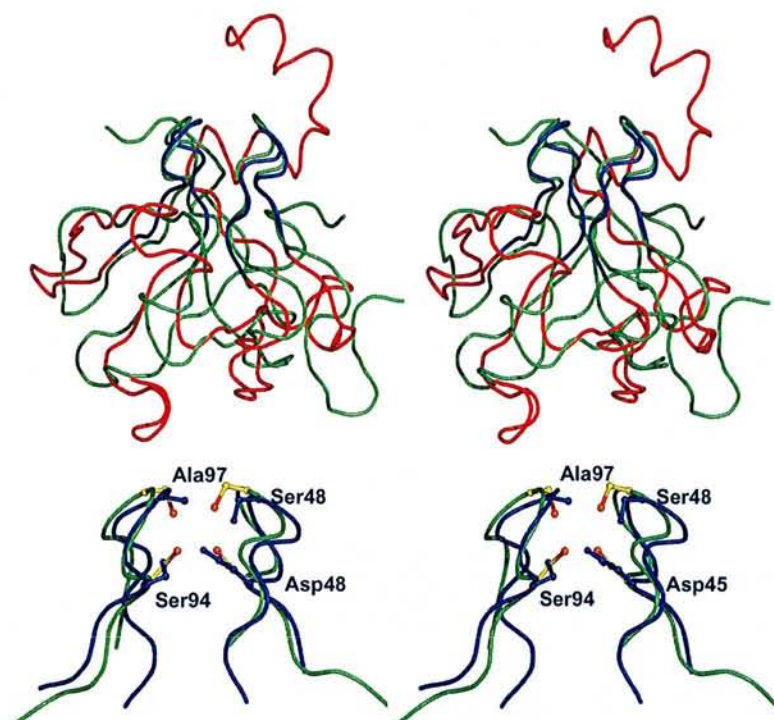


Figure 18 : (a) Vue stéréoscopique de la superposition des traces α du domaine PILB-MsrB (rouge) et de Mss4 (vert). La région du site métallique de la MsrB est colorée en bleu. (b) Vue stéréoscopique d'un détail de cette superposition dans la région du site de fixation du cation métallique de la Mss4 ; le code couleur est le même qu'en (a).

II.3.2. Description du site actif du domaine MsrB de PILB

Par souci d'homogénéité et pour faciliter la compréhension dans la suite de ce chapitre, la numérotation des résidus correspond à celle de la MsrB d'*E. coli* de la figure 15. La cystéine catalytique (**A**) Cys117 se trouve à l'extrémité C-terminale du brin β_7 , et la cystéine de régénération (**B**) Cys63 dans la boucle qui connecte les brins β_2 et β_3 (figure 19). Cys117 est moins accessible au solvant que Cys63 et semble moins mobile du fait de sa localisation dans un brin au sein d'un feuillet. Les distances mesurées entre les atomes de soufre S_γ des deux cystéines de chacune des quatre molécules de l'unité asymétrique sont répertoriées dans le tableau 10. La distance moyenne est de 4.33 Å. Une simple rotation autour de la liaison $C_\alpha-C_\beta$ ne permet pas de positionner l'atome de soufre S_γ de Cys63 à une distance favorable pour l'attaque nucléophile lors de l'étape de régénération de

la cystéine catalytique. La flexibilité apparente de la boucle incluant Cys63 doit permettre ce rapprochement nécessaire à la deuxième étape de la réaction.

Monomères	Distances Cys117-S γ - - -S γ -Cys63
A	4.26 Å
B	4.34 Å
C	4.34 Å
D	4.39 Å

Tableau 10 : Distances séparant les atomes S γ des cystéines catalytiques dans les quatre molécules de l'unité asymétrique

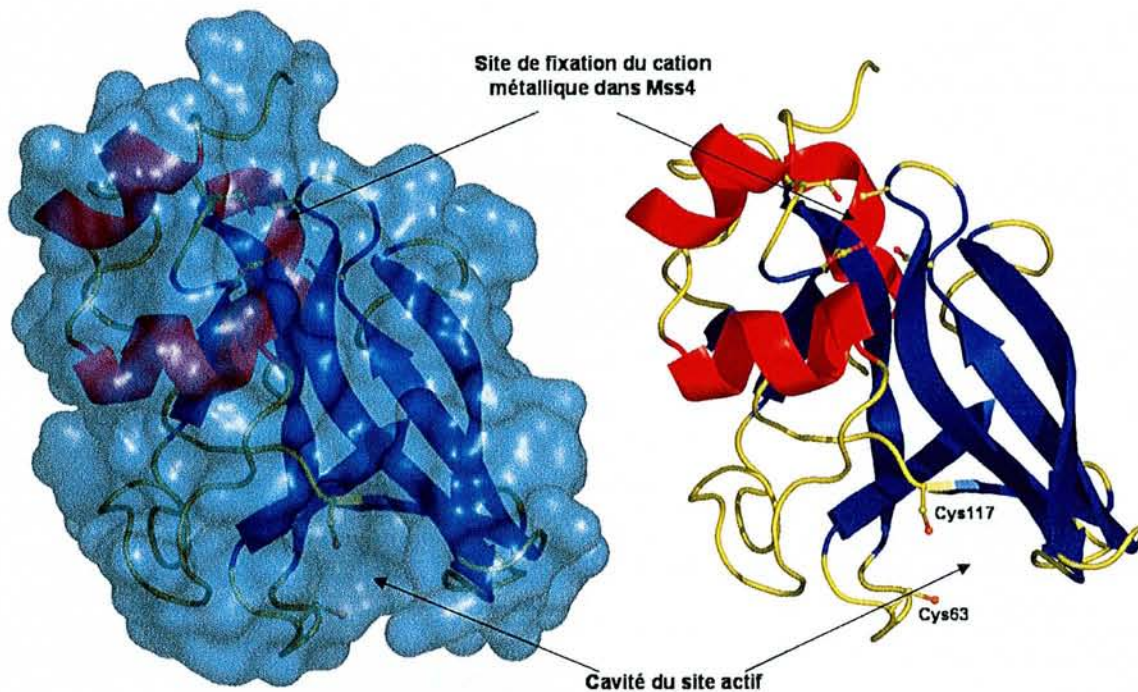


Figure 19 : Représentation du module MsrB en ruban montrant la localisation des cystéines catalytiques. La surface moléculaire a été superposée au modèle afin d'illustrer l'accessibilité de la cystéine catalytique Cys117.

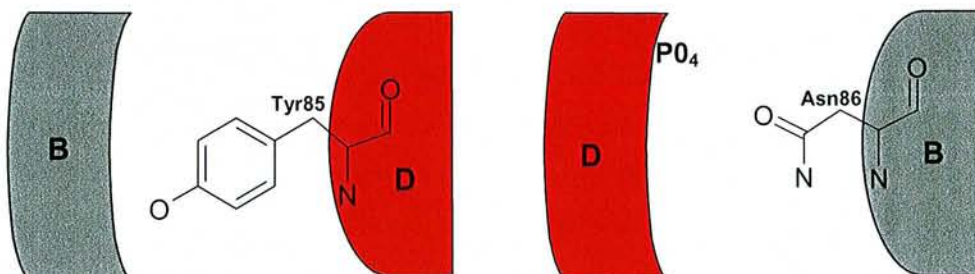


Figure 20 : Schéma illustrant les deux types d'organisation observés entre les monomères B et D au sein du cristal. Les mêmes interactions sont observées entre les monomères A et C, sachant que le monomère A est identique au monomère D et le monomère C est identique au monomère B.

Les trois régions correspondant aux séquences conservées dans les MsrB, Ser61 à Ser67, His100 à His103 et Arg115 à Asn119, délimitent une poche qui constitue le site actif. Chacun des quatre sites actifs de l'unité asymétrique est occupé par la boucle connectant les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ d'une molécule voisine. Cependant, les interactions au sein du site actif sont différentes selon les monomères et deux cas de figures sont observés (figure 20).

- Interaction entre le site actif du monomère B et la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ du monomère D :

Le résidu Tyr85_D du monomère D est ancré dans le site actif de la molécule B. Il partage des liaisons hydrogène avec le résidu His103_B et une molécule d'eau. Son cycle aromatique est perpendiculaire aux cycles de Trp65_B (figure 21). His103_B est stabilisée au sein du site actif par une liaison hydrogène entre son atome d'azote N ϵ_2 et l'atome d'oxygène O δ_2 de Asp82_B. La molécule d'eau qui stabilise la fonction hydroxyle de Tyr85_D est fortement fixée au site actif par deux autres interactions impliquant l'atome d'azote N δ_2 de Asn119_B et l'atome d'azote N ϵ_2 de His100_B.

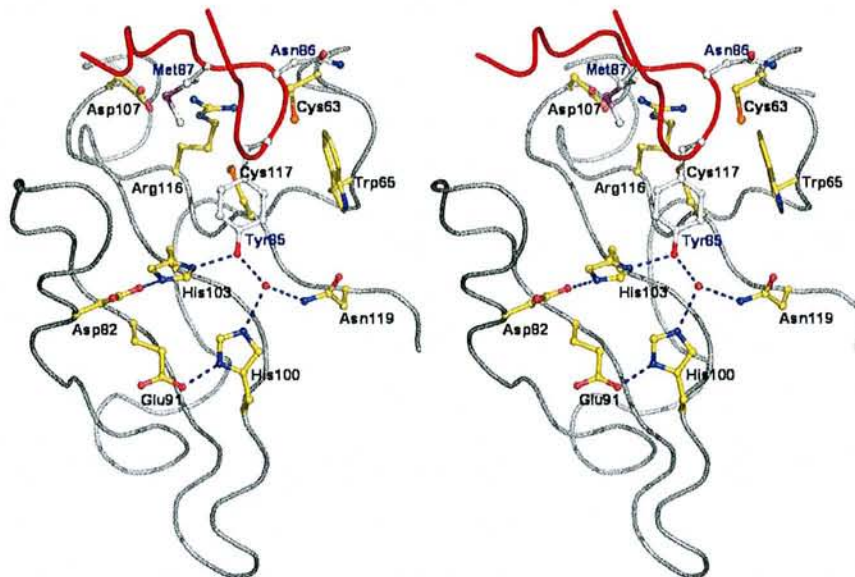


Figure 21 : Vue stéréoscopique représentant l'occupation du site actif du monomère B par la boucle connectant les brins $\beta 5$ à $\beta 6$ du monomère D de PILB-MsrB de *N. meningitidis*. Le code couleur correspond à la figure 20.

- Interaction entre le site actif du monomère D et la boucle β 4- β 5 du monomère B :

Le résidu Asn86_B du monomère B est ancré dans le site actif de la molécule D en lieu et place de la tyrosine Tyr85_B et l'atome d'oxygène O δ_2 de sa chaîne latérale forme les mêmes liaisons hydrogène que l'hydroxyle de la tyrosine (figure 22). Le réseau de liaisons hydrogène au sein du site actif du monomère D est légèrement différent de celui observé pour le monomère B. En effet, un ion phosphate issu du milieu de cristallisation s'est intercalé entre les résidus His103_D et Asp82_D. Cependant, ceci n'a pour unique conséquence que le déplacement de la chaîne latérale de Asp82_D qui stabilise alors un des atomes d'oxygène de l'ion phosphate. Le reste des interactions est similaire à ce qui est observé dans le site actif du monomère B.

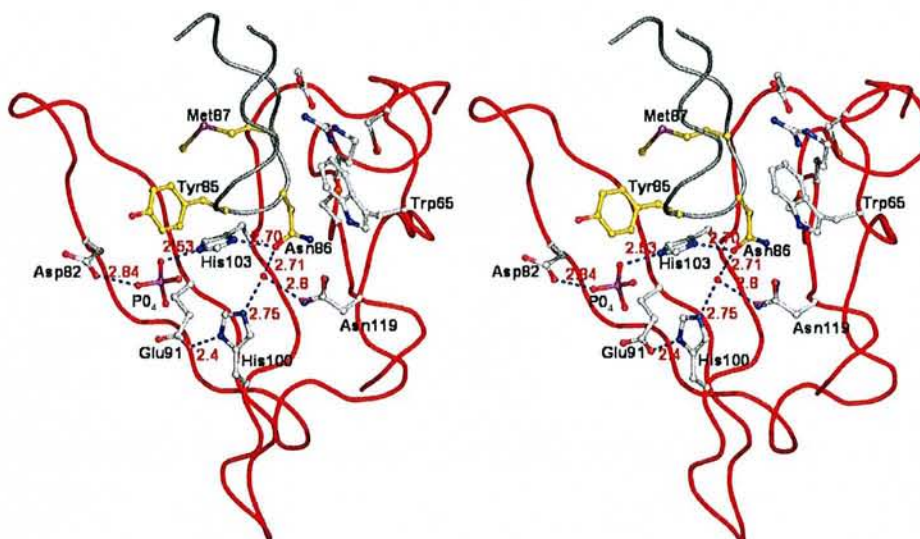


Figure 22 : Vue stéréoscopique représentant l'occupation du site actif du monomère D par la boucle connectant les brins β 5 à β 6 du monomère B de PILB-MsrB de *N. meningitidis*. Le code couleur correspond à la figure 20

Le tableau 11 présente les variations des angles de torsion de la chaîne principale des résidus constituant la boucle β 4- β 5 dans les monomères B et D. Aucun des angles de torsions répertoriés ne placent ces résidus dans une zone non autorisée du diagramme de Ramachandran, mais deux conformations de coudes β réorientent la chaîne. Ser84 et Met87 qui bordent les deux résidus ancrés dans les sites actifs montrent les plus importantes variations de ces angles de torsions. La qualité du modèle dans chacun des monomères est illustrée dans la figure 23.

Résidus	Monomère B	Monomère D
Ser84	φ -56 ° ψ 152 °	φ -136 ° ψ 137 °
Tyr85	φ 62 ° ψ 28 °	φ -54 ° ψ 29 °
Asn86	φ 56 ° ψ 36 °	φ -67 ° ψ 16 °
Met87	φ 148 ° ψ 178 °	φ -97 ° ψ 137 °

Tableau 11 : Angles de torsions mesurés sur les résidus de la boucle β 4- β 5

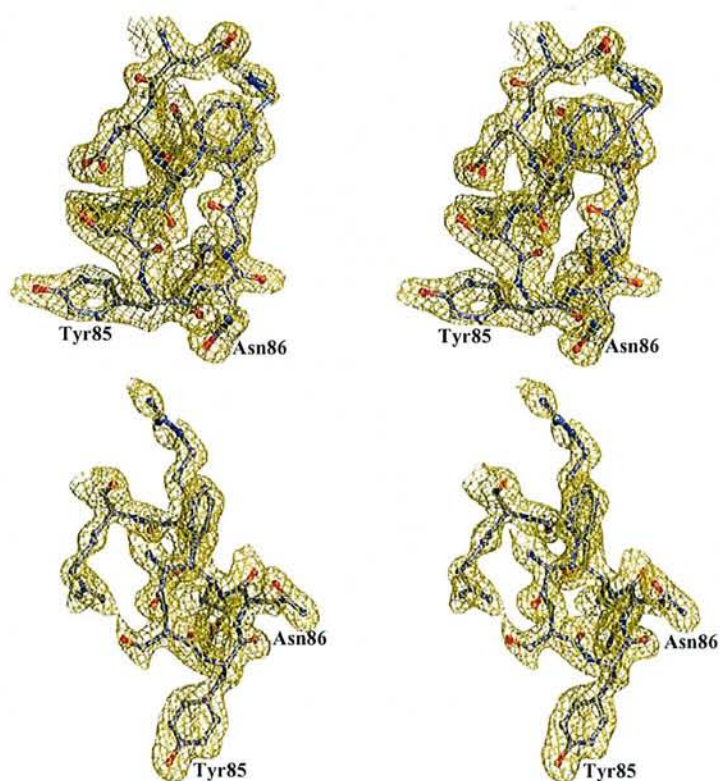


Figure 23 : Vues stéréoscopiques des boucles β 4- β 5 dans les monomères B (en haut) et D (en bas). La carte de densité électronique $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ (contour 1.2 σ) est superposée au modèle.

Les cristaux du domaine MsrB de *N. gonorrhoeae* sont également orthorhombiques primitifs mais de groupe d'espace $P2_12_12$ avec deux molécules par unité asymétrique.

Le site actif de la molécule A ne partage aucune interaction avec un symétrique mais est occupé par une molécule de cacodylate présent dans la solution de cristallisation (figure 24).

Le réseau de liaisons hydrogène au sein de ce site actif correspond exactement aux interactions décrites dans le site actif du monomère B de la MsrB de *N. meningitidis*. La molécule de cacodylate est orientée de manière à positionner ses groupements méthyles en regard du cycle aromatique de Trp65_A, mimant ainsi les interactions hydrophobes possibles pour stabiliser le groupement méthyle et la chaîne aliphatique d'une méthionine sulfoxyde (Lowther *et al.*, 2002). L'atome d'oxygène O₁ du cacodylate est stabilisé par His103_A. Sa position correspond à celle des atomes d'oxygène du groupement hydroxyle de Tyr85_D et Oδ₂ de Asn86_B dans les deux types d'interactions observées dans *N. meningitidis*. Ces trois atomes d'oxygène mimeraient la position de l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat.

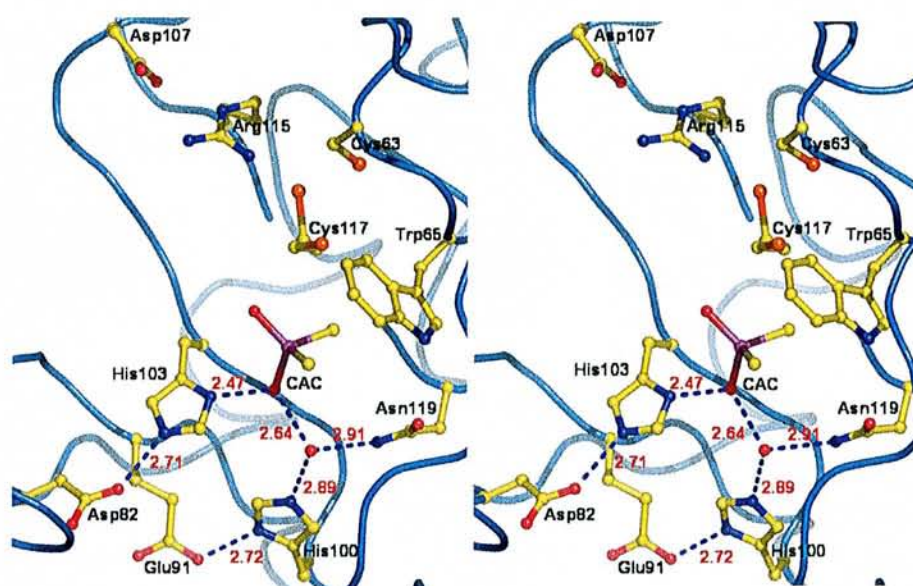


Figure 24 : Vue stéréoscopique du site actif du monomère A du module MsrB de PILB de *N. gonorrhoeae*

Le site actif de la molécule B de l'unité asymétrique des cristaux de *N. gonorrhoeae* est occupé par le résidu Asn86_A de la boucle β4-β5 de la molécule A. Cette boucle adopte une conformation assez similaire à celle observée dans le monomère B de la MsrB de *N. meningitidis* (figure 25).

Tyr85 est remplacée dans la structure primaire de la boucle β4-β5 de la MsrB de *N. gonorrhoeae* par une phénylalanine (Phe85). L'observation de Asn86 dans le site actif et non pas Phe85 est un argument supplémentaire montrant la propension du site actif à stabiliser une fonction carboxylique ou hydroxyle plutôt qu'un groupement à caractère uniquement hydrophobe.

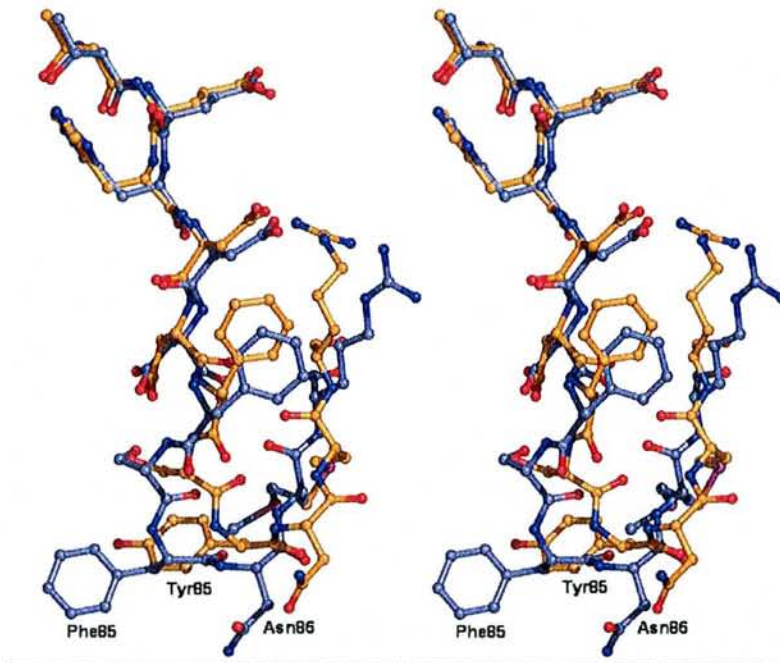


Figure 25 : Vue stéréoscopique de la superposition des boucles $\beta 4$ - $\beta 5$ observées dans le monomère A de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (bleue) et dans le monomère B de *N. meningitidis* (orange)

Ces structures des formes réduites du module MsrB de PILB des deux espèces de neisseria ont permis tout d'abord de décrire les premières structures cristallographiques d'une MsrB et d'émettre quelques hypothèses quant à l'implication des résidus du site actif dans le mécanisme catalytique. Ainsi, His103 stabiliserait successivement les formes S=O puis S-O⁻ de la méthionine sulfoxyde lors de l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique Cys117. Trp65 stabiliserait par interaction hydrophobe la fonction méthyle et la partie aliphatique de la chaîne latérale de la méthionine sulfoxyde, comme observé sur les groupements méthyles du cacodylate dans le cas de *N. gonorrhoeae*, le cycle aromatique de Tyr85 ou la chaîne aliphatique de Asn86 dans le cas de *N. meningitidis*.

Lowther et collaborateurs proposent l'action concertée de deux résidus pour déprotoner et ainsi activer la cystéine catalytique. Ils décrivent une « triade catalytique » impliquant les résidus Arg115, Asp107 et la cystéine catalytique Cys117 dont ils observent deux conformations pour la chaîne latérale (Lowther *et al.*, 2002) (figure 26).

Une des positions observée dans la structure de *N. gonorrhoeae* pour la chaîne latérale de Cys117 correspond à celle observée dans notre structure, dont les quatre résidus Cys117 de l'unité asymétrique sont orientés dans la même direction. La chaîne latérale de Arg115 semble mobile et n'est pas observée dans la même conformation dans notre modèle.

L'examen des quatre monomères dans cette région montre que Arg115 est positionnée de manière identique. Les distances les plus courtes observées entre les trois résidus de cette triade dans la structure de *N. meningitidis* sont supérieures à 3 Å (figure 26). Des études complémentaires de mutagenèse dirigée de ces résidus éclaireront sans doute leur rôle dans le mécanisme catalytique. Des résultats préliminaires obtenus dans le groupe du professeur G. Branlant tendraient à infirmer ces hypothèses quant à leur rôle dans l'activation de la cystéine catalytique (communication personnelle).

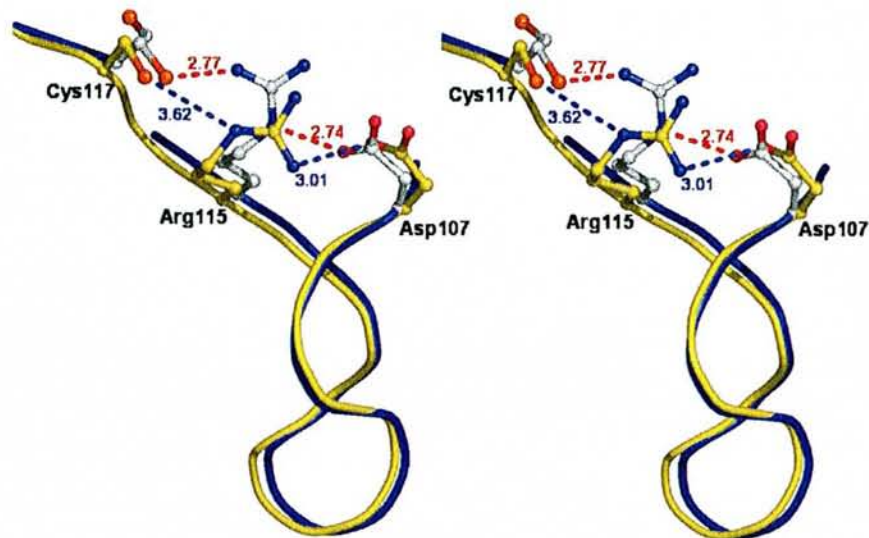


Figure 26 : Vue stéréoscopique de la superposition des structures des MsrB de *N. meningitidis* (jaune) et *N. gonorrhoeae* (bleue) illustrant l'activation potentielle de Cys117 par Arg115 et Asp107

II.4. Etude structurale de la forme oxydée du domaine MsrB de PILB

Dans le cadre de l'étude du mécanisme catalytique des MsrB, la résolution de la structure d'une forme oxydée de la MsrB par la méthionine sulfoxyde pouvait apporter des informations structurales complémentaires sur d'éventuels changements conformationnels induits par la formation du pont disulfure ou sur le rôle des résidus déjà identifiés.

II.4.1. Conséquences de l'oxydation sur la structure globale

Les structures des formes réduite et oxydée du module MsrB de PILB présentent un écart-type (r.m.s.d) sur la position des carbonés α de 0.8 Å. Aucun changement conformationnel majeur ne modifie la structure globale de l'enzyme après réduction de celle-ci (figure 27).

La conformation de la boucle β 4- β 5, non contrainte par l'empilement cristallin dans la forme oxydée, correspond à celle adoptée dans le monomère B de la forme réduite et dans le modèle de *N. gonorrhoeae*.

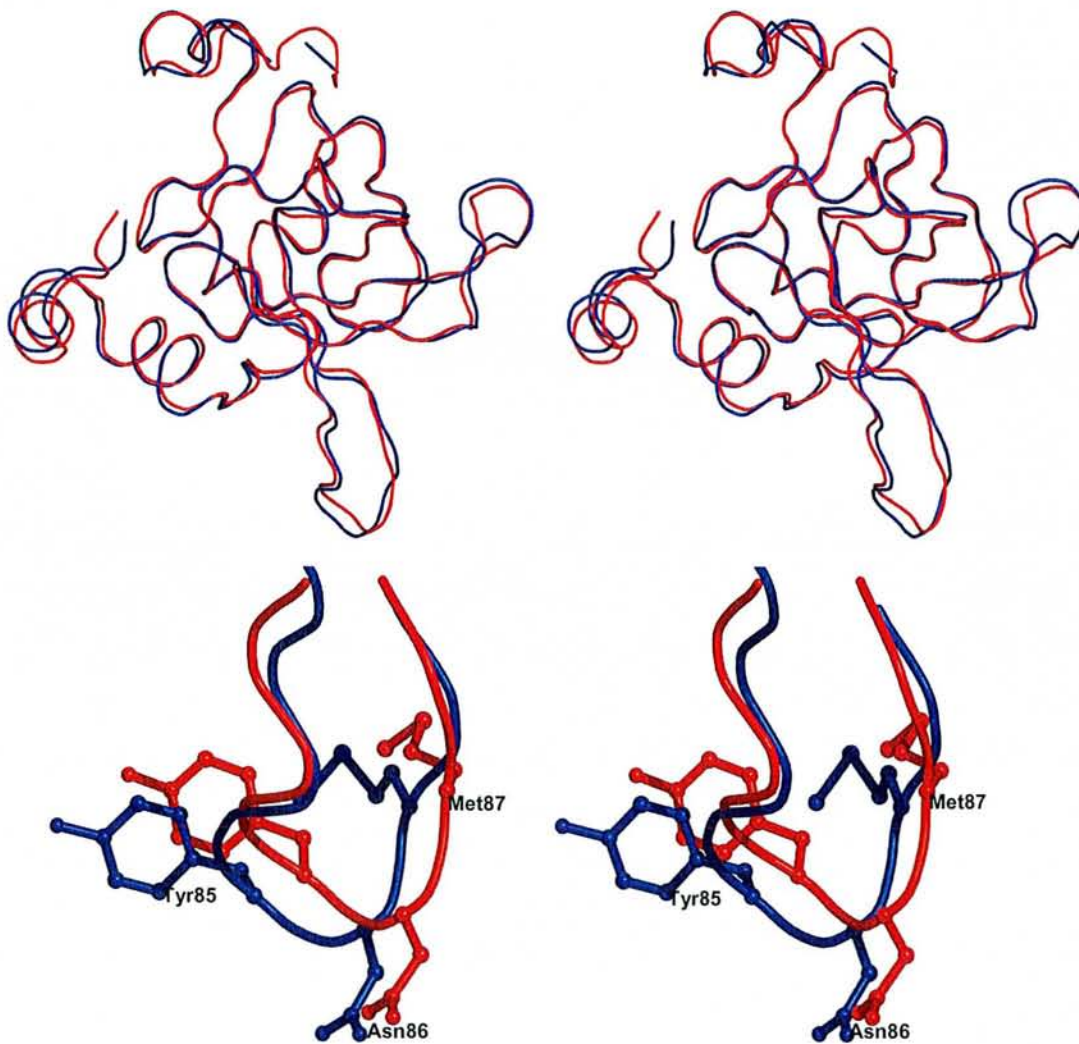


Figure 27 : En haut : Vue stéréoscopique de la superposition des traces α des formes réduite (rouge, monomère B) et oxydée (bleue) du module MsrB de *N. meningitidis*
En bas : Vue stéréoscopique d'un détail de cette superposition : la boucle β 4- β 5

Malgré la modeste résolution des données (3 Å), la qualité du modèle est satisfaisante et l'ensemble des acides aminés constituant le site actif a pu être modélisé, en particulier le pont disulfure Cys117-Cys63 (figure 28).

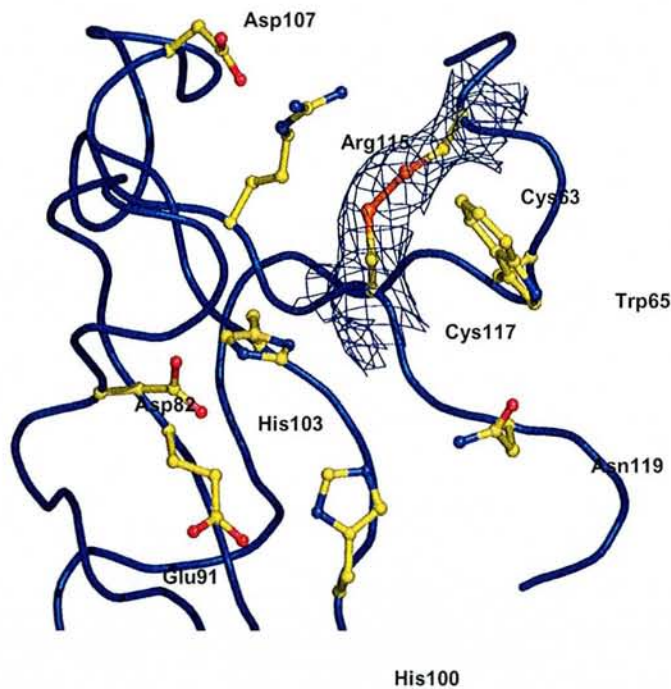


Figure 28 : Vue du site actif de la forme oxydée du domaine MsrB de PILB. La carte de densité électronique $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contour 1.2σ) à 3 Å de résolution est superposée au pont disulfure Cys117-Cys63.

II.4.2. Analyse du site actif

L'observation principale lors de l'analyse des cartes de densité électronique du modèle affiné est la présence d'une zone de densité résiduelle dans le site actif. Cette densité a tout d'abord été modélisée par un ion sulfate présent dans la solution de cristallisation. Cependant, aucune modélisation satisfaisante tant sur le plan électronique que stéréochimique n'a permis de placer cet ion dans le site actif. La seconde hypothèse a été de positionner soit la méthionine sulfoxyde (L-Met-R-SO), utilisée pour l'oxydation de l'enzyme, soit le produit de la réaction, la méthionine sous forme réduite. La technique d'oxydation utilisée dans le groupe du professeur G. Branlant doit normalement éliminer ce substrat ou produit par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne après formation du pont disulfure. L'affinité de l'enzyme pour le substrat étant relativement faible (cf introduction), la méthionine sulfoxyde est utilisée en large excès dans les conditions expérimentales d'oxydation et pourrait donc ne pas avoir été totalement éliminée. L'affinité de la forme oxydée de l'enzyme envers ce substrat a également été mesurée dans le groupe

du professeur G. Branlant et ne montre pas de différence significative d'affinité envers la méthionine sulfoxyde en comparaison de la forme réduite (communication personnelle). De plus, l'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon natif d'enzyme oxydée (différent de celui utilisé pour la cristallisation) ne détecte la présence d'aucun adduit (communication personnelle). Cependant, le point commun reliant toutes les structures du module MsrB de PILB déjà résolues est l'occupation du site actif visiblement favorable à la stabilité de l'enzyme. Aussi, les modélisations d'une méthionine sulfoxyde puis d'une méthionine dans le site actif de l'enzyme oxydée ont-elles malgré tout été réalisées, afin d'expliquer la densité résiduelle observée.

a) Modélisation d'une L-Met-R-SO dans le site actif

La position affinée contre les données cristallographiques à 3 Å de résolution la plus satisfaisante pour la méthionine sulfoxyde place son atome d'oxygène $O\delta_1$ à 2.9 Å de l'atome d'azote $N\delta_1$ de His103. La distance observée est légèrement supérieure à celles mesurées dans les formes réduites avec les atomes d'oxygène de la tyrosine, de l'asparagine ou du cacodylate. On observe un déplacement global de His103 qui s'éloigne par conséquent de Asp82, fragilisant l'interaction entre ces deux résidus (figure 29).

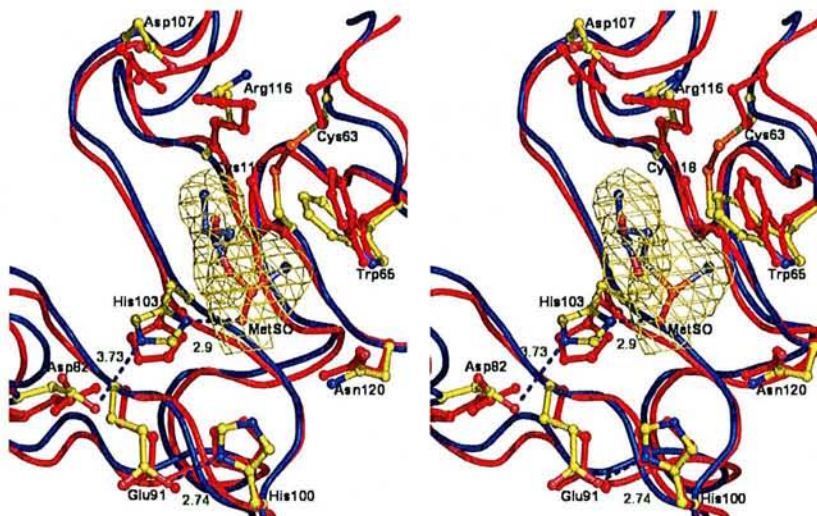


Figure 29 : Vue stéréoscopique de la superposition des sites actifs des formes oxydée (bleue) et réduite (rouge) du module MsrB de PILB de *N. meningitidis*. Une molécule de Met-R-SO est modélisée dans le site et la carte omit ($F_{obs} - F_{calc}$, 3σ) est superposée.

La méthionine sulfoxyde semble n'être maintenue dans le site que par cette interaction avec His103 et l'interaction à caractère hydrophobe avec Trp65. Ce dernier voit son cycle

aromatique pivoter de quelques degrés selon l'axe C_{β} - C_{γ} par rapport à sa position dans le site actif des formes réduites (figure 29). Ainsi, le rôle de ce résidu semble bien être de stabiliser, voire d'optimiser la position du substrat par interactions hydrophobes non seulement avec la fonction méthyle de la méthionine sulfoxyde mais aussi avec l'ensemble de la chaîne aliphatique de celle-ci. Notons également que ce substrat n'est pas le substrat naturel de l'enzyme et que ce dernier, stériquement plus contraignant nécessite sans doute des adaptations du site actif. Ainsi, ce mouvement observé serait une marque de la capacité de l'enzyme à s'adapter aux environnements différents proposés par les substrats physiologiques de la MsrB.

La comparaison des formes réduite et oxydée montre également que la cystéine de régénération (**B**) Cys63 est plus mobile que Cys118 (**A**) qui est observée sensiblement dans la même position dans les deux formes : seule l'angle χ de la chaîne latérale de Cys63 présente un grand degré de liberté (figure 30).

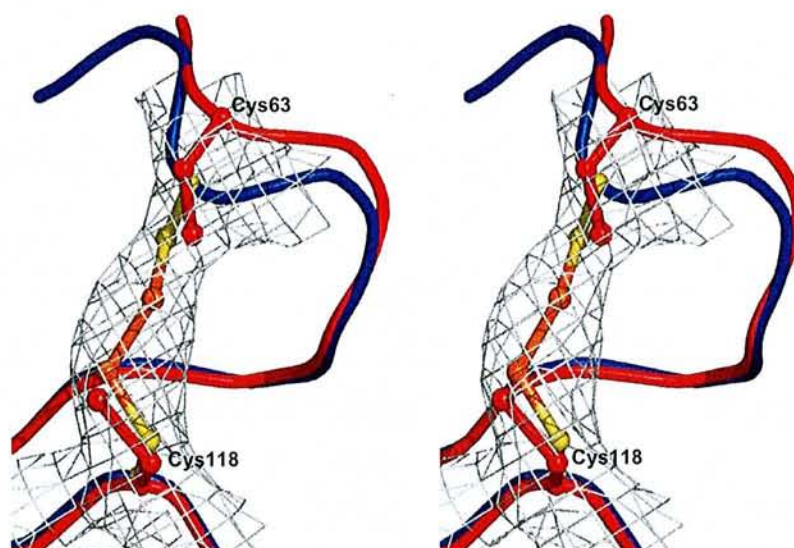


Figure 30 : Vue stéréoscopique de la superposition des structures oxydée et réduite de la MsrB dans la région des cystéines catalytiques.

La carte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contour 1.2σ) est superposée au modèle de la MsrB oxydée.

Cette dernière observation soulève la question de l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique sur l'atome de soufre de la méthionine sulfoxyde. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe du professeur G. Branlant par des mesures en cinétique rapide montrent que l'attaque de Cys63 (**B**) sur l'acide sulfénique formé après l'attaque nucléophile de Cys117 (**A**) est instantanée (Antoine *et al.*, 2003). En tournant autour de la liaison C_{α} - C_{β} de Cys117 dans la structure réduite, la distance minimale observée entre l'atome de soufre S_{γ} de Cys117 et S_{δ} de la méthionine sulfoxyde est de 2.38 Å, ce qui positionne la cystéine favorablement pour l'attaque nucléophile (figure 31).

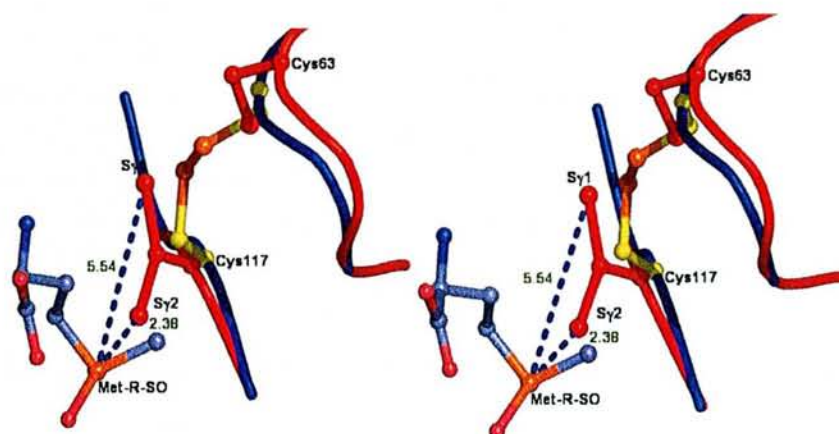


Figure 31 : Vue stéréoscopique illustrant les distances mesurées entre les atomes S_{γ} de Cys117 et S_{δ} de la méthionine sulfoxyde.

$S_{\gamma 1}$ correspond à la position de l'atome de soufre observée dans la forme réduite et $S_{\gamma 2}$ simule la position la plus proche du S_{δ} par rotation autour de la chaîne latérale de Cys117.

Une fois l'acide sulfénique formé, la chaîne latérale de Cys117 doit pivoter à nouveau de 180° pour permettre sa régénération par Cys63 ce qui élimine toute possibilité de stabilisation de cet acide sulfénique par des résidus du site actif. Notons que ce groupement sulfénique est peu stable, ce qui corrobore nos observations et hypothèses.

Cette structure de la forme oxydée n'apporte pas d'information supplémentaire quant aux résidus qui pourraient activer Cys117. Asp107 et Arg115 sont observés dans les mêmes positions dans les deux états d'oxydation de l'enzyme. Cependant, le fait d'observer toujours Cys117 sensiblement dans la même position laisse supposer que l'activation doit s'effectuer par des résidus proches. Notons que la faible résolution de la structure n'a permis de modéliser que quelques molécules de solvant, les moins désordonnées. Cependant, aucune ne se situe à proximité du site actif. La molécule d'eau stabilisant Asn119 et His100 dans le site actif des formes réduites ne semble plus être présente dans la forme oxydée mais les chaînes latérales de ces résidus n'ont pas bougé. Des analyses préliminaires de mutagenèse dirigée montrent que His100 aurait un rôle dans l'affinité du substrat pour le site actif mais ne jouerait, contrairement à His103, aucun rôle de catalyseur dans la réaction. Le rôle de Asn119 reste quant à lui à explorer.

En conclusion, cette structure de la forme oxydée, complexée à la méthionine sulfoxyde, confirme l'ensemble des hypothèses émises lors de l'analyse des structures des formes réduites, mais n'explique toujours pas la totalité du mécanisme de réduction des Met-R-SO. Afin de compléter cette étude nous avons cristallisé un mutant de la cystéine catalytique C117S complexé à un substrat beaucoup plus affin. Ce substrat est une méthionine sulfoxyde dont les groupements carboxyliques et amides ont été modifiés afin de simuler des liaisons peptidiques. Cette structure d'une forme réduite complexée à un substrat, ainsi que

les études de mutagenèse dirigée menées dans le groupe du professeur G. Branlant, devraient affiner notre connaissance du mécanisme catalytique.

b) Modélisation d'une méthionine dans le site actif

Le manque de résolution, la qualité moyenne des données, et l'existence d'une structure de méthionine aminopeptidase complexée à la méthionine (le substrat de la réaction) disponible dans la PDB (code 1c21) nous ont poussés à tester la modélisation d'une méthionine dans le site actif de la MsrB oxydée. L'affinité des formes oxydées et réduites pour la méthionine est très faible et aucune inhibition de l'enzyme n'est observée par un excès de méthionine (communication personnelle). Cependant, la modélisation d'une méthionine dans les conditions de notre expérience est possible. La méthionine, produit de la réaction a été modélisée en tenant compte de la position de celle-ci dans le site actif des méthionine aminopeptidases (figure 32).

Les méthionine aminopeptidases sont des métalloprotéases qui coupent la méthionine N-terminale des chaînes polypeptidiques naissantes d'une manière non processive (Folkman, 1995). Ces protéines présentent un repliement caractéristique à l'origine de la famille des repliements de type « pita-bread » (Roderick *et al.*, 1993) mais ne montrent aucune ressemblance structurale avec les MsrB.

L'activité catalytique de ces enzymes dépend de cations métalliques divalents (cuivre, zinc, cobalt...). Le mécanisme enzymatique particulier de ces protéases et les relations structure-fonction de cette classe d'enzyme ont fait l'objet de nombreuses études, référencées dans un article de revue de T. Lowther et B. Matthews (Lowther & Matthews, 1999).

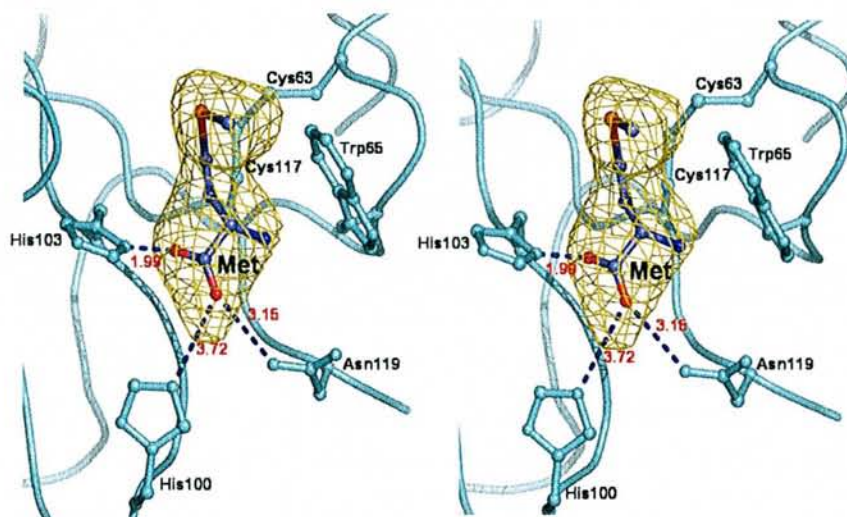


Figure 32 : Vue stéréoscopique de la modélisation d'une méthionine dans le site actif de la forme oxydée du module MsrB de PILB .

La carte de densité électronique omit ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, contour 3σ) est superposée à la méthionine

Les sites actifs des méthionine aminopeptidases et des MsrB présentent des organisations assez similaires (figure 33). Bien que non superposables, le site actif de la méthionine aminopeptidase est composé de deux résidus histidines équivalents aux histidines His103 et His100 de la MsrB, d'un tryptophane pour la stabilisation du groupement méthyle de la méthionine (équivalent de Trp65) et de deux résidus cystéines à proximité du substrat qui ne jouent cependant aucun rôle dans l'activité catalytique.

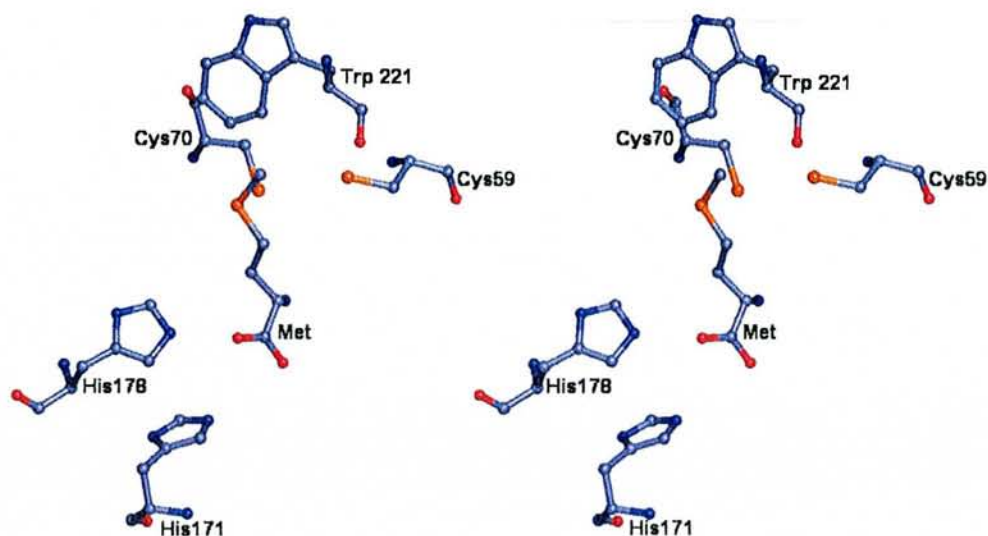


Figure33: Vue stéréoscopique de la fixation de la méthionine dans le site actif de la méthionine aminopeptidase d'*E. coli*. (code PDB : 1C21)

La méthionine ainsi modélisée dans le site actif de la MsrB, se trouve dans une position inverse de celle de la méthionine sulfoxyde. L'atome de soufre S_γ de la méthionine se positionne plus proche de la cystéine catalytique et la flexibilité de la chaîne qu'offre la méthionine pourrait être un argument pour modéliser une MetSO de la même façon. Cependant, dans cette configuration, il serait d'une part difficile d'imaginer une stabilisation pour la fonction sulfoxyde et d'autre part, la chaîne principale de la MetSO se positionnerait dans un espace trop restreint ne permettant pas d'envisager le reste de la protéine substrat. Le rôle de His103 deviendrait uniquement une stabilisation de la chaîne principale de la protéine substrat pour le positionnement de la méthionine sulfoxyde, or, des analyses biochimiques tendent à attribuer à ce résidu un rôle de catalyseur dans la réaction. Malheureusement, la qualité de nos données de diffraction des rayons X ne permet pas de trancher quant à la nature de la molécule qui occupe le site actif. L'analyse de la structure d'un mutant C17S complexé à une méthionine sulfoxyde modifiée par deux groupements protecteurs simulant des liaisons peptidiques devrait apporter de nouvelles pistes de

réflexions. Des cristaux de ce complexe ont été obtenus mais n'ont pas encore été testés en diffraction des rayons X.

En conclusion, cette étude a permis de résoudre la première structure d'une MsrB, dans sa forme réduite et oxydée. La caractéristique principale de toutes les structures résolues est la nécessité de l'occupation du site actif de l'enzyme pour sa stabilité. Ces structures ont permis de confirmer les hypothèses et analyses biochimiques sur le rôle des résidus du site actif et en particulier ceux de His103, His100 et Trp65, mais laissent des incertitudes sur les mécanismes d'activation de la cystéine catalytique ou encore le positionnement de la méthionine sulfoxyde dans le site actif. La résolution du complexe précédemment cité et récemment cristallisé apportera sans doute de nouvelles informations pour la compréhension du mécanisme.

II.5. Etude structurale préliminaire du domaine MsrA de PILB

Le domaine MsrA de PILB est constitué des 193 résidus centraux de la protéine de fusion, et appartient à la sous-famille des MsrA à deux cystéines CysA et CysC. La structure de la forme oxydée de l'enzyme a été résolue à 2 Å de résolution et constitue la première structure d'une MsrA sous forme oxydée. Récemment la structure d'une MsrA de cette famille à deux cystéines sous forme réduite a été résolue chez *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Taylor *et al.*, 2003). L'empilement cristallin dans les cristaux de la MsrA de *M. tuberculosis* positionne le résidu méthionine N-terminal d'une molécule dans le site actif d'une molécule voisine de l'unité asymétrique proposant ainsi un modèle de fixation du substrat. La comparaison des structures oxydée de *N. meningitidis* et réduite de *M. tuberculosis*, alliée aux connaissances biochimiques et structurales acquises sur les MsrA déjà caractérisées, conduit à un bon modèle de réflexion sur les déterminants structuraux du mécanisme catalytique. La numérotation de référence utilisée dans la suite de ce chapitre correspond à celle de la MsrA d'*E. coli* (cf figure 5).

II.5.1. Structure globale de la forme oxydée du module MsrA de PILB

La superposition des structures des MsrA de *N. meningitidis* et *M. tuberculosis* montre que les structures sont globalement similaires. L'écart-type sur la position des carbonés α (r.m.s.d) est de 1.1 Å sur les cent premiers résidus. Les parties C-terminales ne se superposent pas (figure 34). La différence structurale majeure observée concerne une boucle de douze résidus entre les positions 121 et 132 (figure 35).

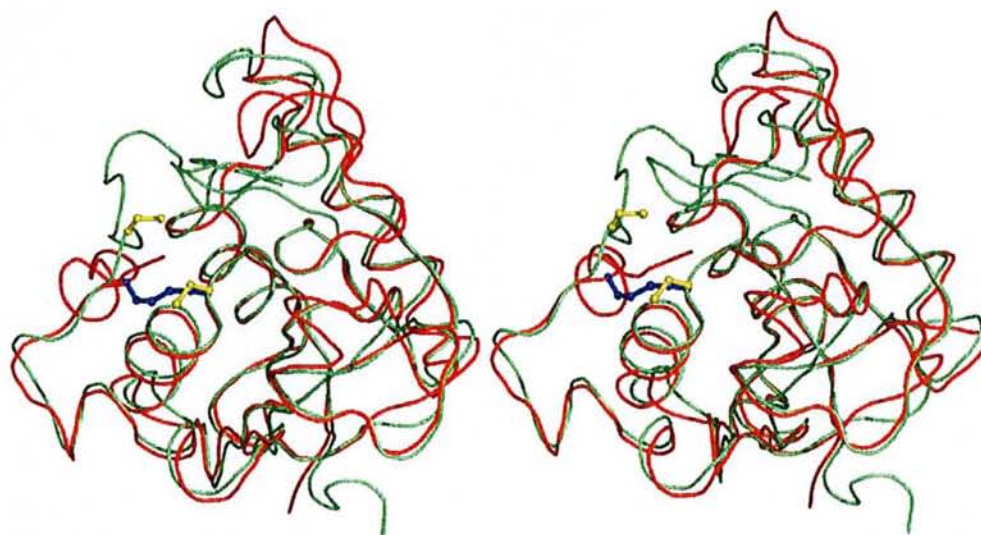


Figure 34 : Vue stéréoscopique de la superposition des traces α des MsrA de *N. meningitidis* (rouge) et *M. tuberculosis* (vert). Le pont disulfure Cys51-Cys198 de *N. meningitidis* est représenté en bleu, les cystéines réduites de *M. tuberculosis* en jaune.

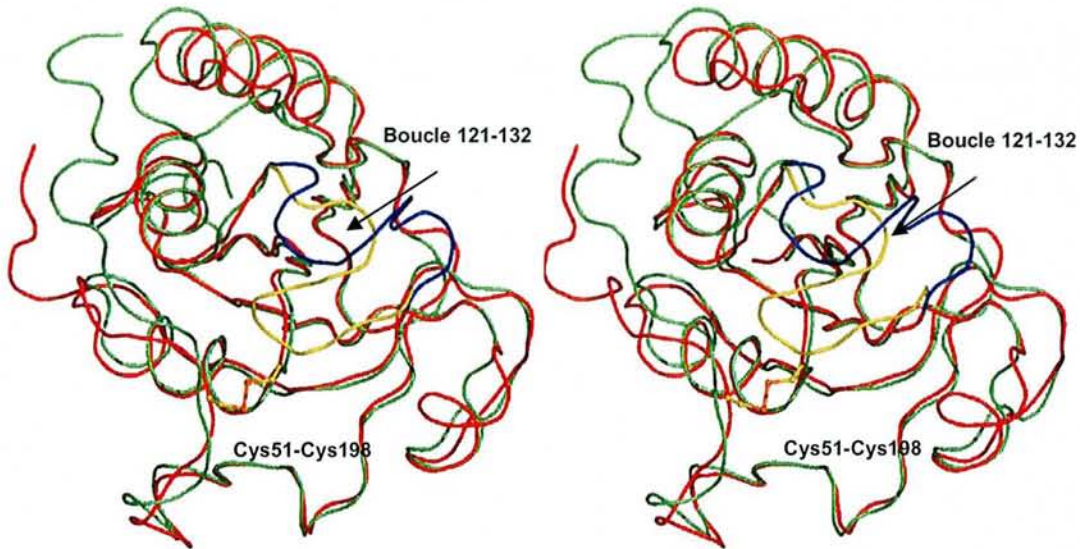


Figure 35 : Vue stéréoscopique de la superposition des structures des MsrA de *N. meningitidis* (bleue) et *M. tuberculosis* (jaune) montrant la différence de position de la boucle 121-132. Par souci de clarté, les cystéines réduites du modèle *M. tuberculosis* ne sont pas représentées.

D'un point de vue structural, il apparaît dans le modèle de *M. tuberculosis* que cette boucle recouvre et obstrue le site actif contrairement au modèle *N. meningitidis* où le site est plus ouvert et accessible au solvant. Les dessins des figures 36 et 37 illustrent l'accessibilité des cystéines dans les deux cas (figure 36 et 37).

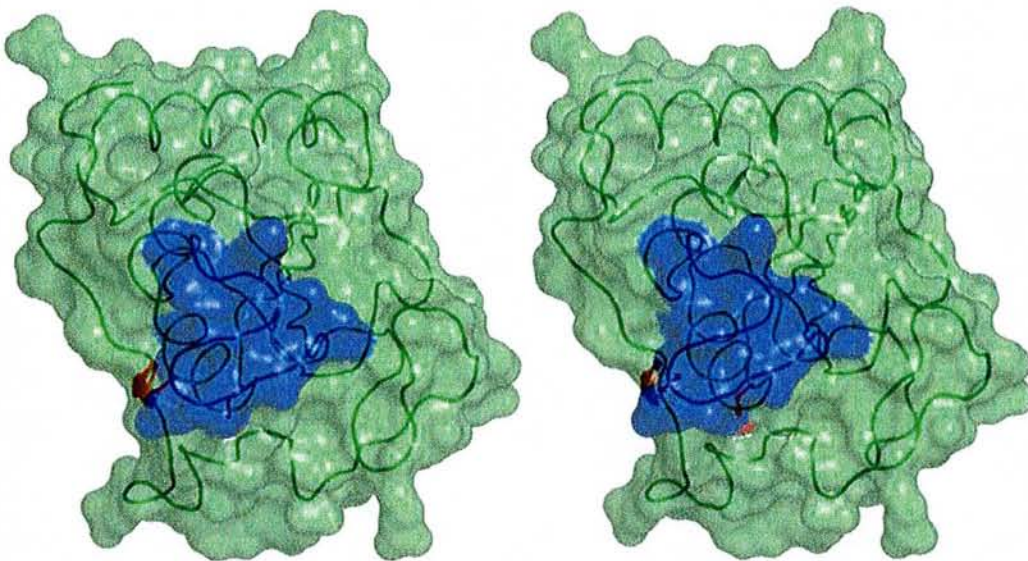


Figure 36 : Vue stéréoscopique de la surface moléculaire de la MsrA de *M. tuberculosis* montrant l'obstruction du site actif par la boucle 121-132 (bleue)

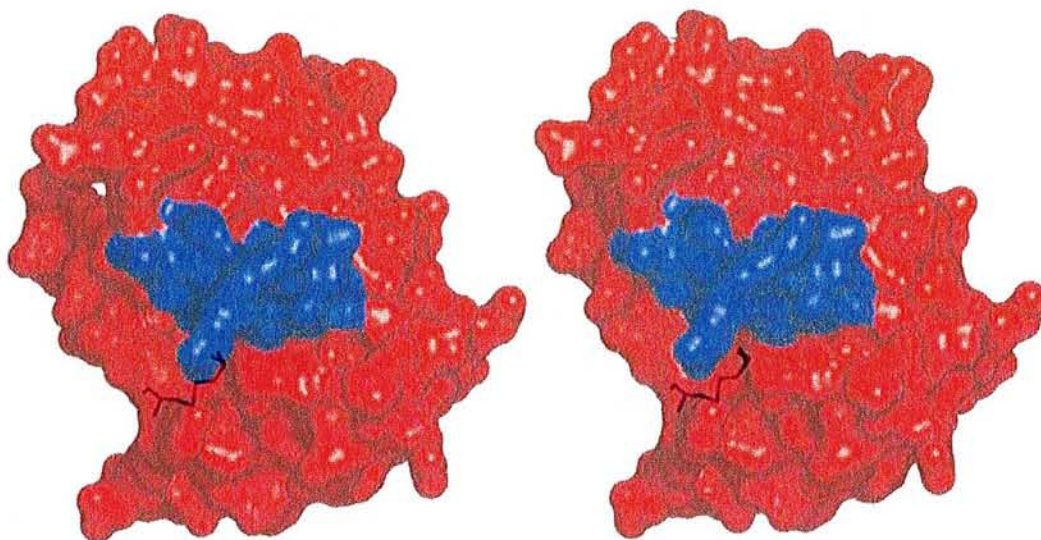


Figure 37 : Vue stéréoscopique de la surface moléculaire de la MsrA de *N. meningitidis* montrant l'accessibilité accrue des cystéines et la position de la boucle 121-132 (bleue)

Notons que cette boucle se replie de manière identique dans les modèles des MsrA de *M. tuberculosis*, d'*E. coli* et *B. taurus* correspondant tous à des formes réduites de l'enzyme. Les séquences primaires des boucles des modèles de *M. tuberculosis* et *N. meningitidis* sont très similaires entre elles, mais sensiblement différentes de celles d'*E. coli* et *B. taurus* (tableau 12).

<p>T-S-L-N-K-Q-G-N-D-T-G-T T-T-K-D-R-Q-G-N-D-R-G-T</p>	<p><i>N. meningitidis</i> <i>M. tuberculosis</i></p>
<p>A-Q-G-M-R-Q-G-N-D-H-G-T T-Q-G-M-R-Q-G-N-D-H-G-S</p>	<p><i>E. coli</i> <i>B. taurus</i></p>

Tableau 12 : Séquences conservées (en gras) des boucles 121-132 dans les modèles de *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*, *E. coli* et *B. taurus*

D'un point de vue fonctionnel, il est évident que la forme oxydée pourrait nécessiter un tel changement conformationnel afin de préparer un environnement stériquement favorable à l'attaque non spécifique de la thiorédoxine pour la réduction de l'enzyme. La conformation observée dans le modèle de *M. tuberculosis* semble peu propice à l'attaque du système de régénération. Cependant il convient de rester prudent, aucune étude

biochimique n'a à ce jour émit l'hypothèse de changements conformationnels avant l'étape de réduction de l'enzyme par le système thiorédoxine.

La seconde conséquence liée à la position de cette boucle 121-132 au sein de la structure de la forme oxydée de la MsrA de *N. meningitidis* est le déplacement de Asp129, observé proche du site actif dans toutes les autres structures de MsrA, Asp129, conservé dans toutes les séquences de MsrA dans un motif QGND, est décrit dans la modélisation de la MsrA de *M. tuberculosis* en liaison hydrogène avec la fonction amide de la chaîne principale de la méthionine « substrat » (figure 41) et aurait un rôle dans l'ancrage de cette dernière au site actif (Taylor *et al.*, 2003). Asp129 dans la structure de la MsrA de *N. meningitidis* se trouve repoussé à plus de 14 Å de la cystéine catalytique (figure 38).

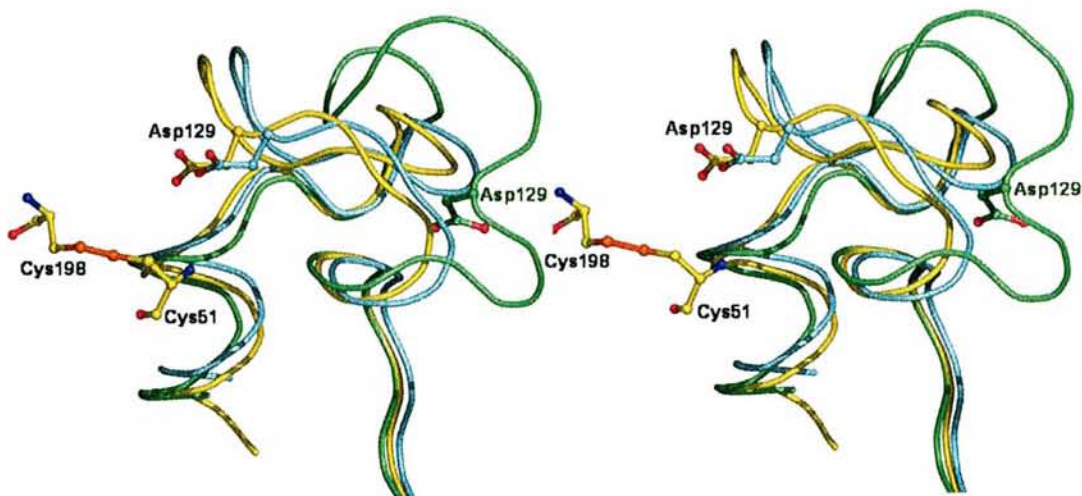


Figure 38 : Vue stéréoscopique illustrant la position de Asp129 dans les modèles des MsrA de *E. coli* (jaune), *M. tuberculosis* (cyan), *N. meningitidis* (vert)

La possible mobilité de cette boucle dans une transition forme réduite/forme oxydée est une question que soulève la résolution de cette structure. Notons qu'au sein de l'empilement cristallin de la MsrA de *N. meningitidis*, la boucle 121-132 forme quelques contacts intermoléculaires qui stabilisent cette conformation, cependant il paraît peu probable que l'empilement seul ait provoqué le déplacement de la boucle. Afin de compléter notre étude, nous avons cristallisé la forme réduite du fragment MsrA de *N. meningitidis* dans une condition de cristallisation différente de la forme oxydée, mais aucune donnée n'a encore été collectée. La résolution de cette structure devrait confirmer ou infirmer la nécessité de ce changement conformationnel après oxydation de l'enzyme. La mutagenèse dirigée de Asp129 permettra sans doute aussi d'éclaircir la fonction de ce dernier.

II.5.2. Organisation du site actif de la forme oxydée du module MsrA de PILB

La résolution de la structure du module MsrA oxydé de *N. meningitidis* a posé quelques problèmes, et en particulier l'affinement d'une partie du modèle contre les données de diffraction des rayons X. En effet, comme mentionné dans le chapitre II.2.1, environ 30 acides aminés C-terminaux semblent très agités et n'ont pas pu être modélisés correctement dans les cartes de densité électronique, au moins en ce qui concerne leurs chaînes latérales. Cette région correspond aux acides aminés qui font suite dans la séquence à la cystéine de régénération C : Cys198. L'état d'oxydation des protéines dans le cristal n'est sans doute pas homogène, car la densité électronique dans la région du pont disulfure est plus faible qu'attendue. De plus, l'affinement cristallographique avec un taux d'occupation de 100 % pour la cystéine Cys198 dans une position qui explique la densité électronique observée dans les cartes de fourier différences $3F_{\text{obs}}-2F_{\text{calc}}$ fait apparaître un pic de densité négative sur le pont disulfure. La figure 39 représente le site catalytique de l'enzyme de *N. meningitidis* superposé à la densité électronique dans cette région.

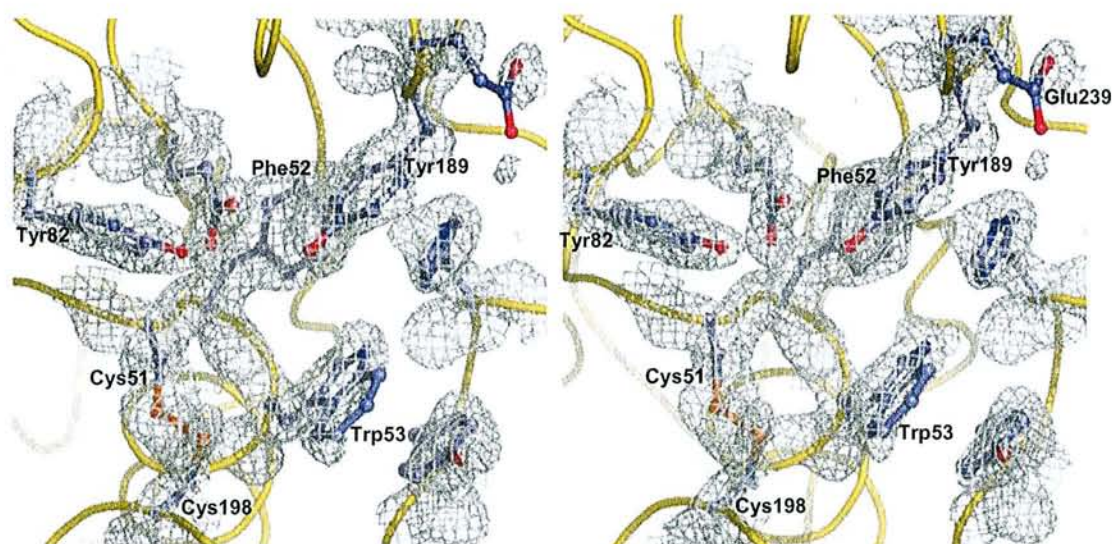


Figure 39 : Vue stéréoscopique du site actif de la forme oxydée du module MsrA de PILB de *N. meningitidis* superposé à la densité électronique $3F_{\text{obs}}-2F_{\text{calc}}$ (contour 1.2σ).

L'empilement cristallin dans les cristaux de la MsrA de *M. tuberculosis* positionne dans le site actif d'une molécule de l'unité asymétrique, le résidu méthionine N-terminal d'une molécule voisine (figure 40). Cette modélisation de la méthionine dans le site actif est compatible avec l'ensemble des résultats biochimiques et structuraux obtenus sur les structures des MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus* (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Tête-Favier *et al.*, 2000 ; Lowther *et al.*, 2000).

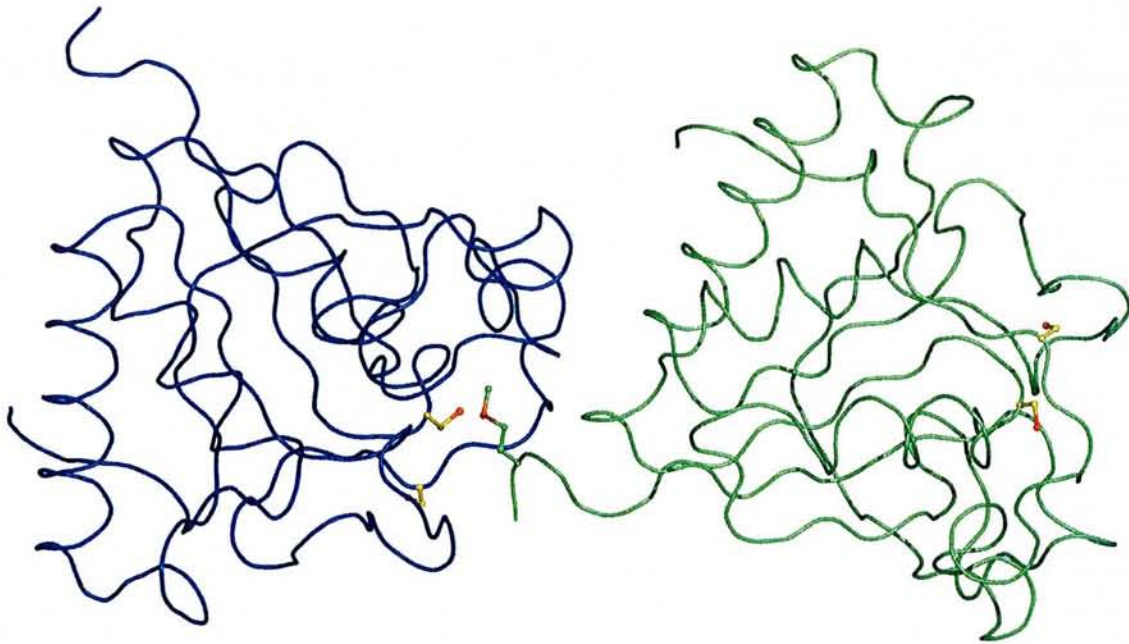


Figure 40 : Assemblage de deux molécules voisines dans l'empilement orthorhombique des cristaux de la MsrA de *M. tuberculosis*. La méthionine N-terminale d'un monomère (vert) se positionne dans le site actif de la seconde (bleue). La méthionine et les cystéines des deux molécules sont représentées en mode sphères et bâtons.

Dans le modèle proposé (figure 41), l'atome de soufre $S\delta$ de la méthionine se trouve à 3.4 Å de l'atome de soufre $S\gamma$ de la cystéine catalytique Cys51 (A), correctement positionné pour une attaque nucléophile sur la méthionine sulfoxyde. Le groupement ϵ -méthyle de la méthionine est stabilisé dans la poche hydrophobe que délimitent les chaînes latérales de Phe52 et Trp53 de la séquence consensus signature GCFWG(C/G). Asp129 partage une liaison hydrogène avec la chaîne principale de la méthionine « substrat » participant ainsi à l'ancrage de celle-ci dans le site actif. Le second atome d'oxygène ($O\delta_2$) de Asp129 forme des liaisons hydrogènes avec la tyrosine Tyr197 (non représentée sur la figure 41 par souci de clarté) et une molécule d'eau (W1) formant un pont vers le groupement NH amide de Cys51. Cette molécule d'eau est conservée dans les structures des MsrA d'*E. coli* et *B. taurus* et pourrait jouer un rôle structural en orientant correctement la chaîne latérale de Asp129 pour une interaction optimale de celle-ci avec le groupement NH amide de la méthionine sulfoxyde. Le cycle aromatique de Tyr197 pourrait également participer par contact hydrophobe à la stabilisation de la chaîne principale de la protéine substrat.

Glu94, Tyr82 et Tyr134 forment des liaisons hydrogènes avec une seconde molécule d'eau (W2) commune aux trois structures de MsrA. Si cette molécule est déplacée lorsque la Met-S-SO se fixe dans le site actif, ces résidus pourraient former un site de fixation pour l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde.

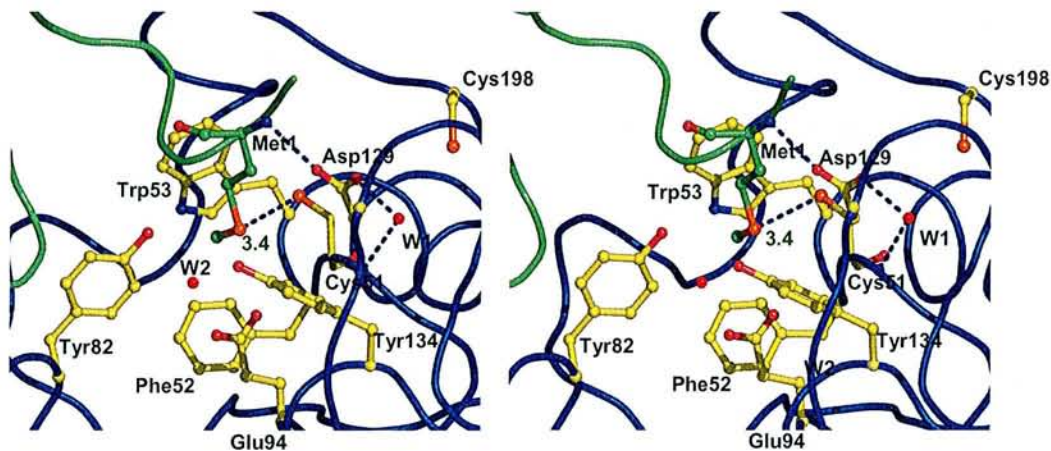


Figure 41 : Vue stéréoscopique du site actif de la MsrA de *M. tuberculosis*. La numérotation utilisée est celle de la MsrA d'*E. coli* pour faciliter les comparaisons. Code PDB : 1NWA ; le code couleur correspond à celui de la figure 34 pour la chaîne principale

Cette structure complète donc les résultats obtenus dans notre laboratoire sur la MsrA d'*E. coli* et en particulier la modélisation d'un probable état de transition par la molécule de diméthyl arsenate fixée covalentement sur le soufre de la cystéine catalytique Cys51 (Tête-Favier *et al.*, 2000).

Des résultats biochimiques préliminaires obtenus dans le groupe du professeur G. Branlant par M. Antoine ont montré l'importance du résidu Glu94 dans la catalyse acide (figure 42). Glu94 permettrait la protonation de l'atome d'oxygène dans l'état de transition mais aussi du groupement hydroxyle de l'intermédiaire acide sulfénique, facilitant ainsi le départ de la molécule d'eau et la formation du pont disulfure intramoléculaire. Cette hypothèse implique la présence du résidu Glu94 sous forme d'acide glutamique et donc une reprotonation pour satisfaire à la deuxième sous-étape.

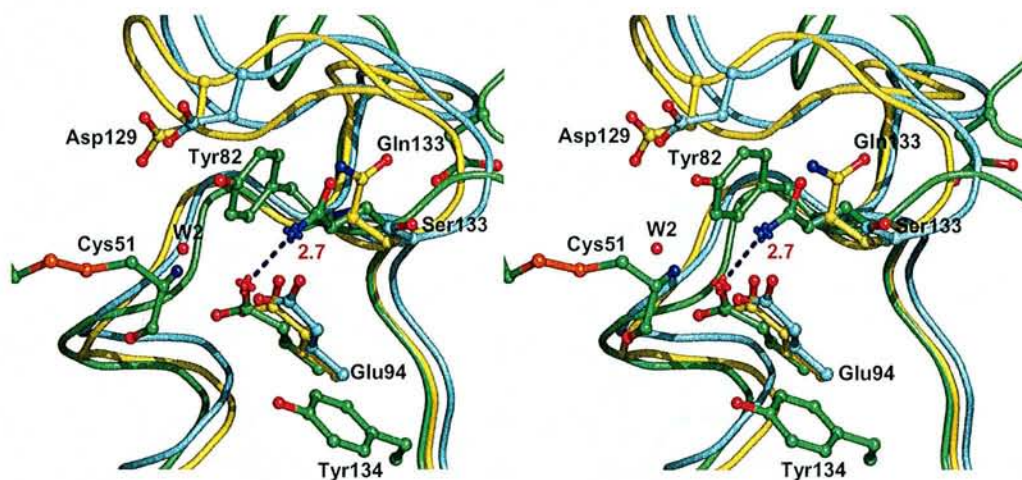


Figure 42 : Vue stéréoscopique de la superposition des sites actifs des MsrA de *N. meningitidis* (vert), *M. tuberculosis* (cyan) et *E. coli* (jaune). Ne sont représentés en double que les acides aminés dont la position est différente dans les trois structures. Seules les cystéines de la forme oxydée sont représentées.

En conclusion, cette structure de la forme oxydée soulève une question quant à un possible changement conformationnel lors du changement d'état d'oxydation de l'enzyme et confirme l'implication de Glu94 dans le mécanisme. La mutagenèse dirigée de ce dernier acide aminé et la résolution de la structure de la forme réduite de la MsrA de *N. meningitidis* devrait compléter nos travaux. Enfin, la résolution de la structure d'un mutant inactif complexé à la Met-S-SO pourrait valider l'ensemble des hypothèses émises.

III. Etude structurale de la MsrA chloroplastique de peuplier

Article en préparation : “Functionnal and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type A methionine sulfoxyde reductase”

Ce chapitre, organisé autour d'un article en préparation, présente les résultats biochimiques et structuraux obtenus sur la MsrA chloroplastique de peuplier, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du professeur J.P. Jacquot du laboratoire Interactions Arbres Microorganismes qu'il co-dirige.

Deux isoformes de MsrA de peuplier, une MsrA cytosolique (cMsrA) et une plastidiale (pMsrA) sans son peptide de transit ont été surexprimées chez *E. coli* par N. Rouhier dans le groupe du professeur J.P. Jacquot. Ces deux MsrA appartiennent à la famille des MsrA à trois cystéines (A, C et D) définie en introduction. Ces cystéines seront nommées A,B et C dans l'article.

Les analyses biochimiques, de titration des thiols libres, de mutagenèse dirigée concluent à un mécanisme catalytique identique à celui démontré pour la MsrA d'*E. coli* (Boschi-Muller *et al.*, 2000).

D'un point de vue structural, la structure de la pMsrA à été résolue à 1.77 Å de résolution. Cette structure correspond à la première structure d'une MsrA de plante et présente un repliement caractéristique des MsrA connues. Contrairement aux autres structures déjà résolues, la partie C-terminale comprenant les deux cystéines de régénération, a pu être modélisée dans la densité électronique. Cependant, les distances mesurées entre les atomes de soufre des trois cystéines sont toujours (comme observé dans les structures résolues à ce jour) incompatibles avec le mécanisme proposé. L'observation d'une partie C-terminale repliée et stabilisée au sein de la structure nous a conduit à modéliser par dynamique moléculaire la formation des ponts disulfure successifs. Cette modélisation, dont le but n'était pas de définir un mécanisme universel de formation de ces ponts disulfure, apporte deux types d'informations nouvelles. Tout d'abord, la formation des ponts disulfure est possible sans déstructurer totalement le repliement de la partie C-terminale de la protéine. Enfin, cette modélisation permet d'émettre une hypothèse sur un mouvement potentiel de la cystéine catalytique, incluse dans une boucle, pour favoriser sa régénération par la cystéine C.

Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type A methionine sulfoxide reductases

Brice Kauffmann^{1*}, Nicolas Rouhier^{2*}, Frédérique Tete-Favier¹, Pasquale Paladino¹, Jérémie Couturier², Pierre Gans⁴, Sandrine Boschi-Muller³, Guy Branlant³, Jean-Pierre Jacquot² and André Aubry^{1,5}

¹LCM³B, Groupe de Biocristallographie, UMR CNRS 7036, Université Henri-Poincaré, Faculté des Sciences BP 239 54506 Vandoeuvre Cedex France

²Unité Mixte de Recherches 1136 INRA Université Henri-Poincaré, Interactions Arbres Microorganismes. Faculté des Sciences BP 239 54506 Vandoeuvre Cedex France

³Laboratoire MAEM, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences BP 239 54506 Vandoeuvre Cedex France

⁴Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire. Institut de Biologie Structurale CEA-CNRS-UJF "Jean-Pierre Ebel" 38027 Grenoble Cedex 1.

⁵Corresponding author : Tel ++ 33 3 83684225, email : aubry@lcm3b.uhp-nancy.fr

*These two authors have equally contributed to the work.

Running title: Structure and function of plant MsrA

Keywords : methionine sulfoxide reductase/mutagenesis/poplar/structure/thioredoxin

Abstract

This study presents new data concerning the molecular functioning and structure of plant type A methionine sulfoxide reductases (MsrA). Both cytosolic and plastidial poplar MsrA were analysed. The enzymes are highly homologous, monomeric and active in the reduction of methionine sulfoxide with either dithiothreitol or poplar thioredoxins as a reductant. In both enzymes, five conserved cysteines are found in positions 31, 66, 85, 182 and 188 (cytosolic isoform numbering). Site-directed mutagenesis indicates that three cysteines are involved in catalysis/regeneration by thioredoxin: Cys 31, the catalytic cysteine and the two C-terminal cysteines Cys 182 and 188. As observed with other MsrA, in the tridimensional structure of the plastidial enzyme, the three cysteinyl residues are far apart. However, the X-ray model shows for the first time a more structured C-terminal end. The conformational changes it would imply during catalysis are evaluated by molecular modelling.

Introduction

In aerobic organisms, various oxidants can damage macromolecules including proteins, nucleic acids and unsaturated lipids (Storz and Imlay, 1999). All the amino acids are susceptible to oxidation, although some of them are more easily damaged (Stadtman, 1993). The two sulfur containing amino acids, cysteine and methionine, are exposed to various reversible or irreversible oxidations (Cooper *et al.*, 2002; Brot and Weissbach, 2000). To counter these deleterious effects, living organisms have developed an array of antioxidative enzymes either to directly detoxify the reactive oxygen or nitrogen species (ROS or RNS) or to repair the damages induced.

Methionine residues can be oxidised reversibly into methionine sulfoxide (MetSO) or irreversibly into methionine sulfone (Brot and Weissbach, 2000). Ubiquitous enzymes called methionine sulfoxide reductases (Msr) are able to reduce free or peptide bound MetSO into methionine (Brot *et al.*, 1981). This reduction is achieved with the help of the thioredoxin (Trx) system (Gonzales Porque *et al.*, 1970; Russel and Model, 1986). Based on the stereoselectivity towards the two diastereoisomers of MetSO, *L*-Met-*S*-SO or *L*-Met-*R*-SO, two types of Msr can be distinguished. Type A Msr (MsrA) specifically reduces the *S*-enantiomer whereas type B Msr (MsrB) reduces the *R*-enantiomer (Moskovitz *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2000; Grimaud *et al.*, 2001). Moreover, recent studies using protein extracts of a double mutant MsrA/MsrB of *Escherichia coli* indicate that *E. coli* possesses in addition a Msr isoform able to reduce free *R*-MetSO, another one which would reduce only the *S*-MetSO in a peptide linkage and finally, a membrane bound associated activity of reduction of *R* or *S*-MetSO in peptides (Etienne *et al.*, 2003; Spector *et al.*, 2003). In some organisms such as bacteria of the *Neisseria* genus, both MsrA and MsrB modules are fused in tandem and the protein called PILB possesses the two activities (Lowther *et al.*, 2002; Olry *et al.*, 2002; Kryukov *et al.*, 2002). In mammals, MsrB are often selenoproteins and sometimes zinc containing proteins, whereas only one isoform of MsrA from *Chlamydomonas reinhardtii* was found to contain a selenocysteine and no MsrA isoforms were shown to have a bound metal or cofactor (Novoselov *et al.*, 2002).

Despite their identical functions, MsrA and MsrB share no sequence identity and are structurally different (Tete-Favier *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000 and 2002). However, enzymatic studies of Msrs revealed that catalysis occur through similar mechanisms, involving cysteinyl residues (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002; Lowther *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002). While MsrBs make use of one or two cysteine(s), catalysis by

MsrAs uses two or three cysteine residues hereafter named CysA, CysB and CysC. In all cases, the first step consists of the attack of CysA onto the methionine sulfoxide, leading to the formation of a transient sulfenic acid with concomitant release of the reduced methionine (Figure 0). The regeneration of the active site involves the formation of one or two consecutive disulfide bridges, CysA-CysB and then CysB-CysC if the third cysteine is present. Ultimately, the latest disulfide bond is reduced by the Trx-dependent-recycling system. For monocysteiny-MsrB, the physiological reductant of the CysA sulfenic acid is yet unknown.

Sequence alignments of MsrAs show that CysA is strictly conserved in the consensus sequence GC_AFW[G/C/S]. Three-dimensional structures of the *E. coli* and the bovine enzymes have been determined to date (Tete-Favier *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000). They reveal a common core composed of a mixed β -sheet that forms a roll flanked by three α -helices on its exterior side, and completed by one α -helix and two antiparallels β -strands. CysA is located in the loop connecting the first β -strand to the first α -helix. The two known structures correspond to MsrAs that possess 3 catalytic cysteines. CysB and CysC are located in the long C-terminal end that coils up around the core. In sequence alignments, the presence and position of CysB and CysC are variable so that their identification can be delicate and do not exclude different positioning in the three-dimensional structure. Furthermore, MsrAs often contain additional cysteinyl residues not involved in the catalytic mechanism, making cysteine assignation difficult on the only basis of sequence alignment.

The cyclic oxidation/reduction of methionine residues is a pathway known to regulate the function of some proteins such as calmodulin or potassium channels (Yao *et al.*, 1996; Ciorba *et al.*, 1997). Moreover, this phenomenon seems to play a role in the antioxidant defense because Msr can repair damages caused to methionine residues (Moskovitz *et al.*, 1997; Moskovitz *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 2000; Stadtman *et al.*, 2002). MsrA are also involved in pathogenicity processes probably by promoting cell adherence or by degrading ROS or RNS (Wizemann *et al.*, 1996; Hassouni *et al.*, 1999; Dhandayuthapani *et al.*, 2001; St John *et al.*, 2001).

In plants, the complete sequencing of the *Arabidopsis thaliana* genome leads to the identification of at least four MsrA, one chloroplastic and three cytosolic enzymes. A cytosolic and a chloroplastic enzyme from *A. thaliana* are active in the reduction of MetSO in the presence of dithiothreitol (DTT) (Sadanandom *et al.*, 2000). The gene encoding the cytosolic isoform was found to be expressed in nearly all plant tissues and to respond to a

pathogen infection by the cauliflower mosaic virus whereas the gene encoding the plastidial isoform is only expressed in photosynthetic tissues, regulated by light and prevents the inactivation of a small heat shock protein (Hsp21) (Sadanandom et al., 2000; Gustavsson et al., 2002).

Previous reports on the plant enzymes have focused essentially on the expression pattern of MsrA, but the functioning and structure of the enzymes have not been addressed. This work describes the first structure of a plant MsrA discussed in relation with the biochemical properties and the catalytic mechanism of two poplar MsrA. Site-directed mutagenesis of cysteine residues was used to elucidate which cysteines of the plant MsrA are implicated in the reduction of Met-S-SO and in the regeneration into a reduced and catalytically active form by thioredoxins. Moreover, two isoforms of Trx have been tested to investigate the efficiency of putative physiological reductants of the two MsrAs.

Results

Sequence analysis

Two isoforms of Populus MsrA, a chloroplastic isoform that we call here conveniently pMsrA (plastidial MsrA) and a cytosolic isoform cMsrA (cytosolic MsrA), were isolated from poplar leaf and root cDNA libraries respectively. Based on transit peptide prediction programs and amino acid comparisons with homologous proteins from *Arabidopsis thaliana*, pMsrA (259 amino acids for the precursor) is predicted to present a 56 amino acids long N-terminal chloroplastic transit peptide (Sadanandom *et al.*, 2000). The size of the mature recombinant pMsrA devoid of the transit peptide produced here is 22980 Da (204 amino acids including the initial methionine and an alanine adding for cloning facility) and the theoretical pI is 5.8. The *cmsra* open reading frame encodes a protein of 190 amino acids with a molecular weight of 21271 Da and a theoretical pI of 6.12. The identity between the mature pMsrA and cMsrA poplar isoforms is 62%. It ranges from 58 to 82% within the plant sequences and from 32 to 40% vs the *Escherichia coli* and *Bos taurus* enzymes, two proteins for which cristallographic structures have been elucidated (Figure 1). As the cysteine residues are recognized as critical for the functioning of MsrA, it is interesting to comment on their positions in the plant sequences. In the poplar cytosolic enzyme, four of the five cysteines (Cys 31, 66, 182, 188) are found in positions strictly conserved by comparison with the other plant sequences, whereas the cysteine in position 85 is replaced by a valine in the *Brassica* pMsrA. Interestingly, this residue has no equivalent in *E. coli* or *Bos taurus* MsrA which contain the four other cysteines in conserved positions (Lowther *et al.*, 2000; Boschi-Muller *et al.*, 2000). The five cysteine residues of pMsrA (Cys 46, 81, 100, 196 and 202) are in the same position than in cMsrA.

Methionine sulfoxide reductase activity

The two poplar MsrA isoforms were produced as recombinant proteins and purified to homogeneity. The methionine sulfoxide reductase activity of the two poplar MsrA isoforms was first measured by high pressure liquid chromatography (HPLC) with DTT as a donor, and both enzymes were found to be catalytically active (data not shown). This was confirmed using a spectrophotometric test by following the NADPH oxidation in the presence of two reducing systems, the Trx (NADPH/ NADPH thioredoxin reductase/ Trx) or glutaredoxin

(Grx) (NADPH/ glutathione reductase/ reduced glutathione/ Grx) systems. The Grx system was inefficient to reduce both WT MsrA (data not shown). Table I presents the kinetic parameters of both enzymes obtained in the presence of two cytosolic poplar Trx (Trx h1 and Trx h3). The affinities of the two isoforms for Trx or L Met-*R,S*-SO are nearly identical and apparent K_m values are respectively around 15 to 18 μM and 200 to 400 μM . The catalytic efficiency, expressed as $k_{\text{cat}}/K_{\text{MetSO}}$, was around 3 fold higher at pH 8.0 for cMsrA vs pMsrA. Given the high sequence identity between the two enzymes, the difference in specific activity between the two enzymes is a bit surprising. It could result either from a dissymmetry in the pH optimum of the two isoforms or from the distorting of the active site or from a lower efficiency of the cytosolic Trx used here with the plastidial enzyme, despite an apparent similar affinity. In order to discriminate between these possibilities, we used DTT as a donor instead of Trx in a direct determination of either MetSO or Met content by NMR. The concentration of these two species was obtained from the intensity of the resonance signals at 2.15 ppm and 2.65 ppm corresponding to the Met methyl resonance and the MetSO methyl resonance, respectively. As illustrated in Figure 2, addition of either cytosolic or plastidial MsrA results in a rapid decrease of the MetSO concentration (Figure 2A) concomitant with the apparition of Met (Figure 2B). When analyzed at pH 8.5, cMsrA was also approximately 3 fold more active than the pMsrA, suggesting that the cytosolic Trx h1 is a poor donor for the pMsrA. In agreement with the known stereoselectivity of MsrA species, we observe that only the L-Met-*S*-SO is reduced by the pMsrA or cMsrA. This is shown by the diminution of only one half of the MetSO initial content after completion of the reaction.

In order to investigate the catalytic mechanism of the two enzymes, the cysteine residues were independently mutated into serines. As cMsrA possesses a higher catalytic turnover in the coupled assay, the mutations of the five cysteines have been performed preferentially on this protein. In addition, the three cysteines presumed to be involved in the catalytic mechanism were also mutated in pMsrA. Only cMsrA C66S and C85S mutants retain activity with Trx as reductant (data not shown). The mutation of Cys 31, the conserved cysteine in all MsrA, and of Cys 182 and 188, the two C-terminal cysteines, completely abolished the Trx-dependent regeneration of the enzyme. These results suggest that Cys 66 and 85 are not involved in catalysis in contrast to Cys 31, 182 and 188. In agreement with these results, the pMsrA C46S, C196S and C202S mutants are inactive in the Trx-dependent assay (data not shown). The two mutants cMsrA C31S and pMsrA C46S were also found to be totally inactive in the presence of DTT in the NMR assay (Figure 2). To determine the sequence of events involving these three cysteines in methionine sulfoxide reduction, the

stoichiometry of the reaction was measured by following the methionine formed at a fixed concentration of reduced MsrA without any other reductant using HPLC. In the hypothesis of a mechanism similar to the one of *E. coli* MsrA, the stoichiometry is assumed to be two moles of methionine formed per mole of enzyme for cMsrA WT enzyme, cMsrA C66S and cMsrA C85S, only one for cMsrA C182S and C188S and none for the C31S mutant. Table II shows the results obtained with the poplar enzymes. The WT cMsrA and pMsrA present a stoichiometry near 2 as expected based on the presumed catalytic mechanism. The cMsrA C66S and C85S mutants reduce only 1.4 moles of Met per mole enzyme instead of the 2 expected presumably because part of these enzymes was in an oxidized form. The cMsrA C31S mutant is totally inactive as it reduces 0 moles of Met per mole enzyme, whereas the cMsrA C182S and C188S mutants possess a stoichiometry of 1.16 and 1.68 respectively instead of the expected value of 1. From these data, Cys 31 is the catalytic cysteine (CysA in figure 0) but whether Cys 182 and Cys 188 are both involved in the Trx dependent regeneration is not clear. In order to gain additional information about the involvement of the Cys182 and Cys188 in catalysis, the thiol content of each recombinant protein was estimated after reduction in the presence or absence of an excess of L Met-*R,S*-SO (Table III). For the pMsrA WT, C46S, C196S and C202S mutants, the decrease in free thiol groups matches well the theoretical values assuming an attack of Cys46 (CysA) by MetSO to form a sulfenic acid which is then reduced by disulfide bonding with Cys196 (CysB), the resulting disulfide bond being finally reduced by Cys202 (CysC). For the cMsrA mutants, the results also essentially agree with the postulated mechanism within the incertitude inherent to thiol measurement.

Structure solution, quality of the model and overall structure of pMsrA

Crystallisation trials were performed for both chloroplastic and cytosolic MsrA, but crystals of sufficient dimension for X-Ray analysis were obtained only for the pMsrA form. The trigonal crystals (space group P3₁) contain one molecule per asymmetric unit and 45% of solvent (Table IV and V). The structure was solved by molecular replacement and refined to 1.7Å resolution with final R- and free-R-factors of 19.5 and 20.1 %, respectively. No electron density was observed upstream from Pro22 in the N-terminal part. The missing residues ¹Met-Asp²¹ are very disordered and probably situated in the large solvent cavity observed in the crystal packing.

The catalytic Cys46 (CysA) and the regeneration Cys196 (CysB) and Cys202 (CysC) clearly show extra-densities on their sulfur atoms that were unambiguously modelled as bonded β -mercaptoethanols, present in the crystallisation solution (figure X). Cys81 also possesses an extra-density, however its weaker weight and smallest size have been interpreted as a sulfenic acid. Surprisingly, Cys100, the most exposed cysteine to the solvent, was observed in its reduced form.

As expected from the sequence identity, the poplar pMsrA model possesses the same single domain than the *E. coli* and the bovine MsrAs (respective PDB entries: 1FF3, Tete-Favier *et al.*, 2000, and 1FVA, Lowther *et al.*, 2000). C α atoms of these cores (figure X) can be superimposed with root mean square distances (rmsd) of about 0.8 Å. On the contrary, major differences concern the N- and C-terminal ends, the latter being observed for the first time as a small structured and stabilised domain instead of a long rectilinear coil described in the *E. coli* and bovine MsrA structures.

pMsrA N-terminal end

The long N-terminal ends of the *E. coli* MsrA (residue 1 to 41) and of the bovine MsrA (residues 28 to 62) coil up around the core of the domain. In the pMsrA structure, the positions of the N-terminal residues observed in the electron density (Pro22 to Gly36) strongly differ, although they still form an extended coil (Figure X). These different positions of the N-terminal ends seem to arise from the sequence of the loop at the entrance of the first β -strand, which contains two proline residues (³³Pro-Ala-Pro-Gly³⁶) in the poplar enzyme, instead of one in the bovine (⁵⁹Phe-Pro-Glu-Gly⁶²) and the *E. coli* (³⁸Val-Pro-Asp-Gly⁴¹) MsrA sequences. In the pMsrA structure, the N-terminal coil is stabilised against the core of the enzyme by several hydrogen bonds, between : the Gln26 side chain and the Gly70 main chain; the Gly27 and Lys168 main chains; the Asp29, Asp31 and Arg92 side chains; and finally the Ala34 main chain with the Gln94 side chain. Furthermore, Pro35 and the aromatic cycle of Phe39 are stacked together in an hydrophobic interaction.

The new position of the N-terminal coil observed in the poplar plastidic MsrA cannot be proposed as common to all plant MsrAs. Indeed, *Lycopersicon esculentum*, *Fragaria ananassa*, and the poplar cytosolic MsrAs possess shortest N-terminal sequences. Furthermore, the two proline residues observed in pMsrA are not conserved in all plant

sequences, as well as the amino acids quoted to be involved through their side chains in the stabilisation of the poplar N-terminal coil.

pMsrA C-terminal end

From the previously known MsrA structures, the C-terminal end seemed to be an extended coil without tertiary organisation. The ¹⁹³Asn-Ala²¹¹ end of the *E. coli* MsrA was observed in only one monomer among three in the asymmetric unit, leading to conclude to its flexibility. Despite the presence of an intermolecular disulfide bridge involving Cys206 (CysC) that could have forced the C-terminal end to adopt an unlikely conformation, it is surprising to observe a roughly similar position of the corresponding ²¹³Asp-Pro²²⁸ C-terminal end in the bovine MsrA structure.

On the contrary, in the pMsrA model, the ¹⁸²Lys-Gly²⁰⁴ C-terminal end consists of a coil that runs first parallel to the α -helix H1 and then, after a turn, antiparallel to it (Figure X). Numerous hydrogen bonds are observed within this C-terminal part, and between the C-terminal part and the core of the enzyme. Three amino-acid residues, strictly-conserved in plant MsrA sequences, seem to play a key role in the global architecture of the now called C-terminal domain :

- Arg56 is located at the end of the α -helix H1. Its elongated side chain is hydrogen bonded with the main chain of Ser191 and Asp198, while its carbonyl group is hydrogen bonded with the main chain NH group of Gly195 (Figure Y).
- Lys194 is hydrogen bonded with the carbonyl group of Gln55, Val57 and Val60 via its N_Z.
- Gln190 contributes to the stabilisation of the domain via an intra-domain interaction between its elongated side-chain and the main chain of Arg201.

Furthermore, a water molecule that interacts with Gln190, Asp198, Pro199 and Arg56 fixes the cohesion of the domain (Figure Y).

Next to the superimposable cores of *E. coli*, bovine and poplar MsrAs, the main chains of the three enzymes start to diverge from a position that can be considered as a hinge region. It consists of the sequence ¹⁸²Lys-Gly-Gly¹⁸⁴ in the poplar MsrA, while it is ¹⁹²Lys-Asn-Pro¹⁹⁴ in the *E. coli* MsrA and ²¹²Lys-Asp-Pro²¹⁴ in the *B. Taurus* sequence. The lack of the proline and the presence of two glycine residues in pMsrA strongly modify the torsion constraints in this loop.

Active site architecture and positions of the cysteinyl residues

The active site of pMsrA is a large and negatively charged open cavity which gives high accessibility to the catalytic cysteine Cys46 (CysA) (Figure Z), included in the GCFW[G/C/S] footprint. The side chains of all of the residues in the active site are completely superimposable with those of the *E. coli* and bovine MsrAs.

Sequence alignments and biochemical studies of the poplar MsrAs concluded to a catalytic mechanism that involves three cysteine residues, namely Cys46 (CysA), Cys196 (CysB) and Cys202 (CysC). Two successive intramolecular disulfide bridges would be formed during the catalysis for the regeneration of the Cys46 residue. Cys196 would attack the sulfenic acid intermediate of Cys46, while Cys202 would form the consecutive bridge with Cys196. In spite of a more structured and compact C-terminal end, it appears clearly in the pMsrA structure that neither Cys196 nor Cys202 show distances from Cys46 compatible with the formation of a disulfide bridge if no conformational change occurs. Distances between the S atoms of the five cysteine residues present in the pMsrA sequence have been reported in the table VI. The narrowest distance (7.2 Å) is measured between Cys46 and Cys202 while Cys196 is 18 Å far from the catalytic residue. Despite the observed chemical modifications of Cys46, Cys81, Cys196 and Cys202, the distances were measured considering that the current S_γ positions would be unchanged in an hypothetical structure with five reduced cysteine residues.

Discussion

Most of the available data concerning plant MsrA are devoted essentially to expression studies, but unlike in other organisms, little is known about their catalytic mechanism and structural properties (Sadanandom *et al.*, 2000 ?). This paper fills the gap in knowledge concerning the plant enzymes by providing site-directed mutagenesis data together with a first tridimensional structure of a plant MsrA and a catalytic mechanism for poplar MsrA.

Catalytic mechanism of poplar MsrA

Using site-directed mutagenesis, all the five cysteines of cMsrA and the presupposed essential cysteines of pMsrA have been mutated into serines. All the WT and mutated recombinant enzymes are able to reduce MetSO with DTT as a reductant except the cMsrA C31S and pMsrA C46S indicating that these cysteines are the catalytic ones (CysA, see figure 0). Moreover, the Trx dependent regeneration was abolished for cMsrA C182S and C188S and unaffected for the cMsrA C66S and C85S mutated proteins suggesting that C66 and C85 do not participate to catalysis whereas the two C-terminal cysteines are involved in the cysteine sulfenic acid reduction of C31. The stoichiometry of the reaction was checked for each recombinant proteins. The results confirm previous observations but do not permit actually to ascertain definitively the involvement of C182 and C188 in the Trx dependent reduction. Whether these two cysteines are implicated to form two successive disulfide bridges as for the *E. coli* and bovine enzymes was also assessed by measuring the decrease in free thiol groups of each recombinant protein after MetSO treatment. The data obtained from this experiment confirm with no doubt that C31 (C46 for pMsrA) is the catalytic cysteine CysA (figure 0) which is reduced after attack of the sulfenic acid intermediates by C182 (C196) forming a first disulfide bridge CysA-CysB. This disulfide is subsequently attacked by C188 (C202) forming a second disulfide bridge CysB-CysC between C182 and C188 (C196 and C202) which will be reduced by Trx but not by Grx. Why Grx is not able to reduce this disulfide is not clear actually. Whether the redox potential of the C182-C188 disulfide is too low to be reduced by Grx or whether the interaction could be prevented by steric hindrance or by unadapted surface protein recognition needs to be addressed. Nevertheless, two independent observations are in the favour of a possible Grx dependent regeneration of MsrA in other organisms. First, the growth on MetSO of a methionine auxotroph Trx A⁻ *E. coli* strain is restored by Grx 1 overexpression (Stewart *et al.*, 1998). Second, a coding sequence,

found in the red algae *Gracilaria gracilis* (accession number AAD43253), consists of two Grx modules fused with a MsrA module. This module is highly similar to other plant MsrA except for the absence of CysB, the cysteine equivalent to C182 in the poplar cMsrA. Whether this protein uses a different catalytic mechanism and is reduced by the Grx modules in the presence of glutathione is not known at present.

To gain insight into the interaction between Trx and MsrA, 3D structures of each partner must be resolved at least independently or in complex. Such attempts for linking covalently the two proteins are under investigation. Some heterodimers are observed on non-reducing SDS-PAGE when mixing MsrA and a monocysteine Trx but the amount is too low to isolate the complex (data not shown).

Structural comparison to other MsrA

Two MsrA structures from *E. coli* and *B. taurus* are currently available (PDB entries: 1FF3, Tete-Favier *et al.*, 2000 and 1FVA, Lowther *et al.*, 2000). The amino acid sequences of these two enzymes are 57% homologous and as a consequence their three-dimensional crystallographic structures present extensive homologies. However, in both structures but more evidently in the *E. coli* structure, the cysteine residue CysB is too far from the catalytic cysteine CysA to accommodate for the formation of the first disulfide bridge. Recent structural data obtained from NMR experiment on the *Erwinia chrysanthemi* MsrA, which gives a more dynamic picture of the protein, have confirmed that the cysteinyl side chains are indeed not properly located for the formation of the necessary disulfide bridges (Beraud *et al.*, 2002). As a consequence, for both enzymes it has been postulated that important conformational rearrangements are needed for the Trx-mediated regeneration of these enzymes. In connection with these existing data it is obviously of interest to obtain the structure of an additional MsrA.

The structure of the pMsrA from poplar presented here is rather similar to the ones described for the bacterial and mammalian enzymes. All enzymes share the same fold and the catalytic cysteine of the active site is in a similar environment. On the other hand, the orientation and the amino acid composition of the C-terminal part that contains the two additional cysteines implicated in the regeneration process is radically different from the *E. coli* and *B. taurus* MsrA. Indeed, the spacing between the two C-terminal located cysteinyl residues is 5 amino acids for poplar pMsrA instead of 7 or 8 amino acids for the mammalian and bacterial enzymes respectively. Moreover, the high content in glycines between these two

cysteines is not present in the poplar enzyme. The C-terminal end of pMsrA is highly organized in a small domain with many hydrogen bonds connecting not only the two parts of the domain but also the domain to the core of the enzyme. However as in the other MsrA, the cysteines are in positions that do not allow for the formation of any disulfide bridge. The C-terminal end are poorly structured in the two other models known. Due to the positions of the monomers in the crystal (at the proximity of two symmetry-related monomers), it is likely that the conformation of the domain is influenced by the packing of the molecules. However, the intermolecular contacts seem very weaker than the intramolecular. The question of the regeneration of the catalytic cysteine still stay open with this new structure. On our point of view the structure described in this paper could correspond to the tertiary organisation of the protein th emost propicious for the nucleophilic attack of the catalytic cysteine on a protein-bond methionine sulfoxyde.

Molecular modelling of disulfide bridges

The first investigation was to imagine an overall rotation of the C-terminal domain to form the first disulfide bridge between Cys46 and Cys196. The failure of this approach bring us to use molecular dynamic to simulate the potential structures with disulfide bridges between Cys46 and Cys196 frst and then between Cys196 and Cys202. The subjacent question was the possibility of forming all disulfide bridges without a complete destructuration of the C-terminal domain.

It appears clear that the two structures modelized conserved the same global fold for the C-terminal domain (Figure W). Indeed most of the stabilizing interactions are conserved. Two amino-acid residues could play a key role in the necessary flexibility of the C-terminal domain. Ala192 located at the end of the coil parallel to the helix H1 redirect first the turn between the two part of the domain. Gly195 bring to Cys196 a large spectrum of torsion angles to positionne the main chain in the most favourable conformation to allow the disulfide bridge. These two residues are strictly conserved in the plant MsrA sequences.

The second new hypothesis that we could formulate from this molecular dynamic simulation concern the potential flexibility of the conserved loop including the catalytic Cys46. Indeed, Gly45 and Gly49 of the GCFWG footprint could allow a conformational change of the loop to bring Cys 46 closer to two cysteine of regeneration. In the minimized model simulating the first bridge Cys46 move from its initial position by 8 Å and this conformational change is accompanied by a little displacement of the helix H1. The molecular dynamic positionne

Cys46 in a disallowed region of the ramachandran plot ($\phi = 57^\circ$; $\psi = -96^\circ$). However, it is interesting to note that these unfavourable dihedral angles have already been described for a cysteine residue in the crystal structure of carbamoyl phosphate synthetase (Cys269 $\phi = 59^\circ$; $\psi = -96^\circ$) (Thoden *et al.*, 1999). This cysteine is found like Cys46 in a so called “nucleophile elbow”. More generally, the propensities of cysteine residues to be in disallowed region is known to be higher than the other excepted for serine residues (Debnath & Chakrabarti, 2002). Moreover, cysteine residues in disallowed regions are statistically found close to an aromatic one, this is the case in the footprint GCFWG (Debnath & Chakrabarti, 2002).

The goal of this molecular modelling work was not to find the universal mechanism of regeneration of the catalytic cysteine in plant MsrA. It just demonstrate that the disulfide bridges could be formed without the entire destructure of the C-terminal domain described in this pMsrA X-ray structure and open a new door in the discussion about the regeneration of the catalytic cysteine with the potential conformational movements in the core of the enzyme. X-ray structures of intermediates with disulfide bridges should answer to our questions. It is true that without biochemical data, the analysis of the X-ray structure modelled could be interpreted with Cys202 (7 Å far from Cys46) as the first regeneration cysteine.

Conclusion

The data generated here suggest that MsrA enzymes have kept a similar structure and mode of catalysis along evolution. In several cysteine requiring enzymes such as thioredoxin reductase of glutathione peroxidase, the mammalian catalysts have been altered into more complex enzymes that contain selenocysteines. The presence of this residue is generally correlated with a much higher specific activity of the enzyme. Plants are generally recognised as lacking selenocysteines with the notable exception of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* which does contain this unusual amino acid in many catalysts (Novoselov *et al.*, 2002). Analysis of the tridimensional structures of thioredoxin reductases indicates that the plant enzyme (*Arabidopsis thaliana*) is similar to the bacterial enzyme (*E. coli*) but not to the mammalian enzyme. Using this grid of evaluation, plants appear to be closer to bacteria than to mammals. Analysis of the MsrA structures leads to the conclusion that all models of this protein have remained relatively constant along the lines of evolution. It could be correlated to the presence of alternate catalysts as MsrB which seem to have varied more along evolution. The need for several isoforms of MsrA in cytosol of plants is not yet completely clear. The major sources for ROS in plants are likely to be the peroxisomes, chloroplasts and

to a lesser extent mitochondria, but few enzymatic systems generate those oxidants in the cytosol. In connection with this observation, it is puzzling that the cytosolic enzyme exhibits a higher catalytic turnover than the plastidial enzyme. It remains to be determined whether this could be compensated by a higher level of expression of the plastidial isoform. Another question to be investigated is whether those enzymes are able to reduce peptide bound MetSO and whether they display a preference for substrates *in vivo* when using oxidized proteins as substrates instead of free L-MetSO.

Materials and Methods

Cloning and site-directed mutagenesis

The nucleotidic sequences encoding cMsrA and pMsrA were cloned by PCR into the expression plasmid pET-3d using as templates respectively a root cDNA library of *Populus x interamericana* (clone Beaupré) (Kohler *et al.*, in press) and a leaf cDNA library of *Populus tremula x tremuloides* (Larsson *et al.*, 1997). Both reactions also contained Pfu DNA polymerase (Promega) and the forward and reverse MsrA oligonucleotides described in Table VII. In the pMsrA cloning, a codon for alanine was inserted downstream the methionine closest to the putative cleavage site and the corresponding N-terminal amino acid sequence starts thus with MANIL. Various monocysteinic mutations were introduced in the cytosolic MsrA (cMsrA C31S, C66S, C85S, C182S, C188S) and plastidic MsrA (pMsrA C46S, C196S, C202S) using two complementary mutagenic primers per mutation (Table VII) following a procedure previously described (Jacquot *et al.*, 1997). The introduction of the mutation in the cDNA sequence was verified by sequencing.

Mutagenesis, expression and purification of the recombinant proteins

The recombinant plasmids were used to transform the BL21(DE3) *E. coli* strain which also contains the helper plasmid pSBET (Schenk *et al.*, 1995). Cultures of 5 L of a kanamycin (50 µg/mL) and ampicillin (50 µg/mL) resistant colony were grown at 37 °C and induced by 100 µM IPTG in the exponential phase. Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in buffer A (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) containing 20 mM DTT and lysed by sonication. The soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation. For the pMsrA WT, the recombinant protein was in the soluble fraction and precipitated between 0 and 50% of ammonium sulfate. All the other recombinant proteins were produced essentially as inclusion bodies with only a small soluble part when cultures were grown at 30°C without induction. When needed, the insoluble fraction was resuspended in buffer A in the presence of 20 mM DTT and 8 M urea and then dialyzed against 1 L of buffer A containing 500 mM urea for at least 5 hours at 5°C (all subsequent steps were realized at that temperature). The extract was centrifuged and the soluble fraction dialyzed against 1 L of buffer A for 5 hours and centrifuged. The resulting soluble fraction was purified by exclusion size chromatography onto an ACA 44 column equilibrated in buffer A.

The fractions of interest were pooled, dialyzed to remove salts, and separated by DEAE Sephacel chromatography. The recombinant proteins were eluted around 100 mM NaCl using a linear gradient from 0 to 400 mM NaCl. The purified fractions were dialyzed to remove salts, adjusted to 1.6 M NaCl and applied to a Phenyl Sepharose column equilibrated with buffer B (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1.6 M NaCl). The recombinant proteins were eluted by a decreasing gradient between 1.6 and 0 M NaCl, dialyzed and concentrated. The purity of the proteins was assessed using 15% SDS-PAGE. The protein concentration was estimated spectrophotometrically using a molar extinction coefficient of $25700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cMsrA and pMsrA. The proteins were stored at -30°C in buffer A either in the presence of 14 mM β -mercaptoethanol or 25 to 30 mM DTT.

Crystallization, X-ray data collection, structure determination and refinement

Crystallisation of pMsrA was achieved by hanging-drop vapour-diffusion method in Linbro multiwell tissue-culture plates, at 277 K. The purified enzyme was concentrated to 40 mg/ml in a solution containing 30 mM Tris-HCl, pH 7.0, 14 mM β -mercaptoethanol, and 1 mM EDTA. The crystals were grown from 4 μL droplets composed of equal volumes of the protein solution and of the precipitant solution (10% W/V polyethyleneglycol 6000, 2 M NaCl), and equilibrated against 700 μL reservoirs. Long needles (1 mm) with a thin triangular cross-section (0.03 mm) appeared after 6 weeks. Crystals were briefly soaked in a cryoprotectant solution (10 % V/V methylpentanediol mixed with the precipitant solution) and flash-frozen by fast immersion in nitrogen gas stream at 100 K, maintained during the X-Ray diffraction experiments performed on beamline BM30A (FIP) at the ESRF.

Crystals belong to space group $P3_1$ with unit cell parameters $a = b = 68.6 \text{ \AA}$, $c = 40.7 \text{ \AA}$ and contain one monomer per asymmetric unit. Using a wavelength of 1.009 \AA , one native data set was collected up to 1.7 \AA resolution, and processed using DENZO (Otwinowski and Minor, 1997). Further details are given in Table IV.

The structure was solved using the molecular replacement method implemented in Molrep (Vagin and Teplyakov, 1997) of the CCP4 program suite. The initial model used in Molrep consisted of the core ($^{41}\text{Gly-Pro}^{194}$) of the *E. coli* MsrA structure (PDB entry: 1FF3). The molecular replacement solution was submitted to the Molrep mode and then to the warpNtrace mode of the Arp/wArp5.1 automatic model building and refinement program (Perrakis *et al.*, 1999). It produced a model that contained 4 polypeptide chains representing 164 amino acids, with R and free-R factors of 20.6 and 25.8 %, respectively. Manual

corrections (in particular, building of the missing residues) and automatic CNS refinement (Brünger *et al.*, 1998) of the model were then performed in an iterative procedure, until the model fulfilled satisfactory criteria. The final structure corresponds to 183 amino acids among 204 (residues ²²Pro-Gly²⁰⁴), 183 water molecules, with R = 19.5 %, R_{free} = 20.1%. Further details are given in Table V.

Thiol content titration

250 µg of the recombinant proteins were treated either with 50 mM DTT or 50 mM L-MetSO during one hour at room temperature. The proteins were then precipitated on ice by addition of one volume of 20% trichloroacetic acid (TCA) for 30 minutes. The proteins were pelleted by centrifugation and washed twice with 2% TCA. The pellets were resuspended in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA and 2% SDS. The concentration of the proteins were determined spectrophotometrically at this stage and then DTNB was added to a final concentration of 100 µM and the absorbance was read at 412 nm one hour later. The thiol content was determined using a molar extinction coefficient of 13600 M⁻¹ cm⁻¹ for TNB⁻.

Enzymatic assays

HPLC detection and measurement of MsrA activity in the presence of DTT

The reaction mixture of 1 mL contained 10 mM DTT or various Trx amounts, 5 µM pMsrA and 100 mM L-MetSO in buffer C. After 1, 2, 3 or 4 minutes, 2.5 µL of trifluoroacetic acid (TFA) were added to aliquots of 250 µL and the methionine formed was measured by HPLC on Sephasil C18 column (Boschi-Muller *et al.*, 2000).

Thioredoxin dependent methionine sulfoxide reductase activity

The activity of cMsrA and pMsrA in the presence of Trx was measured by following the NADPH oxidation at 340 nm in the presence of the Trx or Grx system. A 500 µL cuvette is constituted of 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 µM NADPH, 2 µM *Arabidopsis thaliana* NADPH thioredoxin reductase, various concentrations of cytosolic thioredoxins and 10 mM L-MetSO. After one minute of incubation, MsrA was added to the reaction mixture. Trx h1 and h3 and Grx from poplar were purified as described previously (Behm and Jacquot, 1999, Gelhaye *et al.*, in press, Rouhier *et al.*, 2002). The reaction was carried out at 30°C with

a Cary 50 spectrophotometer. The catalytic parameters for Trx or MetSO were determined at saturating concentrations of the other enzyme substrate.

Stoichiometry of methionine formation in the absence of reductants

The different proteins were reduced by 50 mM DTT and dialyzed twice against 1 L of 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA (buffer C). A typical 200 μ L reaction mixture containing 100 to 400 μ M proteins and 100 mM L MetSO in buffer C was incubated at room temperature for 10 minutes. 100 μ L were then injected onto a Sephasil C18 column to quantify the concentration of Met formed (Boschi-Muller *et al.*, 2000).

NMR determination of activity

The reductase activity was determined by monitoring the reduction of MetSO to Met by MsrA using DTT as reducing agent. The assay conditions were 100 mM phosphate buffer, 50 mM DTT, 20 mM L-MetR,S-SO at pH 8.5 in 90%/10% H₂O/D₂O. L-alanine (10 mM) was used for internal concentration calibration. The enzyme was added directly in the NMR cell and careful homogenization of the sample was performed just before recording. NMR spectra were recorded with 8 scans at 27 °C every 79 seconds on Varian Inova 400 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance (1H, 13C, 15N) probe including shielded z-gradients. Data were processed using FELIX 97 (Accelrys).

Molecular dynamic simulations.

This approach is an adaptation of the standard homology-modelling procedure described by Greer (Greer, 1990). The disulfide bridge between Cys46 and Cys196 was imposed in the molecular dynamic procedure to generate a model of the first regeneration step on which was imposed the formation of the second bridge (between Cys 196 and Cys 202). All refinement steps were performed assuming a pH of 7.0 and standard pKa values. The completion of the molecular system by hydrogen atoms was achieved and the molecular dynamic procedure was applied using the program X-PLOR version 3.11. A 13-Å cut-off distance for non-covalent interactions was used throughout and a distance-dependent dielectric constant $\epsilon = r(\text{Å})$ was selected to compensate for the absence of explicit water molecules within the model. The slow-cooling procedure of X-PLOR was used with time step of 0.5 fs. The simulation was started at 1000 K and the temperature decreased by 25 K in

every step, until 300 K. Following the slow-cooling procedure, a last energy-minimization step was carried out with the same parameter values as those described.

The quality and the stereochemical properties of the models were assessed with the program PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

References

- Behm,M. and Jacquot,J.P. (2000) Isolation and characterization of thioredoxin h from poplar xylem. *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 363-369.
- Beraud,S., Bersch,B., Brutscher,B., Gans,P., Barras,F. and 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.
- Boschi-Muller,S., Azza,S., Sanglier-Cianferani,S., Talfournier,F., Van Dorsselaar,A. and 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.
- Boschi-Muller,S., Azza,S. and Branlant,G. (2000) *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**, 2272-2279.
- Brot,N., Weissbach,L., Werth,J. and Weissbach,H. (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2155-2158.
- Brot,N. and Weissbach,H. (2000) Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers*, **55**, 288-296.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **54**, 905-921.
- Ciorba,M.A., Heinemann,S.H., Weissbach,H., Brot,N. and Hoshi,T. (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9932-9937.

Cooper,C.E., Patel,R.P., Brookes,P.S. and Darley-Usmar,V.M. (2002) Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 489-492.

Debnath & Chakrabarti. (2002). On residues in the disallowed region of the Ramachandran map. *Biopolymers.*, **63**, 195-206

Dhandayuthapani,S., Blaylock,M.W., Bebear,C.M., Rasmussen,W.G. and Baseman,J.B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.*, **183**, 5645-5650.

Etienne,F., Spector,D., Brot,N. and Weissbach, H. (2003) A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 378-382.

Gelhaye,E., Rouhier,N., Vlamis-Gardikas,A., Girardet,J.M., Sautière,P.E., Sauzet,M., Martin,F., Jacquot,J.P. Identification and characterization of a third thioredoxin h in poplar. *Plant Physiol. Biochem.*, *In press*

Gonzalez-Porque,P., Baldesten,A. and Reichard, P. (1970) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2371-2374.

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**, 48915-48920.

Gustavsson,N., Kokke,B.P., Harndahl,U., Silow,M., Bechtold,U., Poghosyan,Z., Murphy,D., Boelens,W.C. and Sundby,C. (2002) A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant J.*, **29**, 545-553.

Hassouni,M.E., Chambost,J.P., Expert,D., Van Gijsegem,F. and 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. USA*, **96**, 887-892.

Jacquot, J.P., Stein, M., Suzuki, A., Liottet, S., Sandoz, G. and Miginiac-Maslow, M. (1997) Residue Glu-91 of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxin is essential for electron transfer to ferredoxin-thioredoxin reductase. *FEBS Lett.*, **400**, 293-296.

Jung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T. and 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**, 91-94. (a supprimer ?)

Kohler, A., Delaruelle, C., Martin, D., Encelot, N. and Martin, F. (2003) The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. *FEBS Lett.*, *In press*

Kryukov, G.V., Kumar, R.A., Koc, A., Sun, Z. and Gladyshev, V.N. (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4245-4250.

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

Larsson, S., Bjorkbacka, H., Forsman, C., Samuelsson, G. and Olsson, O. (1997) Molecular cloning and biochemical characterization of carbonic anhydrase from *Populus tremula x tremuloides*. *Plant Mol. Biol.*, **34**, 583-592.

Levine, R.L., Moskovitz, J. and Stadtman, E.R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*, **50**, 301-307.

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

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

Moskovitz,J., Berlett,B.S., Poston,J.M. and Stadtman,E.R. (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9585-9589.

Moskovitz,J., Flescher,E., Berlett,B.S., Azare,J., Poston,J.M. and 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 USA*, **95**, 14071-14075.

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**, 14167-14172.

Novoselov,S.V., Rao,M., Onoshko,N.V., Zhi,H., Kryukov,G.V., Xiang,Y., Weeks,D.P., Hatfield,D.L. and Gladyshev,V.N. (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.*, **21**, 3681-3693.

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

Otwinowski,Z., and Minor,W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.

Perrakis,A., Morris,J.R. and Lamzin,V.S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 458-463.

Rouhier,N., Gelhaye,E., Sautiere,P.E. and Jacquot,J.P. (2002) Enhancement of poplar glutaredoxin expression by optimization of the cDNA sequence. *Protein Expr. Purif.*, **24**, 234-241.

- Russel,M. and Model,P. (1986) The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14997-15005.
- Sadanandom,A., Poghosyan,Z., Fairbairn,D.J. Murphy,D.J. (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **123**, 255-264.
- Saint-John,G., Brot,N., Ruan,J., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Weissbach,H. and 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. USA*, **98**, 9901-9906.
- Schenk,P.M., Baumann,S., Mattes,R. and Steinbiss,H.H. (1995) Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNA's. *Biotechniques*, **19**, 196-200.
- Sharov,V.S., Ferrington,D.A., Squier,T.C. and Schoneich,C. (1999) Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.*, **455**, 247-250.
- Spector,D., Etienne,F., Brot,N. and Weissbach,H. (2003) New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 284-289.
- Stadtman, E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 797-821.
- Stadtman,E.R., Moskovitz,J., Berlett,B.S. and Levine,R.L. (2002) Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell. Biochem.*, **234**, 3-9.

Stewart,E.J., Aslund,F. and Beckwith,J. (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.*, **17**, 5543-5550.

Storz,G. and Imlay,J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 188-194.

Tete-Favier,F., Cobessi,D., Boschi-Muller,S., Azza,S., Branlant,G. and Aubry,A. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold Des.*, **8**, 1167-1178.

Thoden,J.B., Rauschel,F.M., Wesenberg,G., Holden,H.M. (1999) Carbamoyl phosphate synthetase: closure of the B-domain as a result of nucleotide binding. *Biochemistry*. **38**(8), 2347-57.

Vagin,A., and Teplyakov,A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement., *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025.

Wizemann,T.M., Moskovitz,J., Pearce,B.J., Cundell,D., Arvidson,C.G., So,M., Weissbach,H., Brot,N. and Masure,H.R. (1996) Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 7985-7990.

Yao,Y., Yin,D., Jas,G.S., Kuczer,K., Williams,T.D., Schoneich,C. and Squier,T.C. (1996) Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, **35**, 2767-2787.

Figure legends

Fig. 0. The catalytic mechanism proposed for MsrA involves two or three cysteinyl residues (CysA, CysB, and possibly CysC). The first step consists of the attack of CysA onto the sulfur of the methionine sulfoxide, leading to a CysA-based sulfenic acid intermediate and the concomitant release of the reduced methionine. CysB attacks onto the CysA sulfenic acid to form a disulfide bridge between CysA and CysB. CysC then attacks this disulfide bond to liberate the reduced CysA and to form a disulfide bond CysB-CysC. This disulfide bond is reduced by a Trx/NADPH-Thioredoxin Reductase/NADPH system (I). If CysC is not present, Trx directly reduces the disulfide bridge CysA-CysB (II).

Fig. 1. Amino acid comparison of the two poplar MsrA with known MsrA sequences. The sequences were compared using ClustalW. The accession numbers (GenBank or MATDB) are as follow : *Populus tremula x tremuloides* pMsrA (Pt pMsrA) : xxxxx, *Arabidopsis thaliana* cMsrA (At cMsrA) : At5g61640, *Arabidopsis thaliana* pMsrA (At pMsrA) : At4g25130, *Brassica napus* pMsrA (Bn pMsrA) : P54151, *Populus tremula x tremuloides* cMsrA (Pt cMsrA) : xxxxx, *Escherichia coli* MsrA (Ec MsrA) : NP_418640, *Bos taurus* MsrA (Bs MsrA) : P54149. The stars represent strict amino acid identities.

Fig. 2. MetSO reductive activity of wild-type and mutant cytosolic (cMsrA) and plastidial (pMsrA) poplar sulfoxide methionine reductases. A) MetSO concentration evolution as a function of time; cMsrA (full circles), pMsrA (full squares), C31S mutant of pMsrA (open circles), C46S mutant of cMsrA (open squares). B) Met concentration evolution as a function of time; cMsrA (full circles), pMsrA (full squares), C31S mutant of cMsrA (open squares), C46S mutant of pMsrA (open circles). Reactions were recorded at 25 °C in the presence of 100 mM phosphate buffer with 50 mM DTT, 20 mM (L)Met(D,L)SO at pH 8.5. The enzyme concentrations were for cMsrA, pMsrA, C31S and C46S : 4.7 M, 6.1 M, 4.7 M and 4.9 M respectively. MetSO and Met concentrations were determined from the methyl peak intensity of the MetSO at 2.65 ppm and the Met at 2.15 ppm.

Fig. 3. C_αtraces of the pMsrA (right) and *E. coli* MsrA (left) in the same orientation. The N-terminal ends and C-terminal ends are colored in red in blue respectively. In cyan, the C-

terminal observed in the bovine MsrA is superimposed to the *E.coli* structure. CysA, CysB and CysC are drawn in balls and sticks in each model.

Fig. 4. Distances between catalytic cysteines in the p-MsrA model. The part of the core enzyme is colored in yellow and the C-terminal end in blue.

Fig. 5. Stereoscopic view of the hydrogen bonded network for the stabilization of the C-terminal end in the p-MsrA model.

Fig. 6. Molecular surface of the p-MsrA model showing the accessibility of the catalytic residues. The color code is the same as figure 4 and 5 for the C α trace of p-MsrA.

Fig. 7. 3Fo-2Fc electron density maps contoured at 1.2 σ in the Cys46 (A) region. Cys46 are bonded to a β -mercaptoethanol molecule via a disulfide bridge.

Fig. 8. (a): Stereoscopic view of the superimposition of the X-Ray model of p-MsrA (yellow) and molecular dynamic CysA-CysB model (blue) in the C-terminal region.

(b) Stereoscopic view of the superimposition of the molecular dynamic CysA-CysB model (blue) and molecular dynamic CysB-CysC model (orange) in the C-terminal region.

	K_{met} (μ M)	K_{Tix} (μ M)	K_{cys} (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_{cys} ($\times 10^3 M^{-1} s^{-1}$)	Vmax (μ moles NADPH ox/min/ μ moles protein)
cMsrA	15.2 ± 2.9	17.5 ± 3.2	383 ± 401	1.2	3.13	73 (1.55)
pMsrA	17.9 ± 8	n.d.	239 ± 33	0.29	1.2	17.22 (0.46)

Table 1. Catalytic parameters of pMsrA and cMsrA. These parameters were determined by following the NADPH oxidation in the presence of 10 mM L-Met-R,S-SO, poplar cytosolic Tix h1 and h3 as electron donors and 0.5 μ M cMsrA or 3 μ M pMsrA. The Km for Tix h1, Tix h3 and MetSO were measured at saturating concentration of the other substrate. n.d.: not determined.

	Stoichiometry
eMsrA wt	1.72 (2)
eMsrA C31S	0 (0)
eMsrA C66S	1.4 (2)
eMsrA C85S	1.41 (2)
eMsrA C182S	1.16 (1)
eMsrA C188S	1.68 (1)
pMsrA wt	1.8 (2)

Table II. Stoichiometry of Met formed in the absence of reductant. The results are expressed in mol Met formed /mol enzyme. In parenthesis, the theoretical ratio based on the catalytic mechanism of *E. coli*

	Number of free thiols without L-Met-R,S-SO	Number of free thiols with L-Met-R,S-SO	Decrease in free thiols
eMsrA wt	4.48 (5)	1.11 (2)	3.37 (3)
eMsrA C31S	3.9 (4)	3.7 (4)	0.2 (0)
eMsrA C66S	4.09 (4)	0.7 (1)	3.39 (3)
eMsrA C85S	3.9 (4)	0.4 (1)	3.5 (3)
eMsrA C182S	3.4 (4)	2.37 (3)	1.03 (1)
eMsrA C188S	3.85 (4)	1.5 (2)	2.35 (2)
pMsrA wt	4.25 (5)	1.33 (2)	2.92 (3)
pMsrA C46S	4.3 (4)	4.0 (4)	0.3 (0)
pMsrA C196S	3.5 (4)	2.4 (3)	1.1 (1)
pMsrA C202S	4.1 (4)	1.8 (2)	2.3 (2)

Table III. Thiol content of WT and mutants MsrA after treatment or not with L-Met-R,S-SO. In parenthesis, the theoretical content of thiols based on the catalytic mechanism of *E. coli* MsrA

Wavelength	1.009 Å (ESRF, BM130)
Temperature	100 K
Resolution	25.0-1.7 (1.74-1.70) Å
Number of measured reflections	114471
Number of independent reflections	23121
Completeness	98.2 (83.4) %
R_{sym}	4.8 (21.9) %
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$	8.6 (2.5)

Table IV. Statistics of X-ray diffraction data collection for the pMsrA crystals. Values in parenthesis refer to data in the highest resolution shell.

Resolution range [†] (Å)	25.0 – 1.7 (1.76 – 1.70)
No. of reflections used for R calculation [†]	21710 (1812)
No. of reflections used for R_{free} calculation [†]	1103 (84)
Data cutoff F_0 (F)	0.0
R value [†] (%)	19.5 (23.4)
R_{free} value [†] (%)	20.1 (23.4)
No. of non-hydrogen protein atoms	1478
No. of water molecules	183
Mean B-factor, protein main chain atoms (Å ²)	23.6
Mean B-factor, protein side chain atoms (Å ²)	25.2
Mean B-factor, solvent atoms (Å ²)	28.5
B-factor from the Wilson plot (Å ²)	27.6
Ramachandran plot:	
residues in most favoured regions (%)	92.7
residues in additionally allowed regions (%)	7.3
residues in generously allowed regions (%)	0
residues in disallowed regions (%)	0
Rms deviation from ideal geometry	
bond length (Å)	0.006
bond angle (°)	1.31
Rms deviation for isotropic thermal factor restraints (Å ²):	
Main-chain bond	1.53
Main-chain angle	1.82
Side-chain bond	2.65
Side-chain angle	

Table V. Refinement and model statistics. [†]Values indicated between parenthesis correspond to statistics in the outer resolution shell.

	Cys16	Cys81	Cys100	Cys196	Cys202
Cys16		10.0 Å	22.1 Å	18.9 Å	7.2 Å
Cys81			22.1 Å	27.5 Å	16.0 Å
Cys100				16.1 Å	22.8 Å
Cys196					15.8 Å
Cys202					

Table VI. Distances measured between the Sγ atoms of the five cysteine residues present in the pMsrA structure.

eMsrA forward	5' CCCC CCATGGC AACCAGCACCAAT 3'
eMsrA reverse	5' CCCC GGATCC TTAACCATAGCATCTAATAGG 3'
eMsrA C31S forward	5' GCTCAATTCGGAGCTGGAAGTTCTGGGGGTT 3'
eMsrA C31S reverse	5' AACCCCCAGAAACTTCCAGCTCCGAATTGAGC 3'
eMsrA C66S forward	5' ACTTACAAGCTGGTATCCACCAACACCACCAAC 3'
eMsrA C66S reverse	5' GTTGGTGGTGTGGTGGATACCAGCTTGTAAGT 3'
eMsrA C85S forward	5' TTTGACCCGGAAGTTTCCCATATACCAACCTC 3'
eMsrA C85S reverse	5' GAGGTTGGTATATGGGGAAACTTCCGGGTCAA 3'
eMsrA C182S forward	5' TCTGCTGAAAAAGGTTCCAATGACCCTATTAGA 3'
eMsrA C182S reverse	5' TCTAATAGGGTCATTGGAACCTTTTTCAGCAGA 3'
eMsrA C188S reverse	5' CCCC GGATCC TTAACCATAGCTTCTAATAGGGTCATTGCA 3'
pMsrA forward	5' CCCC CCATGGC TAAACATCCTTAGCAAACCTAGGC 3'
pMsrA reverse	5' CCCC GGATCC TTAGCCATAGCATCGGATTGGATC 3'
pMsrA C46S forward	5' TTTGGAGCTGGTCTTTTGGGGTGT 3'
pMsrA C46S reverse	5' AACACCCCAAAAAGAACCAGCTCCAAA 3'
pMsrA C196S forward	5' GCTGAGAAAGGATCCAATGATCCAATC 3'
pMsrA C196S reverse	5' GATTGGATCATTGGATCCTTTCTCAGC 3'
pMsrA C202S reverse	5' CCCC GGATCC TTAGCCATAGGATCGGATTGG 3'

Table VII. Cloning and mutagenic oligonucleotides. The *Nco*I and *Bam*HI restriction sites are underlined and the mutagenic bases in bold characters. The primer pMsrA forward allows us to integrate an alanine (codon GCT in bold) downstream the initial methionine.

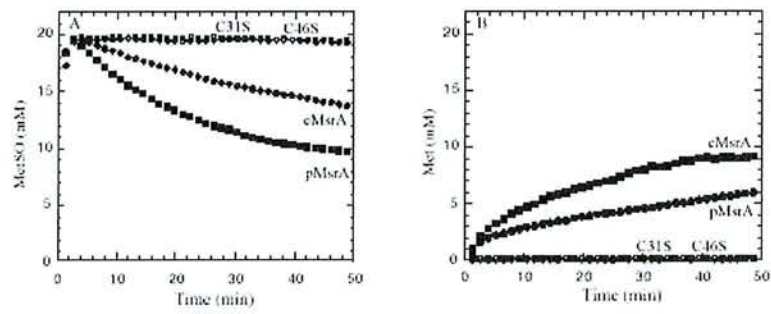


Figure 2

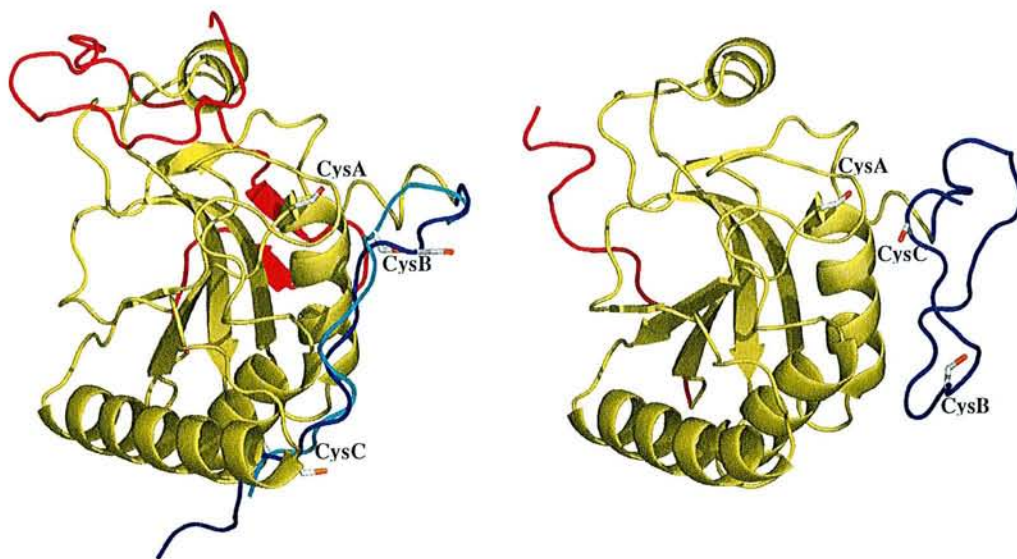


Figure 3

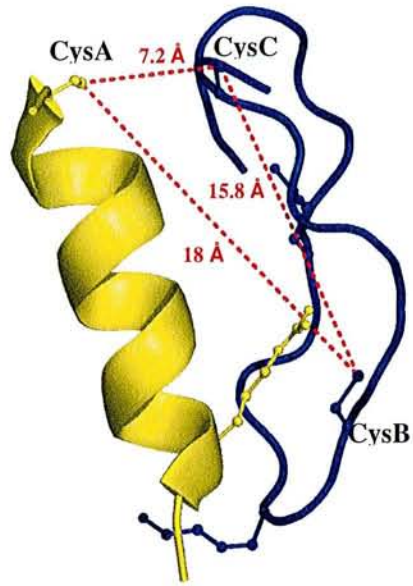


Figure 4

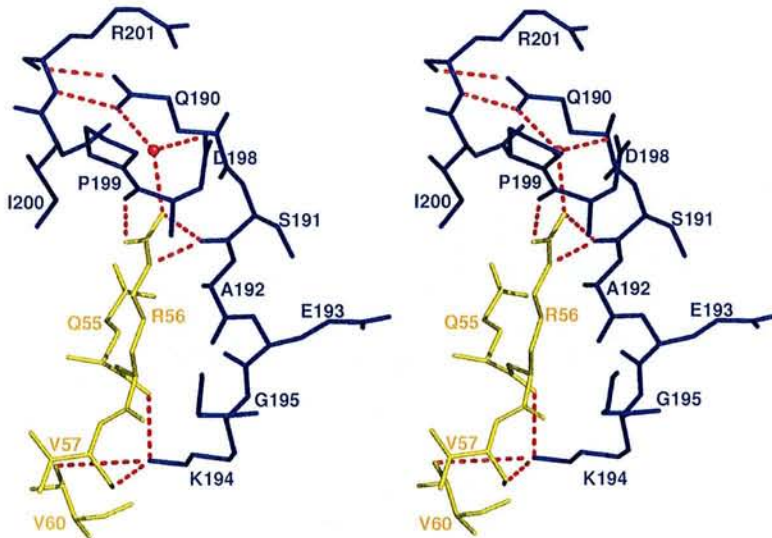


Figure 5

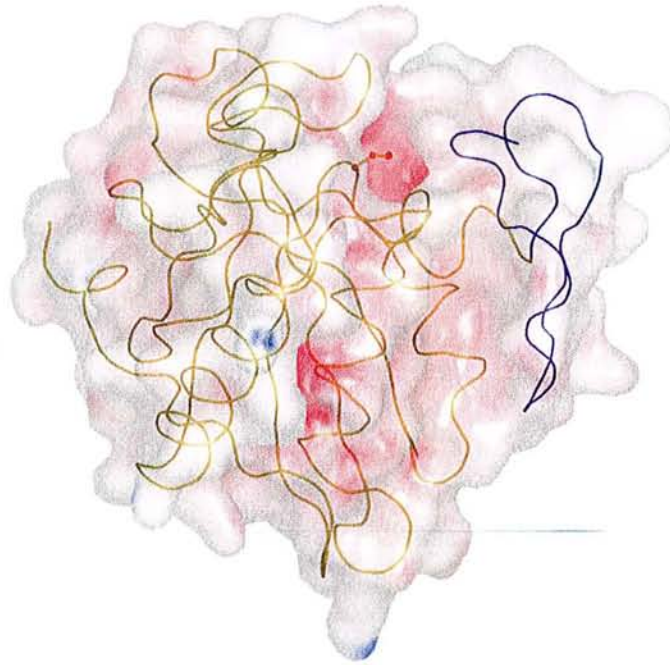


Figure 6

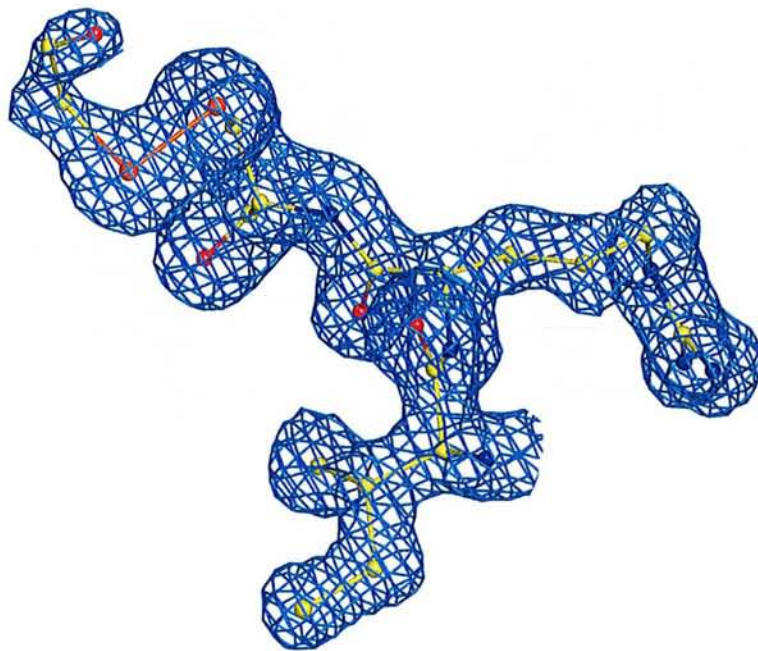


Figure 7

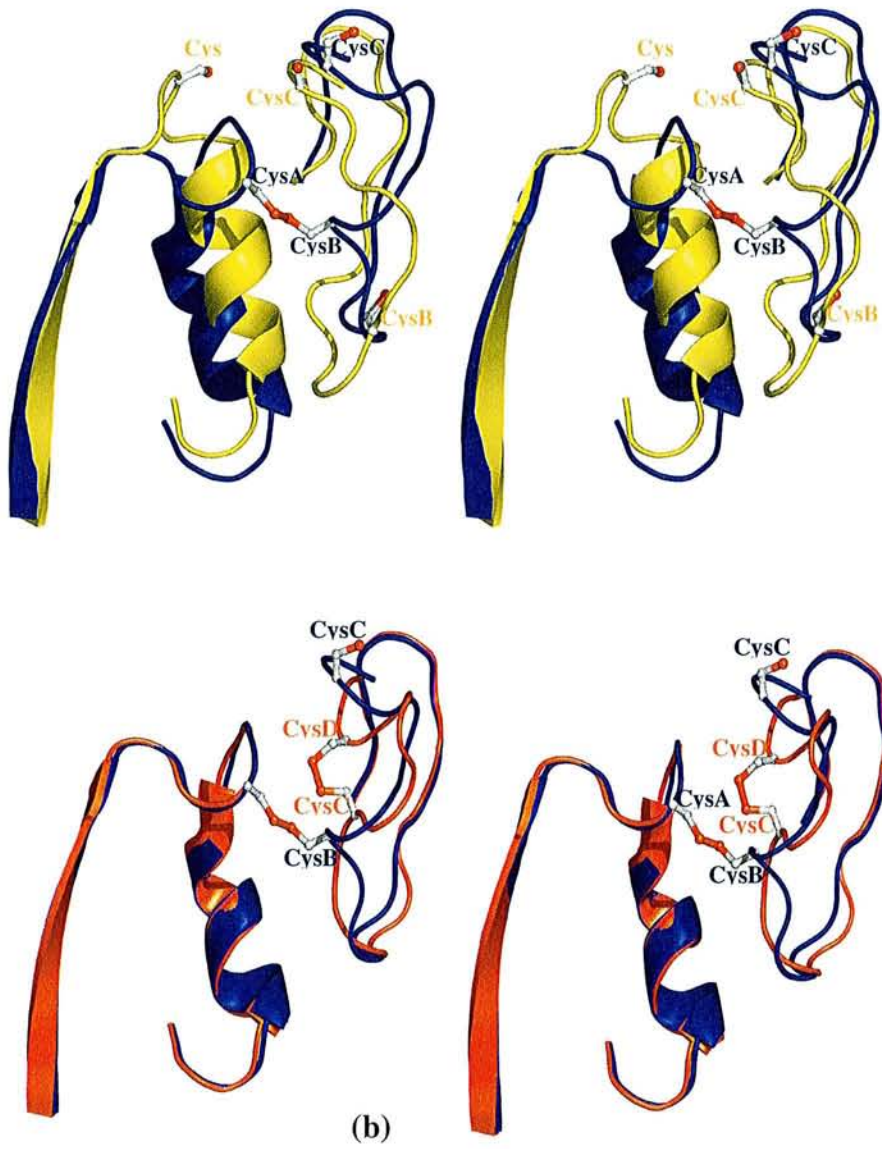


Figure 8

CHAPITRE B

LE SYSTEME RUBREDOXINE-NROR DE *C. acetobutylicum*

AVANT-PROPOS

Le second chapitre de ce manuscrit est principalement consacré aux premières études structurales d'un système d'oxydation du NADH impliquant une NADH-rubrédoxine oxydoréductase chez *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de biochimie des Gram+ du professeur H. Petitdemange (EA 3445 UHP Nancy), spécialiste des bactéries Gram-positives du genre *Clostridium*.

Les *Clostridia* sont des bactéries anaérobies strictes de forme allongée (figure1). Ce genre regroupe :

- des espèces productrices de toxines pathogènes (*Clostridium botulinum*, *C. difficile*, *C. tetani*, *C. perfringens*...)
- des espèces productrices de solvants (éthanol, acétone...) ou acides organiques via la fermentation de différentes sources de carbone (Keis *et al.*, 1995 ; Stackebrandt *et al.*, 1999).

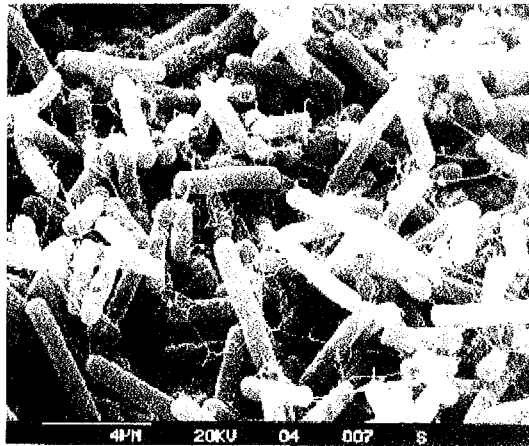


Figure 1 : Image en microscopie électronique d'une population de *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum a été isolée pour la première fois entre 1912 et 1914 et utilisée par C. Weizmann pour alimenter en acétone la fabrication de poudre à canon durant la première guerre mondiale (Jones *et al.*, 1986). Les processus pétrochimiques moins coûteux se substituent aux bactéries dans les années 50, mais la crise pétrolière de 1973 conduit à un renouveau dans l'utilisation des *Clostridia*. *C. acetobutylicum* devient alors le modèle d'étude du genre et son génome est aujourd'hui totalement séquencé (Nölling *et al.*, 2001).

Le professeur H. Pettdemange avait isolé en 1979 une flavoprotéine issue de la souche *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 et avait caractérisé son activité réductrice de la rubrédoxine, petite protéine soluble constituée d'un centre fer-soufre (Pettdemange *et al.*, 1979). Le gène codant cette NADH-rubrédoxine oxydoréductase (NROR) a été identifié et cloné dans son laboratoire par E. Guedon en 2001 (Guedon *et al.*, 2001). Trois activités NROR ont été décrites à ce jour chez *Desulfovibrio gigas* et *Pyrococcus furiosus* comme impliquées dans des voies de détoxification d'entités oxygénées (Chen *et al.*, 1993 ; Jenney *et al.*, 1999). De ce fait, la caractérisation biochimique et structurale de ce couple NROR / rubrédoxine s'insère pleinement dans la thématique d'étude des systèmes enzymatiques d'oxydo-réduction impliqués dans les réponses cellulaires au stress oxydatif du groupe biocristallographie. L'étude de ce système était très intéressante dans la mesure où aucun modèle de NROR n'était décrit à ce jour et la séquence primaire ne présentait aucune homologie avec des séquences de structure connue. Seuls avaient été identifiés les motifs caractéristiques des sites de fixation des cofacteurs pyrimidiques (Guedon *et al.*, 2001).

L'introduction de ce chapitre présente un aperçu des nombreuses connaissances acquises sur les flavoenzymes et leurs interactions avec les protéines fer-soufre. Suivent les résultats biochimiques et structuraux obtenus sur la rubrédoxine et la NROR de *C. acetobutylicum*. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux résultats préliminaires sur la superoxyde réductase (SOR) de *C. acetobutylicum*. En effet, des études récentes, notamment chez les bactéries sulfato-réductrices et chez certains archéons, démontrent l'existence de nouvelles voies de protection de ces micro-organismes anaérobies contre les entités oxygénées impliquant des activités SOR (Jenney *et al.*, 1999 ; Iumprio *et al.*, 2000 ; Coulter *et al.*, 2001). Enfin, la conclusion dresse un bilan des travaux déjà effectués et des perspectives ouvertes par notre étude.

Les flavoenzymes catalysent essentiellement des réactions d'oxydo-réduction car les dérivés de flavine sont eux-mêmes des agents oxydo-réducteurs, par conséquent observés sous différents états d'oxydation (figure 44). Le cycle isoalloxazine représente le motif minimal nécessaire aux réactions d'oxydo-réduction catalysées par les flavoenzymes. La chimie très riche de cet hétérocycle est à l'origine de la grande diversité des réactions catalysées par ces enzymes.

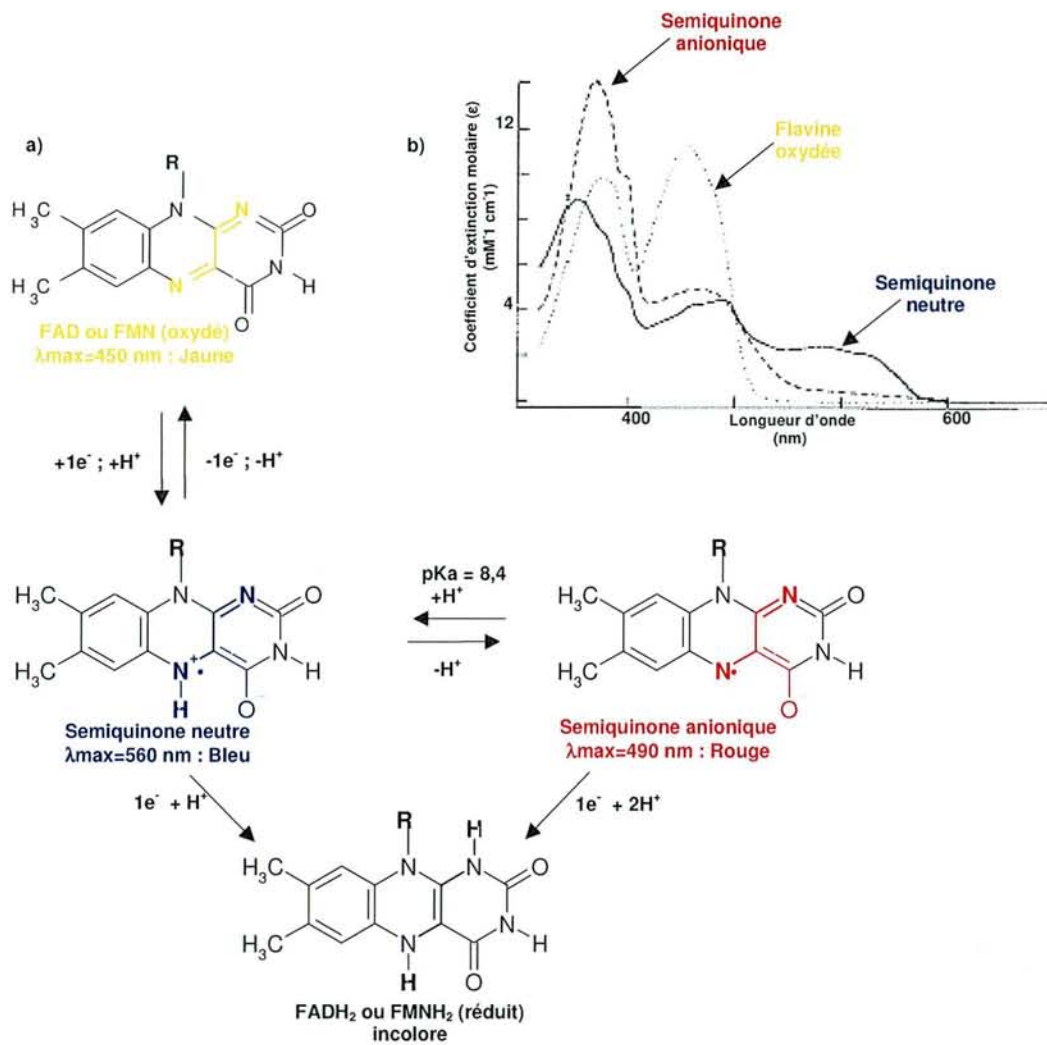


Figure 44 : (a) Différents états d'oxydation des dérivés de flavine. (b) Spectre d'absorption UV-visible de la D-amino oxydase sous différents états d'oxydation du FAD (d'après Nishina *et al.*, 2001)

Le potentiel de conversion entre les formes réduites et oxydées des dérivés de flavine en solution se situe autour de -200 mV à pH7. Cependant, les interactions avec des protéines modifient fortement cette valeur, l'amplitude de la fluctuation allant jusqu'à 600 mV environ. A

titre d'exemple, pour le couple semiquinone neutre / flavine réduite de la flavodoxine d'*Azotobacter vinelandii*, ce potentiel est mesuré à -475 mV (Barman *et al.*, 1972) contre $+80$ mV pour le couple FAD / semiquinone anionique de la thiamine déshydrogénase (Gomez-Moreno *et al.*, 1979).

Selon la théorie d'interaction par transfert de charges développée par R. S. Mulliken (Mulliken, 1962) le transfert d'électrons s'effectue de l'orbitale HOMO ("highest occupied molecular orbital") d'un groupement donneur vers l'orbitale LUMO ("lowest unoccupied molecular orbital") d'un groupement accepteur d'électrons. Le complexe de transfert de charges généré est également directement lié aux interactions entre l'orbitale HOMO du donneur et l'orbitale LUMO de l'accepteur. De nombreux travaux décrivent les propriétés de ces complexes de transfert de charges pour des flavoenzymes et notamment pour la D-amino oxydase complexée à une molécule d'aminobenzoate (Miura, 2000 ; Nishina *et al.*, 2001).

Les flavoenzymes peuvent échanger des électrons mais aussi des photons avec des substrats variés. Cette photosensibilité est décrite notamment pour la DNA photolyase qui répare les dommages photo-induits sur la double hélice d'ADN (Sancar *et al.*, 2003) mais également pour la luciférase bactérienne qui émet des photons en oxydant des alkyl aldéhydes (Baldwin *et al.*, 1995).

Les flavoprotéines jouent un rôle central dans le métabolisme cellulaire de par cette capacité à catalyser des réactions de déshydrogénation à deux électrons de nombreux substrats et à transférer des électrons vers des centres métalliques via des états radicalaires (figure 3a). De plus, une phase du développement du fœtus des mammifères et de certains oiseaux est décrite comme dépendante d'une protéine fixatrice de riboflavine (Murly *et al.*, 1982) et, plus récemment, une fonction dans la transduction du signal des phénomènes d'apoptose a été étudiée chez la souris pour une flavoprotéine (Susin *et al.*, 1999).

Trois articles de revue proposent des classifications pour les flavoprotéines :

- S. Ghisla et V. Massey classent ces enzymes en fonction de la réaction catalysée et de la nature chimique des substrats (Ghisla & Massey, 1989).

- R. Miura base sa classification sur le nombre d'électrons impliqués dans un cycle catalytique de l'enzyme (Miura, 2000). L'auteur définit des classes m/n où m et n représentent le nombre d'électrons transférés respectivement dans les demi-réactions de réduction et d'oxydation.

Le tableau 13 synthétise et illustre ces deux classifications :

Classification m/n	Exemples
Classe 2/2	<p style="text-align: center;">Transhydrogénase</p> Glutathion réductase NADPH-thiorédoxine réductase Lipoamide déshydrogénase D-lactate déshydrogénase
	<p style="text-align: center;">Déshydrogénase / oxydase</p> D-amino acide oxydase Glucose oxydase
	<p style="text-align: center;">Déshydrogénase / oxygénase</p> Phénol hydroxylase Luciférase bactérienne
Classe 2/1	<p style="text-align: center;">Déshydrogénase / transférase d'électrons</p> Acyl-coA déshydrogénase Ferrédoxine-NADP réductase NADPH-cytochrome P450 réductase
Classe 1/1	<p style="text-align: center;">Electron-transférase pure</p> Flavodoxine DNA photolyase "Electron-transferring flavoprotein"

Tableau 13 : Classification des flavoprotéines selon Miura et Massey
(Miura, 2000 ; Ghisla & Massey, 1989)

- Dym et Eisenberg ont effectué une analyse comparative des structures tridimensionnelles et des séquences primaires des domaines de fixation du FAD des flavoprotéines disponibles dans la PDB (Dym & Eisenberg, 2001). La comparaison des domaines couplée à celle de la conformation (étendue ou repliée) du cofacteur leur permet de décrire quatre grandes familles et trois membres isolés répertoriés dans le tableau 14. Cette classification ne considère que les protéines fixant de façon covalente ou non le FAD, et occulte notamment toutes les protéines complexant le FMN.

Familles	Membres	Cofacteurs	Motifs
<u>GR</u>			
GR1	Glutathion réductase	FAD, NADH ; E, NC	GxGxxG(x) ₁₇ E ; hhhxGxGxxAxE
GR2	Phénol-hydroxylase	FAD, NADPH ; E, NC	GxGxxG(x) ₁₉ D ; S(x) ₅ FxxGD
<u>FR</u>	Flavodoxine réductase	FAD, NADPH ; R, NC	GxxSxxL(x) ₅ G(x) ₈ PxG ; RxYS
<u>PCMH</u>	p-cresol méthylhydroxylase	FAD ; E, C	P(x) ₆ GxN ; GxxL
<u>PO</u>	Pyruvate oxydase	FAD ; E, NC	R(x) ₅ GxG
<u>Membres isolés</u>	Acyl-coA déshydrogénase DNA-photolyase Quinone oxydo-réductase	FAD ; E, NC FAD ; R, NC FAD, NADPH ; E, NC	

Tableau 14 : Les familles de protéines fixant le FAD définies par Dym et Eisenberg (Dym & Eisenberg, 2001).

Légende : E : conformation étendue du FAD; R : conformation repliée du FAD; NC : FAD lié de façon non covalente; C : FAD lié de façon covalente

Notre système d'étude chez *C. acetobutylicum* mettant en jeu une flavoprotéine et une protéine fer-soufre, la seconde partie de cette introduction présente une synthèse sur la diversité et les fonctions de ces protéines fer-soufre chez les clostridia.

1.2. Les protéines fer-soufre chez les clostridia

Le fer constitue le quatrième élément de la croûte terrestre par ordre décroissant d'abondance et, après l'aluminium, le deuxième métal. C'est un métal de transition, caractérisé par une sous-couche électronique *d* incomplète. Les formes Fe²⁺ et Fe³⁺ dominent la chimie du fer en solution aqueuse et leurs complexes participent à des réactions de transferts d'électrons et des réactions acide-base. La grande diversité des ligands pouvant coordonner le fer et les caractéristiques des composés ainsi formés lui octroient un rôle primordial dans les processus biologiques.

Les metalloprotéines à fer peuvent être divisées en trois grandes classes selon le mode de coordination du fer au sein de la protéine (Crichton, 1991) :

- **les hémoprotéines**, où le fer est lié aux quatre atomes d'azote d'un cycle tétrapyrrole et à un ou deux ligands axiaux de la protéine. Micro-organismes anaérobies

stricts, les clostridia ont perdu la machinerie de biosynthèse de l'hème et n'expriment pas d'hémoprotéines.

- **les protéines fer-soufre**, qui constituent la seconde classe des protéines à fer. Cette famille est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs atomes de fer liés en majorité à des atomes de soufre de groupements thiols de cystéines et à des atomes de soufre inorganique.

- **les protéines à fer non hémique et sans centre fer-soufre** regroupent toutes les autres métalloprotéines à fer. Il s'agit par exemple des ferritines, transferrines...

L'union internationale de Biochimie (IUB) recommande la classification des protéines fer-soufre en deux groupes principaux (Palmer & Reedjik, 1991) :

- **Les protéines fer-soufre simples**, constituées uniquement d'agrégat(s) fer-soufre. Trois sous-familles peuvent être décrites, la famille de type rubrédoxine, celle de type ferrédoxine et celle des autres protéines dont un agrégat fer-soufre est impliqué dans une action catalytique. L'aconitase (Beinert & Kennedy, 1989), les hydrogénases à fer (Adams, 1990) appartiennent par exemple à cette dernière sous-famille.

- **Les protéines fer-soufre complexes** qui contiennent en plus des agrégats fer-soufre, un ou plusieurs autres groupements prosthétiques. La pyruvate ferrédoxine oxydo-réductase (PFOR) des clostridia complexe par exemple de la thiamine pyrophosphate (TPP) (Meyer, 2000).

La suite de ce paragraphe s'appuie sur un article de revue de J. Meyer qui synthétise les connaissances acquises jusqu'en 2000 sur chaque famille de protéines fer-soufre chez les clostridia (Meyer, 2000).

Les rubrédoxines sont les protéines fer-soufre les plus simples, constituées de 45 à 54 résidus chez les micro-organismes anaérobies. Leur site actif consiste en un atome de fer coordonné à quatre atomes de soufre de résidus cystéines (figure 45).

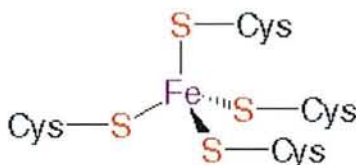


Figure 45 : Schéma de la coordination de l'atome de fer au sein du site actif de la rubrédoxine (source : PROMISE Database, <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/MAIN.html>)

De nombreuses études cristallographiques, RMN et spectroscopiques couplées à la mutagenèse dirigée ont été menées sur la rubrédoxine afin de comprendre la stabilité (Eidsness *et al.*, 1997) et les propriétés de transfert d'électrons de cette protéine (Kümmerle *et al.*, 1997). Cependant la fonction biologique de la rubrédoxine reste inconnue chez les clostridia. Une hypothèse issue de la comparaison avec les bactéries sulfato-réductrices attribue à la rubrédoxine un rôle dans la protection contre l'oxygène (Voordouw & Voordouw, 1998).

Les ferrédoxines sont en général des protéines homodimériques d'environ cent acides aminés par sous-unité. Deux classes sont communément décrites en fonction du nombre et du mode de coordination des atomes de fer. Les ferrédoxines de type plante ou mammifère possèdent un centre [2Fe-2S] contre un centre [4Fe-4S] pour les ferrédoxines de type bactérien (figure 46).

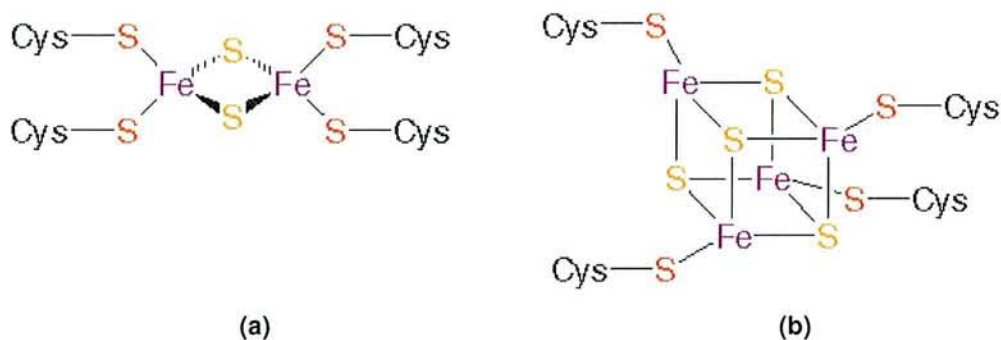


Figure 46 : Schéma de la coordination de l'atome de fer au sein du site actif des ferrédoxines (source : PROMISE Database, <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/MAIN.html>).
(a) : centre [2Fe-2S]; (b) : centre [4Fe-4S]

Un autre type de ferrédoxine [2Fe-2S] existe chez différentes espèces bactériennes (Chatelet *et al.*, 1999). La séquence primaire de ces protéines ne s'aligne pas sur celles des ferrédoxines de type plante et leurs structures tridimensionnelles diffèrent (Yeh *et al.*, 2000). La ferrédoxine (2FeCpFd) de *Clostridium pasteurianum* (*C.pasteurianum*) est la plus étudiée de cette nouvelle classe de protéines. Les nombreux travaux en spectroscopie et mutagenèse dirigée (Fuginaga *et al.*, 1993 ; Achim *et al.*, 1999) n'ont cependant pas encore permis d'élucider totalement sa fonction biologique. L'interaction de cette 2FeCpFd avec une nitrogénase à molybdène-fer démontrée par Golinelli et collaborateurs suggère un rôle dans la fixation de l'azote (Golinelli *et al.*, 1997).

D'autres protéines fer-soufre caractérisées chez les clostridia sont répertoriées sur la figure 47

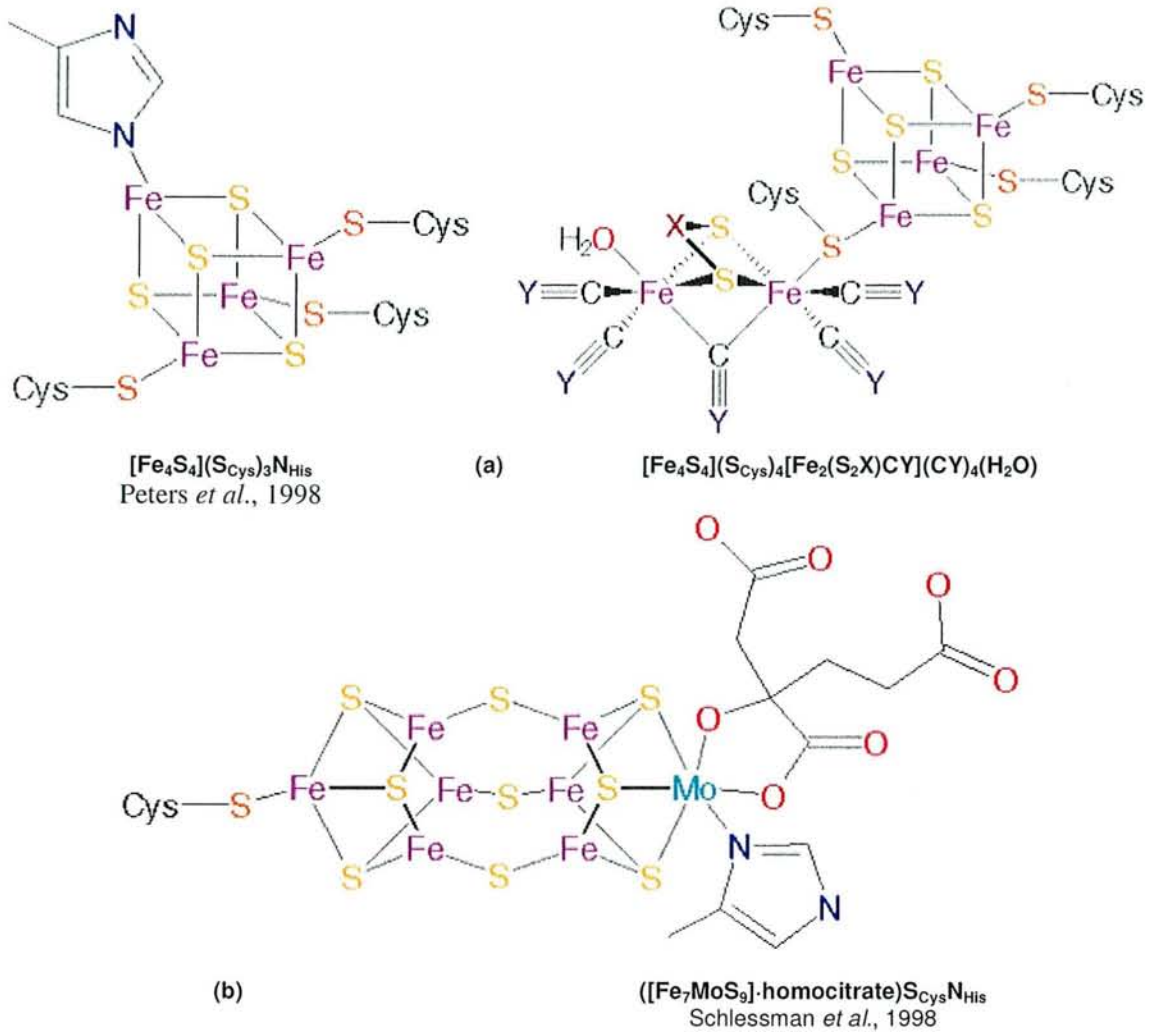


Figure 47 : Les centres fer-soufre décrits pour des hydrogénases (a) et des nitrogénases (b) de clostridia

Les protéines fer-soufre ne sont pas directement impliquées dans la pathogénicité de certains clostridia (Rood *et al.*, 1997) et pourraient participer chez l'homme à la prévention contre une infection induite par un *Clostridium* pathogène comme *Clostridium botulinum* (Meyer, 1981 ; Cammack *et al.*, 1999).

Les protéines fer-soufre jouent par contre un rôle important dans les réactions solvantogènes, en fournissant des entités réductrices (Mitchell, 1998) à des systèmes comme les hydrogénases, ferrédoxine réductase ou rubrédoxine réductase. Contrôler ces systèmes durant la croissance cellulaire représente une des clefs des biotechnologies de production de solvants organiques, car le pouvoir réducteur associé à ces systèmes pourrait

être utilisé dans les processus industriels de production de butanol ou d'acétone (Girbal & Soucaille, 1998).

1.3. Structures cristallographiques de complexes flavoprotéines / protéine fer-soufre

Quelques structures cristallographiques de complexes flavoprotéine / protéine fer-soufre sont résolues et disponibles dans la PDB. La troisième partie de cette introduction résume ces données structurales.

1.3.1. Le complexe adrénodoxine réductase / adrénodoxine d'origine bovine.

La NADPH-adrénodoxine réductase (AR) membranaire, l'adrénodoxine (Adx), transporteur d'électrons [2Fe-2S] soluble, et le cytochrome P450 membranaire de la famille CYP11 constituent le système d'hydroxylation des stéroïdes dans les mitochondries du cortex adrénale. La structure tridimensionnelle du complexe AR (partie soluble) / Adx est résolue à 2.3 Å de résolution (figure 48) (Müller *et al.*, 2000). Les cristaux de forme hexagonale (P6₅22) contiennent deux complexes AR / Adx par unité asymétrique (complexe1 et complexe2), eux-mêmes générés par pontage chimique au 1-éthyl-3-(3-diméthylpropyl) carbodiimide (EDC).

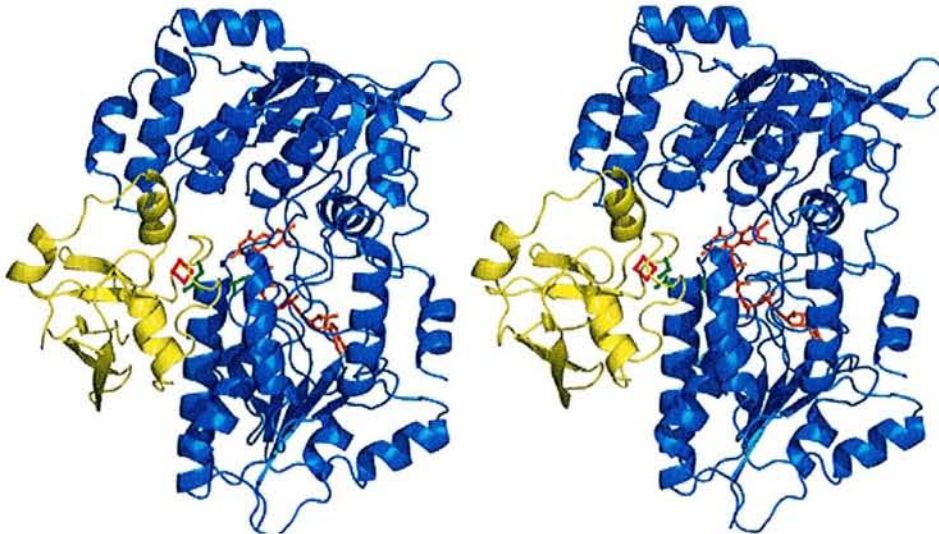


Figure 48 : Représentation stéréoscopique du complexe2 AR / Adx d'origine bovine (code PDB : 1e6e).
Adx : jaune; AR : bleu; [2Fe-2S] : Rouge; FAD : orange; Lys376, Thr377, Cys52 : vert.

En accord avec le concept de « guidage électrostatique » (Muller *et al.*, 1998), la stabilité du complexe est décrite comme étant gouvernée par des interactions électrostatiques. Par superposition du domaine de fixation du FAD des structures complexées et de la forme libre de l'AR (Ziegler *et al.*, 1999), les auteurs observent une rotation de 4° et 7° des domaines de fixation du NADP respectivement pour les complexes 1 et 2. La distance de 10 Å (10.3 Å pour le complexe 1 et 9.6 Å pour le complexe 2) séparant le centre [2Fe-2S] du FAD suggère un mécanisme de transfert d'électrons par "effet tunnel" (Sutchiffe & Scrutton, 2002). Les auteurs proposent un passage pour les électrons via une triade : Lys376(AR)-Thr377(AR)-Cys52(Adx). Cette étude présente la première structure d'un complexe entre une ferrédoxine et sa réductase et pose des bases de réflexion sur le mécanisme de transfert d'électrons, cependant le complexe n'est pas « naturel » et les contraintes drastiques imposées par le pontage chimique peuvent avoir favorisé un assemblage non physiologique.

1.3.2. Les complexes ferrédoxine / ferrédoxine réductase du maïs et de la cyanobactérie *Anabaena* PCC7119.

Les ferrédoxine-NADP⁺ réductases (FNR) catalysent la dernière étape de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique au cours de la photosynthèse. La FNR capte deux électrons de haute énergie photoproduits par le photosystème I (PSI) et les transfère à la ferrédoxine un à un pour réduire le NADP⁺ en NADPH (Voet & Voet, 1997).

- FNR / Fd chez *Anabaena* (Morales *et al.*, 2000) :

Les cristaux de forme orthorhombique (P2₁2₁2₁) contiennent deux molécules de FNR (FNR1 et FNR2) et une molécule de Fd par unité asymétrique. La structure est résolue à 2.4 Å de résolution (figure 49). La distance FAD(FNR1)-[2Fe-2S] est de 7.4 Å contre 14.5 Å pour la FNR2. Seul le complexe FNR1-Fd est considéré comme potentiellement efficace. Les auteurs ne décrivent aucun changement conformationnel de la FNR lors de la formation du complexe mais observe le déplacement d'une boucle de la Fd qui génère un contact intermoléculaire. De plus, les auteurs soulignent la prédominance des interactions hydrophobes stabilisatrices du complexe. La distance séparant le donneur (FAD) de l'accepteur (centre [2Fe-2S]) d'électrons est plus courte que pour le complexe AR / Adx, cependant le transfert semble s'effectuer également par « effet tunnel » mais via les orbitales π d'un acide aminé aromatique de la Fd (Phe65).

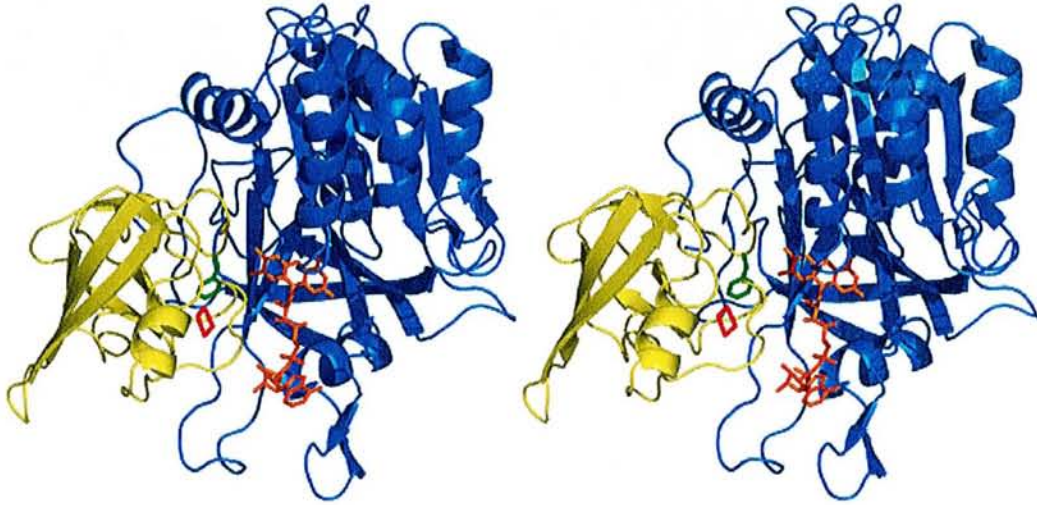


Figure 49 : représentation stéréoscopique du complexe FNR1-Fd d'*Anabaena*
 FNR : bleue; Fd : jaune; FAD : orange; [2Fe-2S] : rouge; Phe65 : vert

- FNR / Fd du maïs (*Kurisu et al., 2001*) :

Les cristaux sont également de forme orthorhombique ($P2_12_12_1$), avec des paramètres de maille différents, et contiennent un dimère de FNR et une molécule de Fd par unité asymétrique. Cependant il n'y a pas d'interaction entre la Fd et la seconde molécule de FNR du dimère. La structure est résolue à 2.59 Å de résolution (figure 50). La distance FAD-[2Fe-2S] de 6 Å est compatible avec un transfert direct des électrons et les auteurs n'observent aucun résidu susceptible de transporter les électrons d'un site à l'autre. La même proportion d'interactions hydrophobes et électrostatiques stabilise le complexe. De plus, contrairement au modèle d'*Anabaena*, le domaine de fixation du NADP tourne de quelques degrés par rapport à celui du FAD mais dans des proportions moindres que dans le complexe AR / Adx.

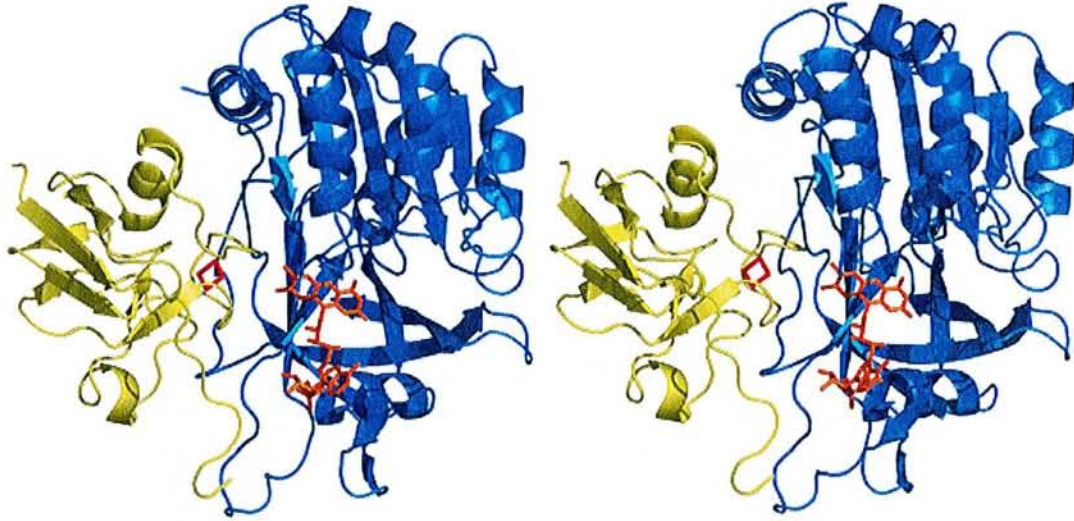


Figure 50 : Représentation stéréoscopique du complexe FNR / Fd du maïs. FNR : bleu; Fd : jaune; [2Fe-2S] : rouge; FAD : orange

Ces deux structures correspondent à des complexes "naturels" entre deux partenaires physiologiques. Bien qu'impliquant des protéines aux repliements très similaires et très proches en séquences primaires, les complexes ne sont cependant pas identiques tout comme le mode de transfert d'électrons. La position de la molécule de ferrédoxine dans le complexe issu du maïs traduit davantage une position physiologique car celle-ci est beaucoup moins contrainte par l'empilement cristallin que dans le modèle *Anabaena* où la seconde molécule de FNR partage avec la ferrédoxine plusieurs contacts stabilisateurs.

Récemment, la structure d'un complexe entre la triméthylamine déshydrogénase (TMDH) et son partenaire physiologique "electron transferring flavoprotein" (ETF) a été résolue à 2 Å de résolution (Leys *et al.*, 2003). Le transfert d'électron s'effectue entre le FAD de l'ETF et le centre [4Fe-4S] de la TMDH. Ces travaux ne seront pas décrits dans ce manuscrit, le système étudié impliquant des protéines multidomaines très différentes de notre système d'étude en structure et en fonction.

Ces trois modèles décrivent des complexes flavoprotéine / protéine fer-soufre de type ferrédoxine ([2Fe-2S]), notre étude porte quant à elle sur une interaction entre une flavoprotéine et une protéine fer-soufre de type rubrédoxine dont aucun modèle n'est encore disponible.

II. Etude structurale de la rubrédoxine de *Clostridium acetobutylicum*

Les rubrédoxines (Rd) appartiennent à la famille des protéines fer-soufre simples, ce sont de petites protéines solubles (45 à 54 acides aminés en moyenne) au sein desquelles la coordination de l'atome de fer du site actif est tétraédrique. Les atomes de soufre de quatre cystéines incluses dans des motifs Cys-X-X-Cys-Gly complexent le cation métallique. Découverte pour la première fois chez *C. pasteurianum* comme contaminant rouge lors de la purification de la ferrédoxine (Lovenberg *et al.*, 1965 ; Mortensen, 1964), la rubrédoxine a fait l'objet de nombreux travaux spectroscopiques, cristallographiques et est considérée comme le modèle d'étude de cette famille de protéines et des métalloprotéines en général.

Les rubrédoxines sont présentes chez la plupart des bactéries et archéons anaérobies. Les micro-organismes aérobies qui expriment la rubrédoxine appartiennent aux genres *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* (Meyer & Moulis, 2001). Récemment une rubrédoxine a été isolée chez un eucaryote : l'algue *Guillardia theta* (Wastl *et al.*, 2000) (figure 51).

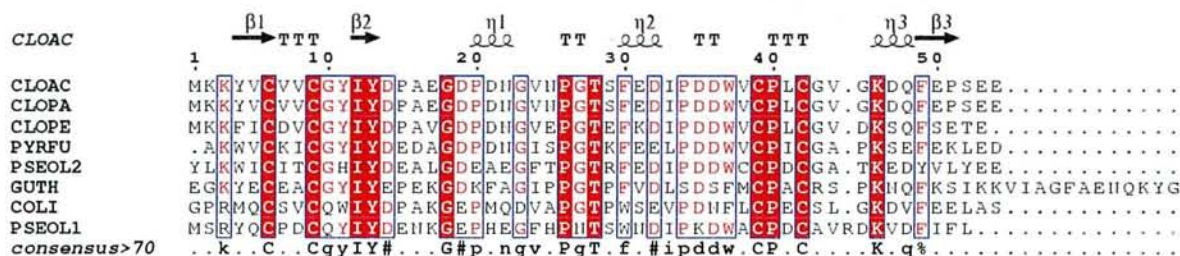


Figure 51 : Alignement de huit séquences de rubrédoxine; cloac : *C. acetobutylicum*; clopa : *C. pasteurianum*; clope : *C. perfringens*; pyrfu : *P. furiosus*; pseol2 : *pseudomonas oleovorans 2*; guth : *guillardia theta*; pseol1 : *pseudomonas oleovorans 1*.

La présence du centre fer-soufre au sein des rubrédoxines suggère un rôle dans les processus d'oxydo-réduction. Le rôle de la rubrédoxine dans l'oxydation des alcanes chez *P. oleovorans* était depuis la fin des années 80 le seul caractérisé biochimiquement et génétiquement (Kok *et al.*, 1989). Coulter et collaborateurs ont montré récemment l'implication de la rubrédoxine dans la protection contre le stress oxydant chez *Desulfovibrio vulgaris* (Coulter *et al.*, 2001).

II.1. Surexpression, purification et détermination structurale de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*.

La rubrédoxine de *C. acetobutylicum* a été surexprimée chez *E. coli*, et purifiée selon la procédure décrite par E. Guedon (Guedon *et al.*, 2001). Les cristaux ont été obtenus en diffusion de vapeur en goutte suspendue dans les conditions de cristallisation de la rubrédoxine de *C. pasteurianum* (Lovenberg *et al.*, 1965) (figure 52) :

La protéine cristallise à pH 4 à partir d'un mélange de 2 l de solution protéique à 10mg.mL⁻¹ et 2 l d'une solution à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium.

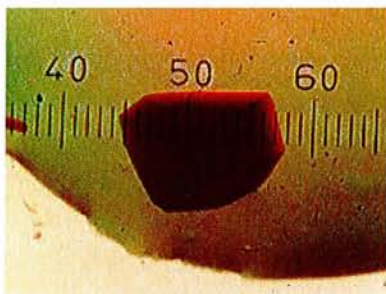


Figure 52 : Cristal rouge-noir caractéristique de la forme oxydée de la rubrédoxine
Taille : 0.8 x 0.8 x 0.8 mm

Ces cristaux nous ont permis de collecter un jeu de données à température ambiante, à 1.14 Å de résolution sur la ligne DW32 du LURE à Orsay. Les statistiques de collecte sont répertoriées dans le tableau 15.

Collecte : Ligne DW32	Statistiques
Groupe d'espace	R3
Paramètres de maille	a = b = 64 Å; c = 32 Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Température de collecte	ambiante
Résolution	1.14 Å
Réflexions uniques	17331
R _{sym}	6.1 %
Complétude	97.2 % (89.6 dans la dernière couronne de résolution)
Affinement	
R _{crys}	16.6 %
R _{free}	18.3 %
Molécules d'eau	45
Déviatoin standard (r.m.s.d) sur liaisons	0.04 Å
Déviatoin standard (r.m.s.d) angles	1.9 °

Tableau 15 : Statistiques de collecte des données de diffraction des rayons X et d'affinement du modèle moléculaire de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*

La structure a été résolue par remplacement moléculaire avec comme modèle de départ la structure de la rubrédoxine de *C. pasteurianum* dont la séquence présente 90 % d'identité avec celle de *C. acetobutylicum*. Les statistiques d'affinement sont présentées dans le tableau 15.

Seuls trois résidus C-terminaux n'ont pas pu être modélisés dans les cartes de densité électronique, du fait de leur trop grande agitation thermique. La qualité de la carte de densité électronique à 1.14 Å de résolution est illustrée sur la figure 53. La région représentée est le centre réactionnel avec l'atome de fer central.

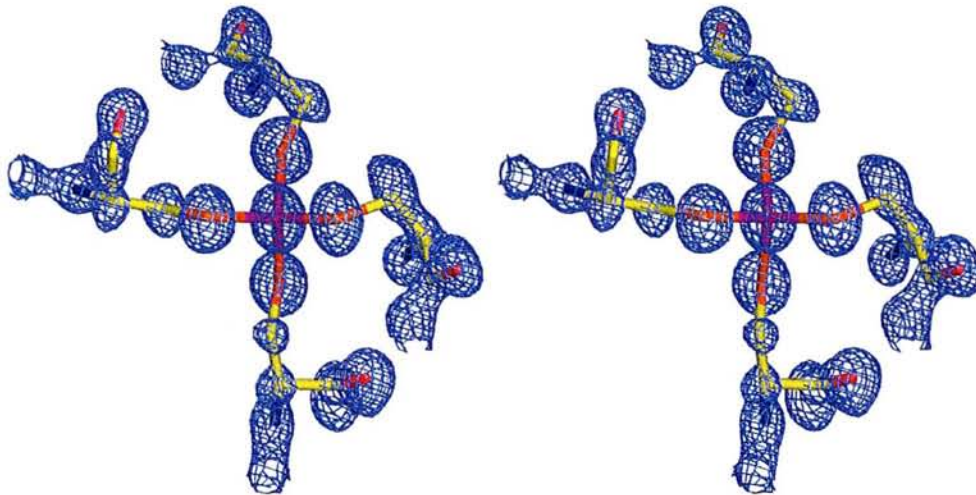


Figure 53 : Vue stéréoscopique du centre fer-soufre de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*. La carte de densité électronique $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (niveau de contour 2) est superposée au modèle

II.2. Description de la structure de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*

Le repliement de toutes les rubrédoxines décrites à ce jour est similaire, la suite de ce paragraphe présente ses caractéristiques à travers le cas particulier de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*.

Le repliement de la rubrédoxine est organisé autour d'un court feuillet à trois brins (résidus 4 à 6 ; 12 à 14 et 49 à 51) et contient deux boucles (résidus 6 à 11 et 39 à 44) incluant les deux signatures (Cys-X-X-Cys) caractéristiques de la fixation d'un cation métallique (figure 54).

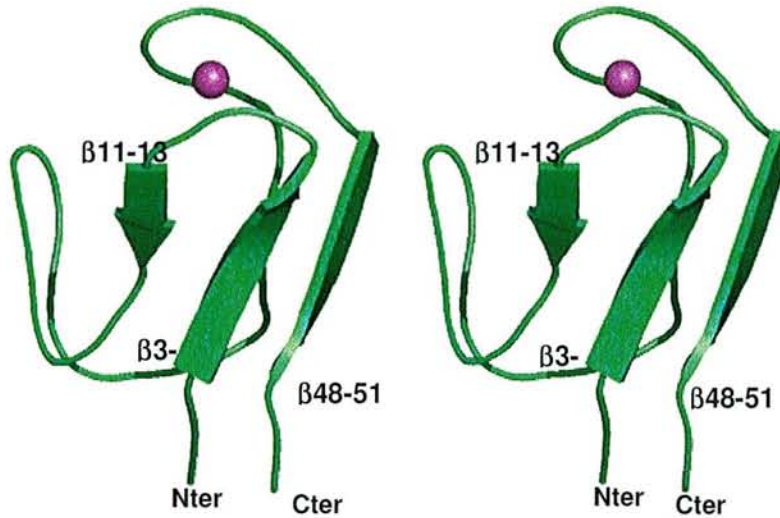


Figure 54 : Vue stéréoscopique de la structure de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*.
L'atome de Fer est représenté en mode sphère

La structure des rubrédoxines est stabilisée par un coeur hydrophobe composé d'acides aminés aromatiques conservés, Tyr4, Tyr11, Tyr13, Phe30, Trp37, Phe49 et d'un résidu à chaîne latérale aliphatique, Ile33 (figure 55).

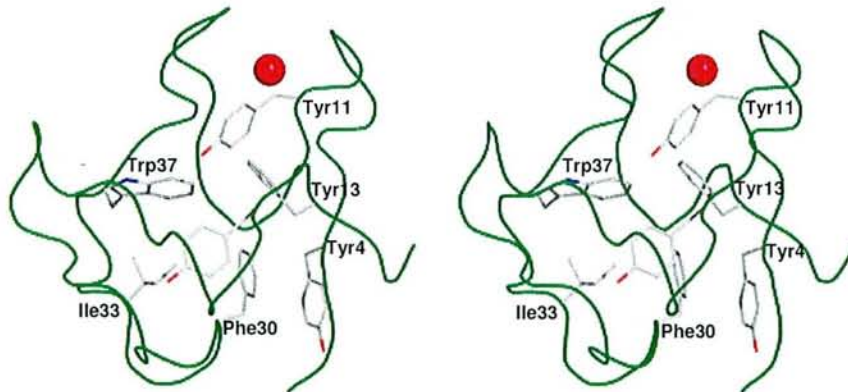


Figure 55 : Vue stéréoscopique illustrant la stabilisation de la structure de la rubrédoxine par un coeur hydrophobe.

Une autre caractéristique de l'organisation structurale des rubrédoxines concerne la répartition des résidus chargés. Ceux-ci, essentiellement acides, sont distribués à la surface de la protéine à l'exception de la région des boucles et du centre fer-soufre (figure 56).

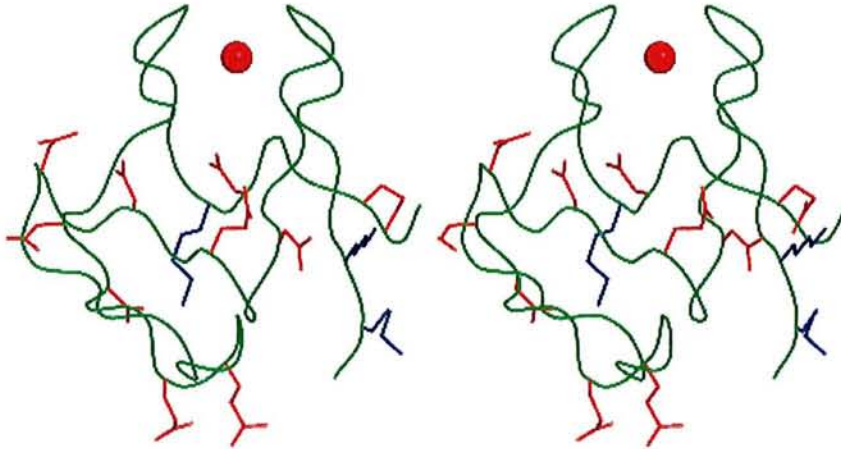


Figure 56 : Vue stéréoscopique illustrant la répartition des acides aminés chargés à la surface de la protéine. Les acides aminés acides sont en rouge et les basiques en bleu

Le calcul du potentiel électrostatique de la rubrédoxine montre que la surface de la protéine est globalement chargée négativement (figure 57).

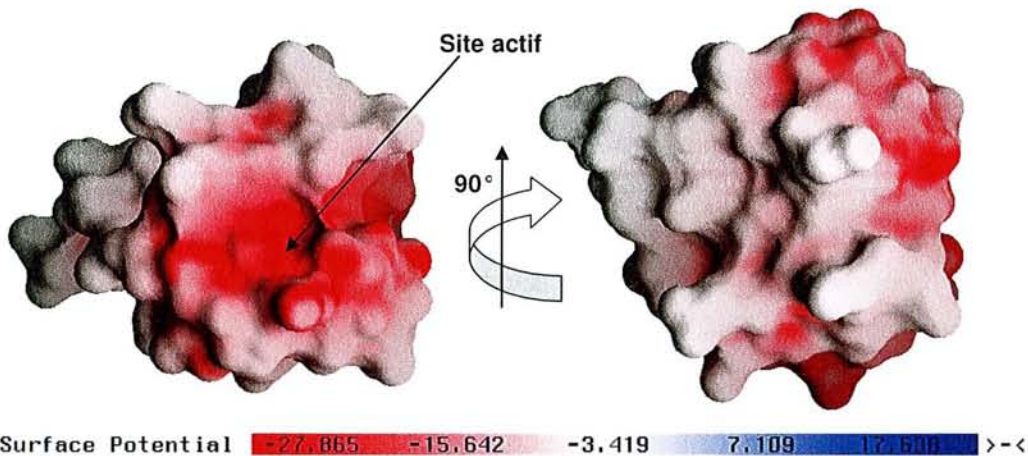


Figure 57 : Surface moléculaire de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum* colorée en fonction du potentiel électrostatique calculé par le logiciel GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) avec les charges issues de la banque de donnée de charges expérimentales définie par Pichon-Pesme et collaborateurs (Pichon-Pesme *et al.*, 1995)

La charge globale du centre réactionnel est toujours négative, quel que soit l'état d'oxydation de la protéine (Victor *et al.*, 2002). Les potentiels d'oxydo-réduction mesurés des différentes rubrédoxines varient de -100 à +50 mV. Le potentiel de réduction des rubrédoxines est pH

dépendant dans la gamme 5 à 10, mais dépend également de la pression et de la température (Gillès de Pelichy & Smith., 1999).

Les seules différences observées entre les différentes structures de rubrédoxines concernent des régions distantes du centre fer-soufre. Ainsi, la rubrédoxine de *D. desulfuricans* présente une délétion des résidus 19 à 25, d'autres possèdent des insertions aux extrémités N et C-terminales de la protéine. La plupart des études structurales ont été menées par diffraction des rayons X mais il existe également de nombreux travaux de RMN en solution (Rose *et al.*, 1998).

Le site métallique des rubrédoxines est décrit comme participant aussi à la stabilité générale de la structure (Meyer & Moulis, 2001). La figure 58 indique les distances des liaisons entre les S_γ des cystéines et l'atome de fer observées dans la structure de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*.

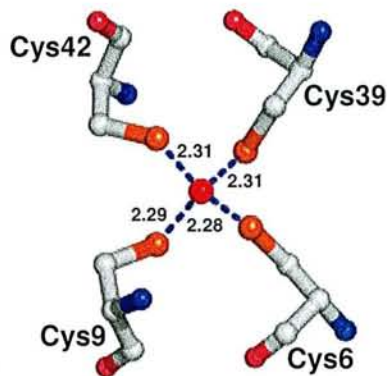


Figure 58 : Distances (en Å) entre les atomes de soufre des cystéines et l'atome de fer au sein du centre métallique de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*

Ces distances correspondent à ce qui est communément décrit pour ce type de complexe. Chez *C. pasteurianum*, il a été montré que la réduction de la rubrédoxine ne provoque aucun grand changement conformationnel en dehors du site actif (Min *et al.*, 2000). Cependant, une augmentation moyenne d'environ 1.5 % de la longueur des liaisons Fe-S et une diminution de 2.5 % de la longueur des liaisons hydrogène impliquant les atomes de soufre des résidus cystéine est observée lors du changement d'état d'oxydation de l'atome de fer (Min *et al.*, 2000). Leu41 via sa chaîne latérale non polaire autoriserait ou non la pénétration de molécules d'eau proches du centre métallique selon la position de sa chaîne latérale. Ce mouvement provoquerait une interaction électrostatique charge-dipôle entre le cluster chargé négativement et les molécules d'eau et pourrait également être source de protons (Min *et al.*, 2000). Leu41 semble effectivement mobile au sein du site actif puisque deux conformations sont observées pour ce résidu dans notre structure. Min et collaborateurs généralisent la

position de la chaîne latérale de Leu41 comme simple pour la forme oxydée de la rubrédoxine de *P. furiosus* et double pour sa forme réduite autorisant le passage de molécules d'eau vers le centre fer-soufre. Cependant, la structure à résolution atomique de la rubrédoxine de *C. pasteurianum* sous forme oxydée (Dauter *et al.*, 1996) présente comme pour *C. acetobutylicum* une double conformation de la chaîne latérale de Leu41 indiquant qu'il est difficile de réduire au deux seuls cas de figure précédents l'organisation du site actif des formes oxydées et réduites des rubrédoxines.

Au sein du site actif, les quatre cystéines qui complexent l'atome de fer ne partagent pas toutes le même nombre de liaisons hydrogène avec l'environnement protéique. Deux cas de figures sont observés : Cys6 et Cys39 sont impliquées dans deux liaisons hydrogène fortes avec les groupements amides (NH) des résidus n+2 et n+3, alors que Cys9 et Cys42 ne sont accepteurs que d'une liaison hydrogène avec le résidu n+2 (figure 59).

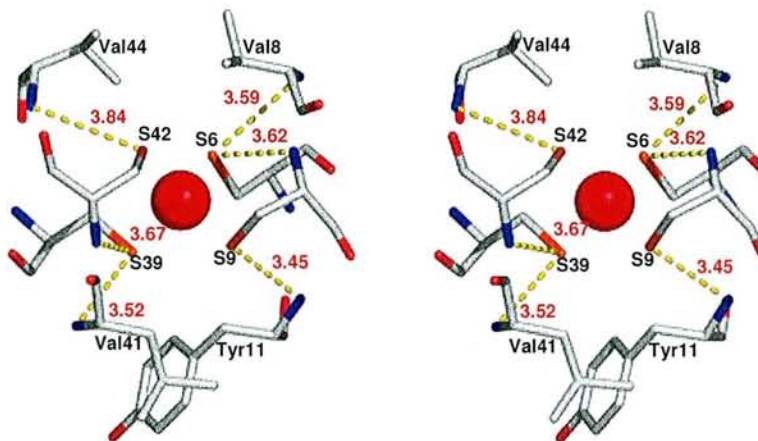


Figure 59 : Représentation du réseau de liaisons hydrogènes stabilisant le centre Fe-(Cys)₄ de la rubrédoxine de *C. acetobutylicum*.

La résolution de cette structure n'apporte pas de réelles informations supplémentaires sur la structure des rubrédoxines en comparaison des études existantes. Cependant, dans l'optique de la résolution de la structure cristalline d'un complexe avec la NADH rubrédoxine oxydoréductase ou de modélisation de ce complexe, il paraissait important de disposer de cette structure.

III. Etude structurale de la NADH rubrédoxine oxydoréductase (NROR) de *Clostridium acetobutylicum*

En 1979, le professeur H. Petitdemange purifie la NROR de *C. acetobutylicum* ATCC824 (Petitdemange *et al.*, 1979). Chez les clostridia, l'implication de la ferrédoxine, la rubrédoxine et la flavodoxine dans l'oxydation du NADH a été décrite (Jungermann *et al.*, 1973 ; Stadtman *et al.*, 1965 ; Petitdemange *et al.*, 1979), mais, si la fonction biologique des NADH-ferrédoxine ou flavodoxine réductases est démontrée, celle de la NROR ne l'est pas. La distribution de cette activité NROR semble relativement erratique au sein des clostridia. Une activité NADPH-rubrédoxine réductase est décrite chez *C. pasteurianum* (Lovenberg, 1972) alors que *C. sticklandii* possède les deux activités NADH et NADPH-rubrédoxine réductase (Stadtman, 1965).

A l'heure actuelle, des activités réductrices de la rubrédoxine via l'oxydation du NAD(P)H sont biochimiquement caractérisées uniquement chez deux autres micro-organismes : l'archéon hyperthermophile *P. furiosus* (Ma *et al.*, 1999) et la bactérie sulfatoréductrice microaérophile *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas*) (Chen *et al.*, 1993)

La grande variabilité en structure primaire et quaternaire des NROR soulève plusieurs questions sur leur(s) rôle(s) physiologique(s), les mécanismes catalytiques et la spécificité de cofacteur, les interactions avec la rubrédoxine.... Dans ce contexte où nous disposons de peu de données expérimentales sur la biochimie de cette classe d'enzymes, la résolution de la structure tridimensionnelle d'un premier modèle de NROR doit apporter quelques réponses sinon des pistes de réflexion sur toutes ces questions.

III.1. Caractérisations biochimique et enzymatique de la NROR

Les résultats présentés dans ce paragraphe correspondent pour partie aux travaux antérieurs à notre étude, menés dans le laboratoire du professeur H. Petitdemange.

La NROR est une flavoprotéine à FAD monomérique de 379 résidus qui oxyde spécifiquement le NADH pour réduire la rubrédoxine (figure 60). Aucune activité n'est observée avec le NADPH, la ferrédoxine ou la flavodoxine (Petitdemenage *et al.*, 1979) .

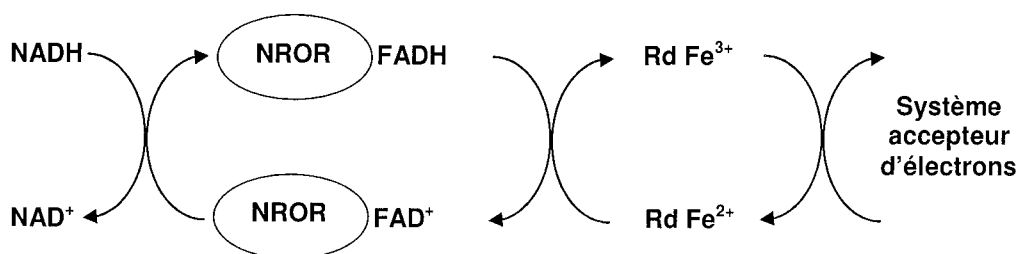


Figure 60 : Schéma réactionnel d'oxydation du NADH par la NROR

Les tableaux 17 et 18 résument quelques données expérimentales sur les activités NROR mesurées avec différents accepteurs d'électrons et différents inhibiteurs. La plus forte activité est mesurée en présence de ferricyanure de potassium alors qu'aucune activité n'est enregistrée avec l'oxygène ou le FAD. Le noyau hémique du cytochrome C n'est pas un accepteur d'électrons efficace, contrairement aux composés aromatiques du type benzoquinone.

Composés	Accepteurs d'électrons (M)	Donneurs d'électrons NADH (M)	NADH oxydé (nM)
Ferricyanure de potassium	10^{-3}	350	5538
Cytochrome C	5.10^{-5}	130	9
O ₂		130	0
FAD	2.10^{-5}	350	0
Para-Toluoquinone	16.10^{-5}	130	748
Para-Benzoquinone	16.10^{-5}	130	731

Tableau 17 : Activité de la NROR en présence de différents accepteurs d'électrons
Réaction : 1 g de NROR dans un volume final de 3ml

Composés	Concentration (M)		Pourcentage d'inhibition (%)
	Incubation	Réaction	
Para-Hydroxymercuribenzoate	3.10^{-5}	10^{-6}	80
	3.10^{-6}	10^{-7}	58
N-Ethylmaleimide	3.10^{-4}	10^{-5}	30
	3.10^{-3}	10^{-4}	64
EDTA	10^{-3}	3.3×10^{-5}	0
Nitrate d'argent	5.10^{-5}	1.6×10^{-6}	100

Tableau 18 : Inhibition de l'activité NROR par différents agents chimiques.
Réaction : 0.5 mole NADH, 0.16 mole cytochrome C et 0.252 mole de rubrédoxine; pH=8 ; Volume final=3ml

L'inhibition la plus importante est obtenue avec le nitrate d'argent et le dérivé mercuriel qui réagissent sur les groupements sulfhydryles. Ces résultats tendent à montrer l'implication de résidus cystéines dans le mécanisme catalytique de la NROR. Keser et collaborateurs ont caractérisé une activité NADPH-rubrédoxine réductase chez l'archéon hyperthermophile *P. furiosus* (Ma *et al.*, 1999). L'enzyme est un monomère de 43 kDa aux propriétés biochimiques et biophysiques très similaires à celles de la NROR de *C. acetobutylicum*. Notons que l'enzyme mise en évidence chez *D. gigas* (Chen *et al.*, 1993) est un hétérodimère constitué de deux sous-unités de 27 et 32 kDa qui fixent respectivement une molécule de FAD et une molécule de FMN et dont les séquences primaires sont peu similaires à celles des enzymes monomériques.

L'alignement des structures primaires des NROR de *P. furiosus* et *C. acetobutylicum* montre 31.2 % d'identité de séquences (42% d'homologie) (figure 61). Ma et collaborateurs décrivent une activité disulfide réductase indépendante de l'activité NROR impliquant les deux seuls résidus cystéine présents dans la séquence primaire de l'enzyme de *Pyrococcus* (Ma *et al.*, 1999). L'inhibition par différents agents chimiques de l'activité NROR n'a cependant pas été mesurée chez ce microorganisme. Les positions des deux cystéines potentiellement impliquées dans l'activité disulfide réductase de l'enzyme de *Pyrococcus* pourraient correspondre aux positions Cys216 et Cys257 de la séquence primaire de l'enzyme de *Clostridium*, chez qui cette activité reste à caractériser.

Cys257 de la NROR de *C. acetobutylicum* se situe au sein de l'empreinte de fixation du FAD définie par Eggink et collaborateurs (Eggink *et al.*, 1990) : **TxxxxxYAxGDCA**. Une séquence légèrement différente est observée dans la séquence de la NROR de *C. acetobutylicum* : **TxxxxxYACGDVA**. La cystéine du motif est décalée de trois résidus et se substitue à une isoleucine, présente dans les autres séquences. Une valine est observée en position 12 du motif en lieu et place de la cystéine conservée dans les autres modèles.

Enfin, comme attendu, deux motifs caractéristiques de la fixation des parties ADP des cofacteurs pyrimidiques sont présents dans les séquences des NROR.

Le tableau 19 illustre certaines propriétés cinétiques de la NROR de *C. acetobutylicum* (Guedon *et al.*, 2001):

Substrat (μM)	Co-substrat (μM)	K_m apparent (μM)	V_{max} apparente (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
NADH (2.0-180.0)	Rd <i>C. ace</i>	17.4	570	400	22988
NADPH (100.0-9500.0)	Rd <i>C. ace</i>	2070.0	520	366	177
Rd <i>C. ace</i> (0.05-12.0)	NADH (180.0)	1.0	570	400	400000
Rd <i>C. pas</i> (0.1-41.4)	NADH (180.0)	5.3	1030	724	136604
Rd <i>C. but</i> (0.1-16.6)	NADH (180.0)	3.9	970	682	174872
Rd <i>C. cel</i> (0.1-16.6)	NADH (180.0)	3.6	1400	984	273333

Tableau 19 : Propriétés cinétiques de la NROR de *C. acetobutylicum* (d'après Guedon *et al.*, 2001). Rd : rubrédoxine; *C. ace* : *C. acetobutylicum*; *C. pas* : *C. pasteurianum*; *C. but* : *C. butyricum*; *C. cel* : *C. cellulolyticum*.

L'efficacité de la NROR à réduire le NADH (k_{cat}/K_m de $22988 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) comparé au NADPH ($177 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) démontre sa spécificité envers le cofacteur non phosphorylé. La seconde information à extraire de ces résultats concerne la spécificité envers les différentes rubrédoxines issues de clostridia. Si l'efficacité maximale de la NROR est bien observée en présence de la rubrédoxine de la souche acétobutylique ($400000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), l'oxydation des rubrédoxines des autres souches solvantogènes se situent dans le même ordre de grandeur. Ces différentes rubrédoxines partagent plus de 80 % d'identité de séquences, il n'est donc pas étonnant d'observer cette interchangeabilité. Cependant ces résultats sont en contradiction avec ceux disponibles sur la NROR de *D. gigas* qui présente une spécificité forte envers sa rubrédoxine, malgré la forte identité de séquences des rubrédoxines au sein des différentes espèces de *Desulfovibrio* (Chen *et al.*, 1993).

III.2. Surexpression et purification des formes natives et sélénées de la NROR

Ces deux étapes fondamentales de préparation de l'échantillon en vue d'une étude cristallographique ont été menées grâce au matériel du laboratoire de biochimie des gram + mis à notre disposition par le professeur H. Petitdemange. Les souches originales de surexpression avaient été préparées par E. Guedon dans ce même laboratoire. Les analyses comparatives et recherches d'homologies de séquences de type BLAST ne fournissant pas de modèles structuraux proches pour une éventuelle résolution de la structure de la NROR par remplacement moléculaire, nous avons mené de front la production et la purification des formes natives et sélénées de la NROR.

La forme native de la NROR est surproduite dans une souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3) transformée d'un plasmide de type pMG7. Les cellules sont cultivées sur un milieu LB ampicilline supplémenté de 10 mg/l de riboflavine, le précurseur du FAD. La surexpression est déclenchée par induction de l'ARN polymérase du phage T7 à l'IPTG (concentration finale 1mM) lorsque la densité optique à 600 nm du milieu de culture atteint 0.6.

La purification de la NROR a été effectuée selon le protocole défini par E. Guedon (Guedon & Petitdemange, 2001). Le suivi des étapes de purification est rendu plus aisé par la présence de la molécule de FAD au sein de la protéine, lui conférant une couleur jaune vive facilement repérable sur les différentes colonnes de séparation. Les grandes étapes de la purification de la NROR sont résumées sur le diagramme de la figure 62.

La pureté de l'échantillon purifié est confirmée par la présence d'une seule bande électrophorétique à 41 kDa sur un gel d'acrylamide à 12% coloré au nitrate d'argent (figure 63).

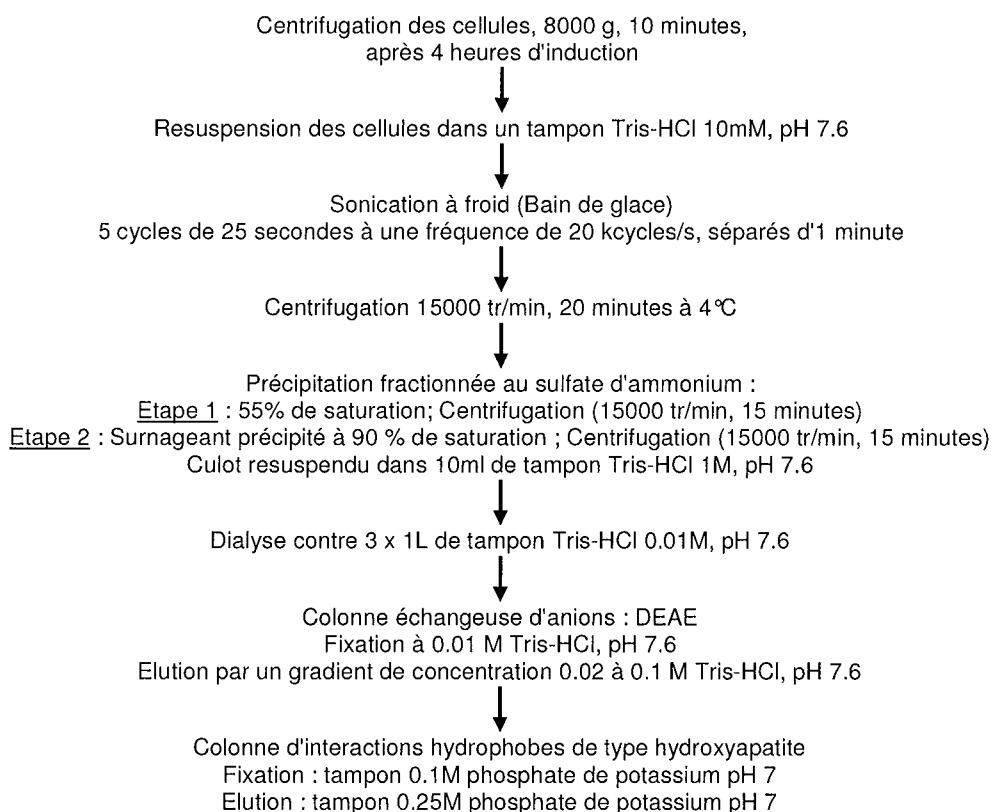


Figure 62 : Diagramme des différentes étapes de purification de la NROR

Les rendements de purification obtenus étaient d'environ 3 mg de protéine par litre de culture pour chacune des quatre productions de NROR native.

Pour le premier lot de protéine purifiée, les spectres d'absorption UV-visible des formes oxydée et réduite de la NROR ont été mesurés afin de les comparer à ceux obtenus par le professeur Petitdemange sur la protéine non recombinante (figure 64). Le spectre de la forme oxydée est caractérisé par trois maxima à 271, 381 et 454 nm correspondant à des coefficients d'extinction molaire de 61700, 9800 et 9860 $M^{-1}cm^{-1}$ respectivement. Le spectre de la forme réduite est mesuré en réduisant en condition anaérobie la NROR par le NADH (21 μM final soit un rapport NADH sur FAD de 1.1). Ce spectre semble indiquer qu'il n'existe pas de stabilisation de formes semiquinones au cours de la réduction.

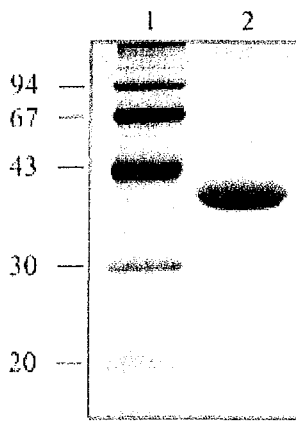


Figure 63 : Gel d'acrylamide (12%) SDS-PAGE coloration au nitrate d'argent (Bio-Rad Silver Stain kit). Puits 1 : marqueurs de tailles; Puits 2 : NROR purifiée.

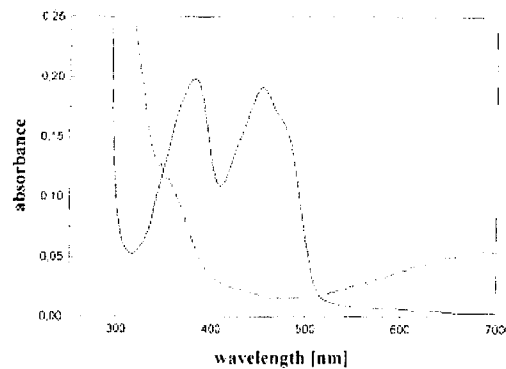


Figure 64 : Spectre UV-visible de la NROR purifiée ($0.81 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ligne continue : spectre d'absorption de la NROR oxydée; Ligne pointillée : spectre d'absorption de la NROR réduite.

La forme sélénée de la NROR de *C. acetobutylicum* a été produite selon une technique différente de celle communément utilisée (Ramakrishnan *et al.*, 1993). Ne disposant ni de la souche auxotrophe pour la méthionine ni du matériel de biologie moléculaire nécessaire à la préparation de la construction génétique de surexpression, nous avons surexprimé la forme sélénée de la NROR dans la même souche d'*E. coli* que la forme native.

La souche d'*E. coli* BL21(DE3) a été cultivée sur un milieu synthétique contenant tous les acides aminés. Avant l'induction par l'IPTG, de fortes concentrations en lysine, phénylalanine, thréonine, leucine et valine ont été ajoutées au milieu de culture avec pour conséquence l'inhibition des voies de biosynthèse endogènes de la méthionine (Doublé *et al.*, 1996). La machinerie cellulaire n'a alors d'autres possibilités que l'incorporation de la sélénométhionine ajoutée également en forte concentration dans le milieu.

La vérification de la substitution totale des cinq résidus méthionines présents dans la séquence de la NROR a été effectuée par spectrométrie de masse (analyse en electrospray) dans le laboratoire de spectrométrie de masse bio-organique de Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaar. La masse de 42308.7 ± 0.5 Da correspond effectivement à celle de la NROR native ($42071,2 \pm 0.2$ Da) dont cinq atomes de soufre de numéro atomique $Z=16$ ont été remplacés par des atomes de sélénium de numéro atomique $Z=34$.

La purification de la forme sélénée de la NROR n'a pas nécessité d'aménagement du protocole de purification, par contre le rendement de production se trouve légèrement inférieur à celui de la forme native avec 2 mg de protéine par litre de culture.

III.3. Détermination de la structure de la NROR

III.3.1. Cristallisation des formes native et sélénée de la NROR

Les premiers essais de cristallisation ont été effectués sur la protéine native en testant l'ensemble des matrices d'échantillonnage disponibles au laboratoire à trois concentrations de protéines ($5, 15$ et 40 mg.mL^{-1}) et deux températures : 4°C et 20°C . Ces matrices commerciales proposent de larges gammes de conditions de cristallisation en balayant la plupart des agents précipitants, des sels et des tampons (donc des zones de pH). Ces conditions ont été testées par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue (McPherson, 1990). Ces premiers essais n'ont pas permis de trouver directement une condition de cristallisation efficace pour la NROR, mais l'observation de précipités à caractère cristallin dans de nombreuses conditions contenant des polymères d'alcool de type polyéthylène glycol (PEG) nous a conduit à orienter nos essais dans cette direction. Des gammes de concentration en PEG de différents poids moléculaires (de 400 à 8000 Da) associés à différents tampons de pH variable ont permis de dégager une condition de cristallisation dans une zone de pH et de concentration en PEG très étroite.

Des cristaux de NROR native poussent à 20°C en quelques jours à partir d'une solution de PEG 4000 à 12% dans un tampon acétate de sodium à pH 4.6. Le mélange dans la goutte de cristallisation est composé de $2 \mu\text{l}$ de solution protéique concentrée à 30 mg.mL^{-1} et de $2 \mu\text{l}$ de la solution à 12% de PEG4000. Les rendements de cristallisation, assez médiocres, ont été améliorés en dialysant la protéine contre le tampon acétate de sodium à pH 4.6. Le tampon phosphate de potassium dans lequel la protéine est concentrée en fin de purification doit être éliminé. Afin d'augmenter la proportion et parfois la qualité des cristaux obtenus, les gouttes ne conduisant pas *ab-initio* à la cristallisation de la NROR ont étéensemencées par des micro-germes cristallins selon les différentes techniques décrites par Ducruix et Giégé

dans leur ouvrage de cristallogénèse (Giégé & Ducruix, 1990). Les cristaux de la figure 65 ont été obtenus par micro-ensemencement.

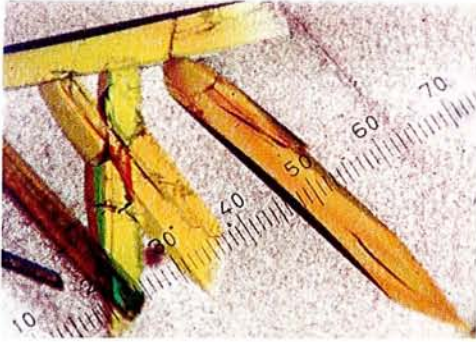


Figure 65 : Cristaux de la forme native de la NROR de *C. acetobutylicum*.
Taille : 2 x 0,3 x 0,3 mm

Les cristaux de la forme sélénée de la NROR sont apparus dans les mêmes conditions de cristallisation, sans micro-ensemencement à 20 °C, mais dans un délai plus long d'environ trois semaines. La taille des cristaux et le faciès plus compact de ceux-ci diffèrent de la forme native (figure 66).

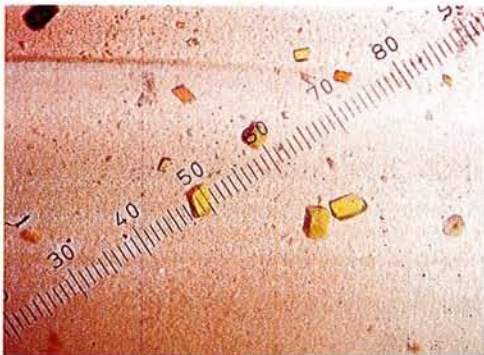


Figure 66 : Cristaux de la forme sélénée de la NROR de *C. acetobutylicum*.
Taille : 0.3 x 0.3 x 0.3 mm

III.3.2. Enregistrement des données de diffraction des rayons X

a) Collecte haute résolution à partir des cristaux de la forme native

Ces données ont été collectées sur la ligne de lumière X11 du synchrotron de Hambourg (DESY).

Les cristaux de la forme native de la NROR sont de forme monoclinique et de groupe d'espace $P2_1$ avec des paramètres de maille présentant un angle proche de 90° : $a = 47.1 \text{ \AA}$; $b = 76.1 \text{ \AA}$; $c = 56.7 \text{ \AA}$; $\beta = 90.25^\circ$. La grande taille des cristaux utilisés nous est tout

d'abord apparue comme un handicap pour les mesures à 100 K sous flux d'azote. En effet, les cristaux dépassant la taille de la boucle de nylon utilisée pour les monter sur la tête goniométrique du diffractomètre, il était difficile d'obtenir lors de la congélation des cristaux dans l'éthane liquide une enveloppe totalement protectrice de la solution de cryoprotection (solution de cristallisation enrichie en glycérol à hauteur de 10%). Les premiers clichés de diffraction mesurés sur ces cristaux confirmèrent nos craintes : ils sont apparus bruités, montrant de nombreux anneaux caractéristiques de la diffraction de la glace formée à la surface du cristal. Ce problème fut contourné par décongélation puis recongélation rapide sous le flux d'azote des cristaux. Cette technique dite d' "annealing" (Yeh & Hol, 1998) eut pour conséquence non seulement d'éliminer les anneaux de glace parasites mais également d'améliorer la qualité de diffraction des cristaux. Suite à ce traitement, la limite de résolution observée pour ces cristaux est de 1.01 Å, résolution inattendue pour des cristaux d'une protéine de cette taille (figure 67). Deux types de collecte ont été effectués sur le même cristal de NROR : la première collecte a permis de collecter un jeu de données à haute résolution (1.01 Å), le détecteur de type CCD étant rapproché au maximum de l'échantillon. La seconde collecte, plus rapide, a permis de mesurer les données de basse résolution (détecteur éloigné pour mesurer jusqu'à 4 Å de résolution), non collectées lors du premier passage car d'intensité saturante pour le détecteur. Les données statistiques sur la qualité de ces jeux de données moyennés sont présentées dans les tableaux 20 et 21.

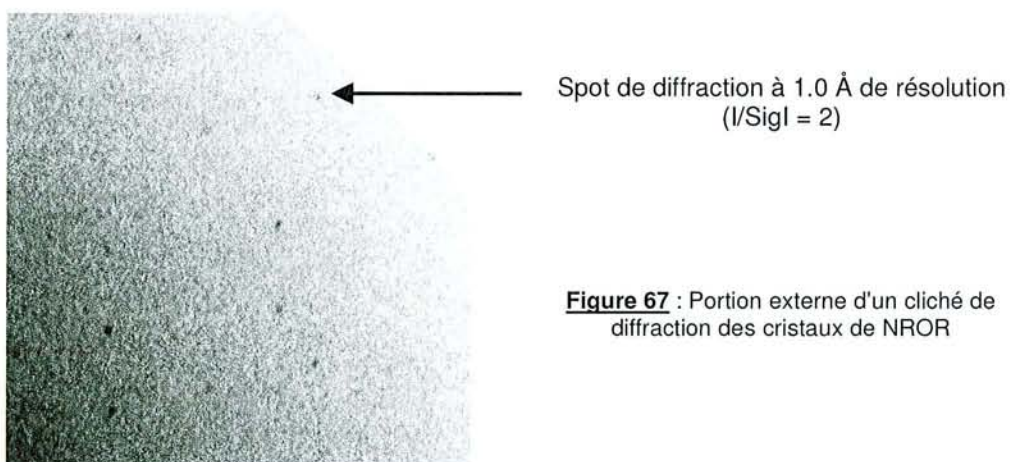


Figure 67 : Portion externe d'un cliché de diffraction des cristaux de NROR

Chaque jeu de données a été indexé et intégré en utilisant le logiciel DENZO (Otwinowky & Minor, 1997) puis ces données ont été réunies et mises à l'échelle avec le logiciel SCALEPACK (Otwinowky & Minor, 1997). Les statistiques répertoriées dans le tableau 8 ont été calculées par le programme RMERGE (Weiss & hilgenfeld, 1999) disponible à cette adresse : http://www.imb-jena.de/www_sbx/projects/sbx_qual.html. Différents facteurs

mesurent la qualité de ces données. Le facteur $R_{r.i.m}$ ("redundancy-independent merging R factor") est un meilleur indicateur de la précision de mesure des intensités diffractées que le facteur R_{merge} (R_m) conventionnel (Diedrich & Karplus, 1997 ; Weiss, 2001). Le facteur $R_{p.i.m}$ ("precision-indicating merging R factor") est un indicateur de la précision des données moyennées, il est décrit comme capable de prédire la qualité d'un jeu de données de diffraction en vue de la détermination d'une substructure liée à un diffuseur anomal (détermination basée sur des variations d'intensités mesurées) mais aussi de prédire la qualité de l'affinement cristallographique standard (Weiss, 2001).

Collecte réalisée sur la ligne de lumière X11 Hambourg (DESY)	
Résolution	1.01 Å
Température	100 K
Longueur d'onde	0.84 Å
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille	a = 47.1 Å; b = 76.1 Å; c = 56.7 Å; $\beta = 90.25^\circ$
Mosaïcité	0.37 °
Complétude	95.8 % (91.4 % dans la couronne de résolution 1.11-1.01)
I/SigI moyen	16.4

Tableau 20 : Principales données expérimentales de la collecte haute résolution des cristaux de NROR native

Résolution (Å)	Réflexions	Multiplicité	I	SigI	R_m	R_{sqm}	R_{rim}	R_{pin}
20-1.60	51473	4.98	29765.8	1414	0.039	0.046	0.043	0.018
1.60-1.27	50022	3.9	2196	230.5	0.079	0.079	0.081	0.041
1.27-1.11	49034	3.9	917.5	209.5	0.159	0.174	0.184	0.093
1.11-1.01	47658	3.76	321.9	191.3	0.384	0.367	0.448	0.229
Total	198187	4.15	8589.4	523.2	0.054	0.05	0.05	0.022

Tableau 21 : Statistiques de l'enregistrement des données sur le cristal de la forme native de la NROR à 1.01 Å de résolution

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

$$R_{r.i.m.} = \frac{\sum_{hkl} [N/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

$$R_{p.i.m.} = \frac{\sum_{hkl} [l/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

$$R_{merged-l} = \frac{\sum_{hkl} |I_1(hkl) - I_2(hkl)|}{\sum_l [I_1(hkl) + I_2(hkl)]}$$

b) Collecte des données de type MAD à partir les cristaux de la forme sélénée de la NROR

Les données ont été collectées sur la ligne de lumière FIP (BM30A) de l'ESRF à Grenoble.

Les cristaux de la forme sélénée de la NROR sont de même forme cristalline et de même groupe d'espace que la forme native. Les caractéristiques cristallographiques de ces cristaux sont condensées dans le tableau 22.

Collecte réalisée sur la ligne de lumière BM30A (ESRF)	
Groupe d'espace	P 2 ₁
Paramètres de maille	a = 47.2 Å; b = 76.7 Å; c = 56.7 Å; $\beta = 90.38^\circ$
Mosaïcité	0.38 °

Tableau 22 : Caractéristiques des cristaux de NROR sélénée

La méthode reposant sur la mesure d'intensités de diffraction conduisant à de petites différences d'intensité (cf annexe), elle nécessite des mesures précises. La collecte est précédée d'une mesure d'émission de fluorescence par le cristal irradié, afin de déterminer précisément les longueurs d'onde caractéristiques du seuil K du sélénium (figure 68).

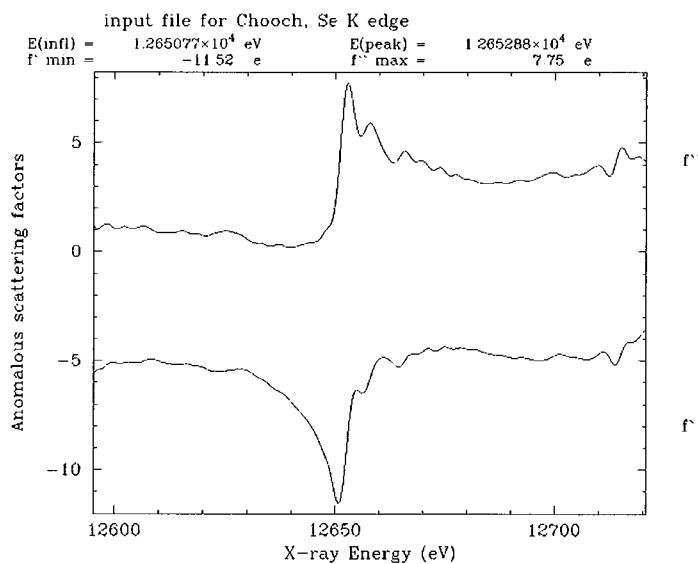


Figure 68 : Variation des facteurs f' et f'' au seuil K du sélénium obtenue pour le cristal de NROR sélénée. Programme CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001)

De manière à optimiser les différences d'intensité dues au signal anomal nous avons enregistré quatre ensembles de mesures. Deux au seuil d'absorption, pour des valeurs de f' minimum (-11.52 électrons) et f'' maximum (7.75 électrons), et deux autres à des énergies supérieures et inférieures au seuil.

Les collectes enregistrées pour les valeurs des facteurs f' minimum (12650.77 eV) et f'' maximum (12652.88 eV) sont appelées inflexion et pic respectivement dans le tableau 23. Les deux autres collectes sont nommées « remote » haute et basse énergie. Ce tableau résume les statistiques des collectes.

	Inflexion	Pic	"Remote" basse énergie	"Remote" haute énergie
Secteur angulaire	360 °			
Résolution Å	30 -1.98			
Longueur d'onde Å	0.9801	0.9799	0.9763	0.984
Réflexions	28361	28348	28463	28294
R_{sym} %	5.3 (11.9)	5.7 (11.4)	5.1 (12)	4.3 (14.7)
Complétude %	99.9 (99.4)	99.9 (99.4)	99.9 (100)	99.3 (89.6)
Multiplicité	7<>8			

Tableau 23 : Caractéristiques des données MAD collectées sur les cristaux de la NROR séléniée (les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière couronne de résolution)

Le traitement des données et plus particulièrement l'automatisation du fonctionnement de la ligne de lumière FIP(BM30A) a fait l'objet d'une attention particulière de la part de ses responsables. Ceux-ci viennent de publier les premières cartes de densité électronique d'un modèle issues d'un processus totalement automatique depuis le montage du cristal sur la tête goniométrique par un robot en passant par le traitement des données et la résolution du problème de la phase (Jacquamet *et al.*, 2003).

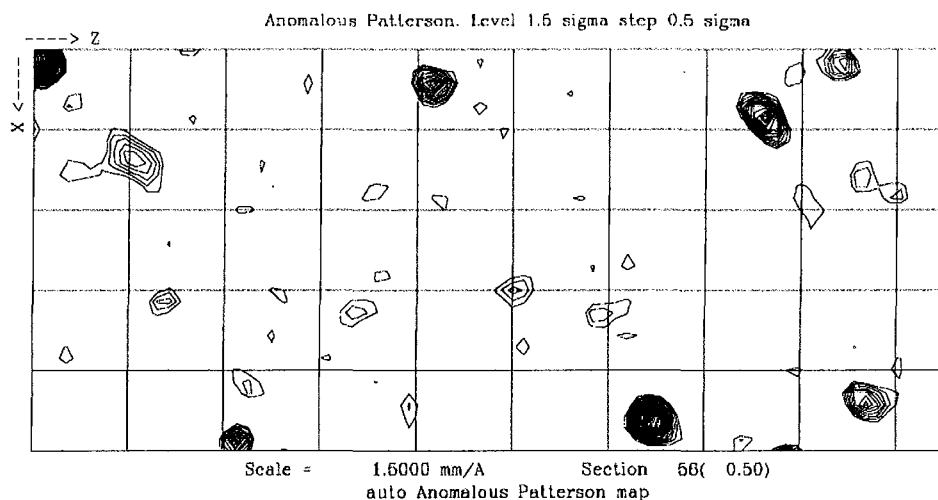


Figure 69 : Section de Harker $w=1/2$ de la carte de Patterson anormale obtenue à partir des données collectées au pic sur le cristal de NROR sélénié. Carte contourée par pas de 0.5 à 1.5

Au moment où nos collectes ont été réalisées, seule la procédure de traitement automatique des données nommée ADP était disponible (Ferrer, 2001). Cette procédure consiste simplement en la concaténation de différents scripts en un seul faisant appel aux différents programmes communément utilisés. Ainsi les données ont été indexées puis intégrées par le logiciel DENZO (Otwinowky & Minor, 1997) et mises à l'échelle par le programme SCALEPACK (Otwinowsky & Minor, 1997). ADP poursuit en calculant les facteurs de structures à partir des intensités mesurées avec le programme TRUNCATE (French *et al.*, 1978) de la chaîne de programme CCP4 (Collaborative Computational Project 4, 1994) puis calcule les cartes de Patterson des différences anormales avec RSPS de CCP4 (Knight, 1999) afin de localiser dans la maille les diffuseurs anormaux (figure 71). Cette procédure a fonctionné dans notre cas et cinq pics forts sont retrouvés dans les cartes de Patterson anormales, comme attendu, dans la section de Harker $w=1/2$ (figure 69).

III.3.3. Phasage par la méthode SAS (Singlewavelength Anomalous Scattering) et obtention du premier modèle

La substructure des atomes de sélénium au sein de la maille cristalline a pu être déterminée par le programme *Shake-and-Bake* (SnB) version 2.1 (Weeks *et al.*, 1999) en utilisant uniquement les données collectées au pic. Les paramètres initiaux utilisés par *SnB* sont résumés dans le tableau 24 :

Nombre d'invariants	15000
Réflexions utilisées	2500
Nombre de sites recherchés	5
Nombre de cycles de <i>SnB</i>	30
Nombre d'essais	1000

Tableau 24 : Paramètres de *SnB* pour résoudre la substructure

La figure 70 représente un histogramme typique de solution de *SnB*, caractérisé par une distribution bi-modale des figures de mérite R_{min} en fonction du nombre d'essais.

Cinq positions correspondant au minimum de la fonction d'énergie ont été trouvées 70 fois sur 1000 essais par le programme. Ces positions ont été affinées (figure 71) et les phases correspondantes calculées par le programme MLPHARE de CCP4 (Collaborative Computational Project 4, 1994). L'unique affinement des occupations anormales s'est avéré suffisant pour l'obtention d'un premier jeu de phases de qualité.

Les phases issues de MLPHARE ont été améliorées et étendues à 1.01 Å de résolution par aplatissement de solvant avec le programme DM (Cowtan & Main, 1996). La figure de mérite moyenne à ce stade est de 0.86.

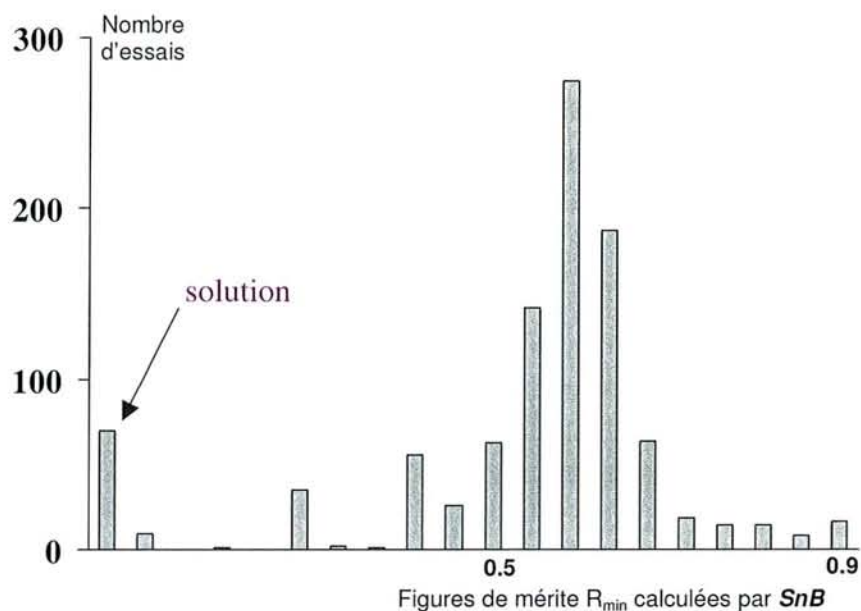


Figure 70 : Diagramme des solutions données par *SnB* sur les données collectées au pic

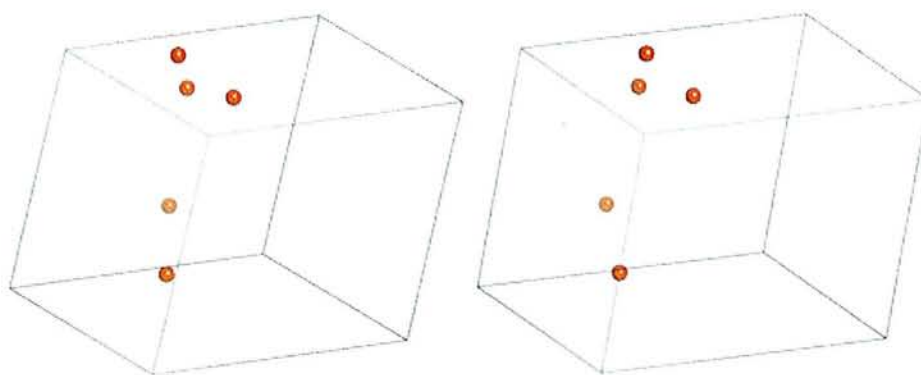


Figure 71 : Vue stéréoscopique de la position des atomes de sélénium dans la maille cristalline monoclinique.

Enfin, les phases issues du nivellement de solvant ont été utilisées pour calculer une carte de densité électronique de départ pour la procédure de reconstruction et d'affinement

automatique implémentée dans le programme *ARP/wARP* 5.1 (Perrakis *et al.*, 1999). Le diagramme de la figure 72 résume les grandes étapes de cette procédure.

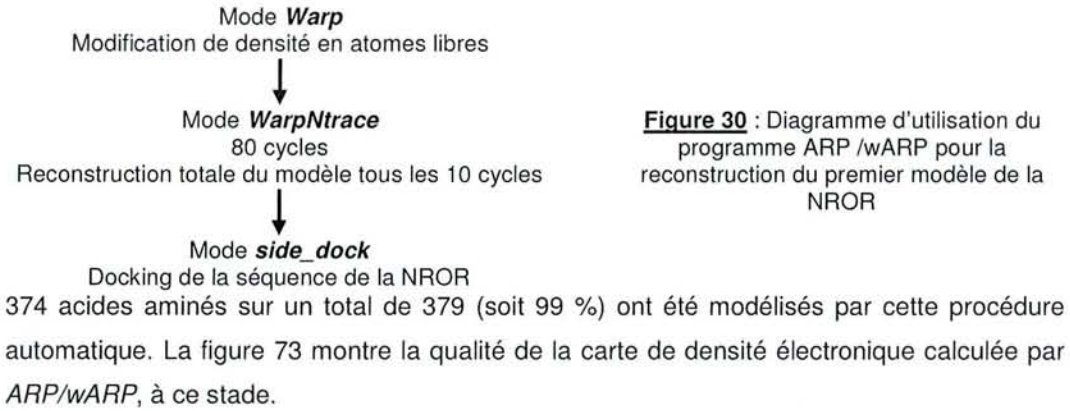


Figure 30 : Diagramme d'utilisation du programme *ARP/wARP* pour la reconstruction du premier modèle de la NROR

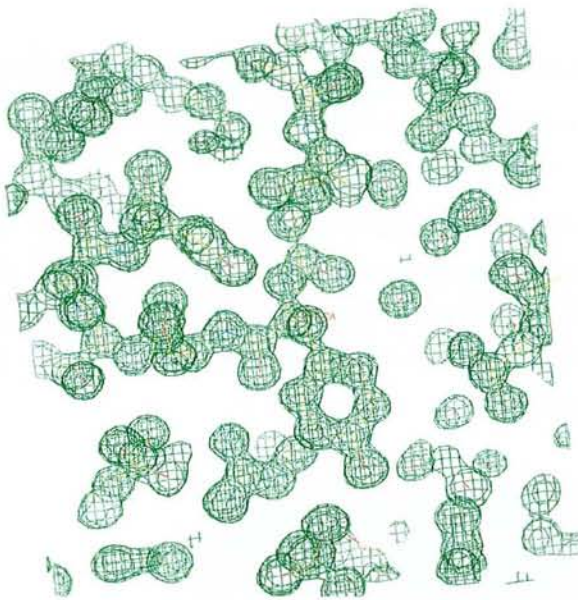
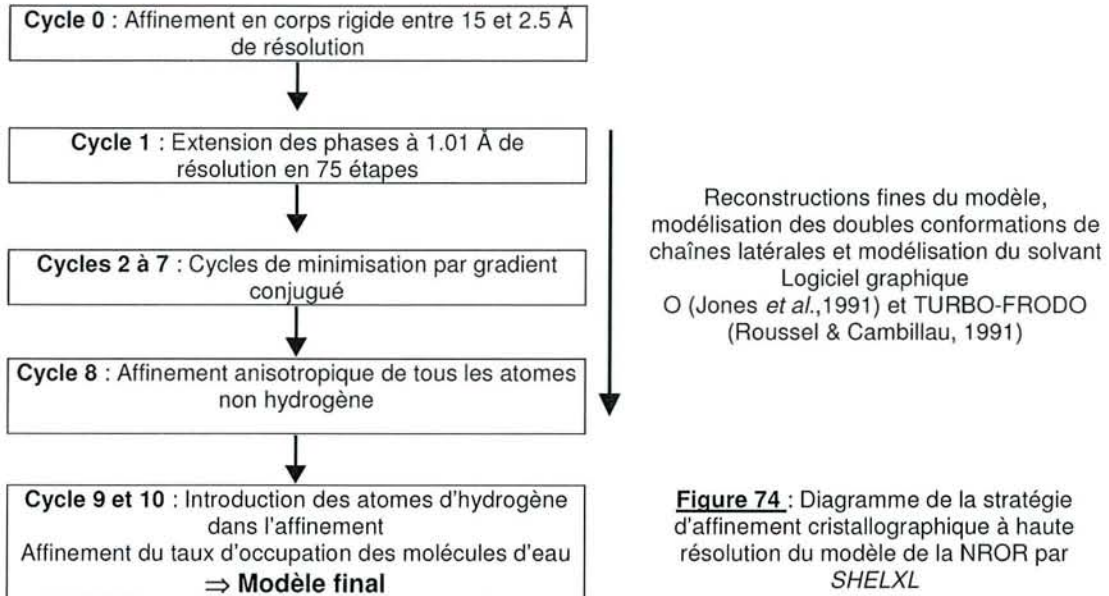


Figure 73
Carte de densité électronique $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contour 2) calculée par *ARP/wARP* après docking de la séquence en acides aminés.
(Capture d'écran du logiciel Turbo-Frodo)

III.3.4. Affinement du modèle à haute résolution

L'affinement du modèle à haute résolution a été mené dans ses premières étapes dans le laboratoire du professeur R. Hilgenfeld à l'Institut de Biologie Moléculaire (IMB) lors d'un séjour d'une semaine à Jena afin de profiter de l'expérience dans ce domaine du docteur M. Weiss.

L'affinement cristallographique à 1 Å de résolution du modèle de la NROR a été réalisé en utilisant le programme *SHELXL* issu de la suite *SHELX97* (Sheldrick, 1993 ; Sheldrick & Schneider, 1997). Le diagramme de la figure 74 présente la stratégie d'affinement utilisée.



SHELXL utilise les contraintes stéréochimiques définies par Engh & Huber (1991). Toutes les réflexions ont été incluses dans l'affinement sans coupure en . 1% des données ont été sélectionnées au hasard et retirées de l'affinement pour l'analyse en validation croisée via le calcul du facteur R_{free} (Brünger *et al.*, 1992). L'évolution de ces paramètres statistiques au cours de l'affinement est représentée sur la figure 75.

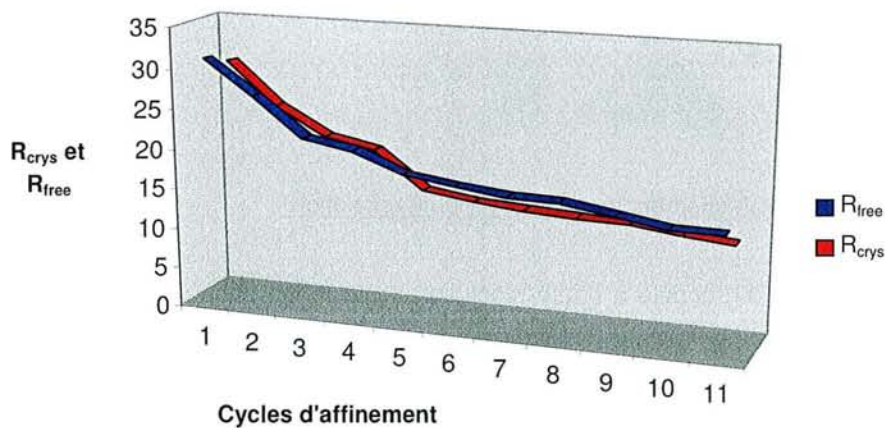


Figure 75 : Evolution des facteurs d'accord cristallographique R_{crys} (rouge) et R_{free} (bleu) au cours de l'affinement avec *SHELXL*

La première étape de l'affinement consiste en 50 cycles d'affinement en corps rigide dans l'intervalle de résolution 15-2.5 Å. La résolution est ensuite augmentée progressivement par différents cycles de minimisation par gradient conjugué ("CGLS"). A partir de cette étape les molécules d'eau ont été modélisées à partir des cartes de Fourier différence $F_{obs}-F_{calc}$ (niveau de contour 4 σ). A ce stade de l'affinement, les facteurs d'accord cristallographique sont respectivement de 26.9% et 24.5% pour les R_{free} et R_{crys} . Les valeurs par défaut du programme pour les distances, la planarité, les restreintes chirales et la modélisation du solvant désordonné ont été utilisées. Aucune restreinte n'a été appliquée sur la molécule de FAD afin de détecter une éventuelle stéréochimie inhabituelle. Les cycles de reconstruction graphique du modèle avec le logiciel O (Jones *et al.*, 1991) couplés aux cycles de minimisation d'énergie (10-30, CGLS) et d'affinement isotropique des facteurs d'agitation thermique B abaissent le facteur R_{crys} à 19.2 % et le facteur R_{free} à 21.1 %. L'affinement des paramètres de déplacement anisotropique (ADPs) des atomes de la protéine fait chuter ces statistiques de 3 % (R_{crys} 15.3% ; R_{free} 18.7%). L'étape ultime de l'affinement consiste à inclure les atomes d'hydrogène en accord avec les critères géométriques et à affiner les paramètres d'occupation du solvant. Le modèle final obtenu après convergence des cycles de minimisation d'énergie (CGLS) atteint des valeurs du facteur R de 12.00 % pour 155434 réflexions avec $F_{obs} > 4 \sigma$ (F_{obs}) et 12.84% pour les 198193 réflexions uniques mesurées au total. La qualité du modèle a été évaluée par les programmes PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) et SHELXPRO (Sheldrick & Schneider, 1997). Ces données sont répertoriées dans le tableau 25 et illustrées par le diagramme de Ramachandran de la figure 76.

Intervalle de résolution (Å)	15-1.01
Facteur R_{crys} (198193 réflexions) (%)	12.84
Facteur R_{free} (1981 réflexions) (%)	14.7
Nombre de molécules d'eau	435
Nombre de doubles conformations de chaînes latérales	25
<u>r.m.s.d (déviation standard par rapport à la géométrie idéale)</u>	
Longueurs des liaisons (Å)	0.016
Angles (°)	0.031
Planarité (°)	0.026
<u>Statistiques du diagramme de Ramachandran</u>	
Résidus dans les régions les plus favorables (%)	90.5
Résidus dans les régions autorisées (%)	9.2
Résidus dans une région moins favorable (%)	0.3
Résidus dans des régions interdites (%)	0

Tableau 25 : Caractéristiques et statistiques du modèle final de la NROR

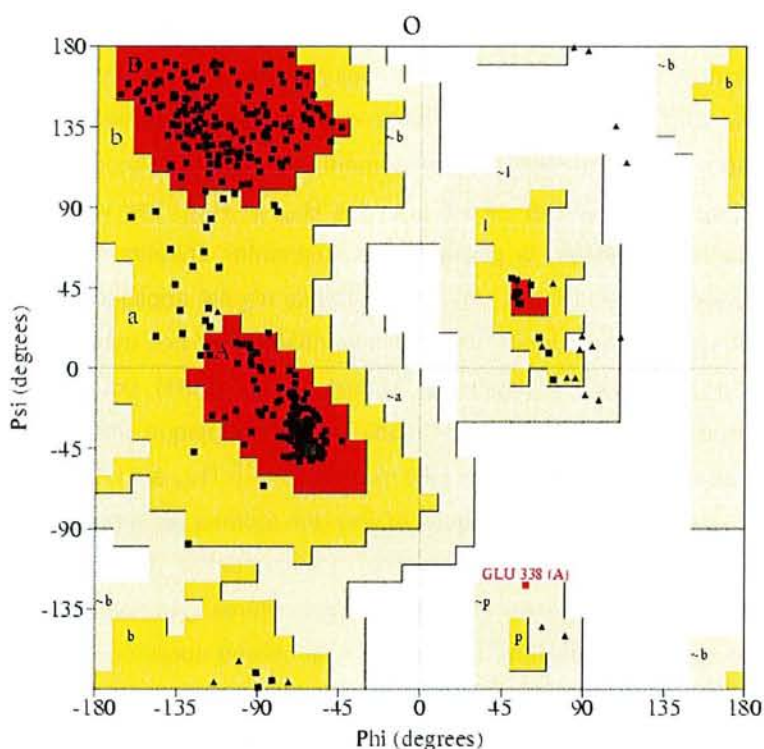


Figure 76 : Diagramme de Ramachandran du modèle final de la NROR à 1 Å de résolution. Seul le résidu glutamate 238 possède des angles de torsion qui le place dans une région moins favorable du diagramme.

III.4. Description de la structure de la NROR

III.4.1 Structure globale

La structure globale de la NROR de *C. acetobutylicum* présente un repliement caractéristique des flavoprotéines de la sous-famille GR1 définie par Dym et Eisenberg (cf introduction) dans sa classification des protéines de la famille de la glutathione réductase (GR). Le monomère se compose de trois domaines organisés en forme de V très marqué dans le cas de la NROR (figure 77).

La recherche de voisins structuraux dans la PDB via le serveur CE (Combinatorial Extension ; Godzik, 1995) confirme l'appartenance de la NROR à la famille de repliement de type GR. En effet, les quarante premières structures classées par CE appartiennent à cette famille. Cependant, la structure la plus proche de celle de la NROR, correspond à celle du domaine ferrédoxine réductase (BphA4) de la biphényl dioxygénase de la souche KKS102

Pseudomonas sp. (Senda *et al.*, 2000). La déviation standard (r.m.s.d) sur la position des atomes de carbone alpha du module composé des domaines FAD et NADH (NADPH pour BphA4) de ces deux structures est de 1.4 Å malgré la faible identité de séquences (20 %). Cette structure n'est pas référencée par Dym et Eisenberg dans leur classification bien que répondant aux critères d'appartenance à la famille GR₁. Notons que comme la NROR, BphA4 doit transférer des électrons à une protéine fer-soufre (la ferrédoxine) au cours de la réaction qu'elle catalyse.

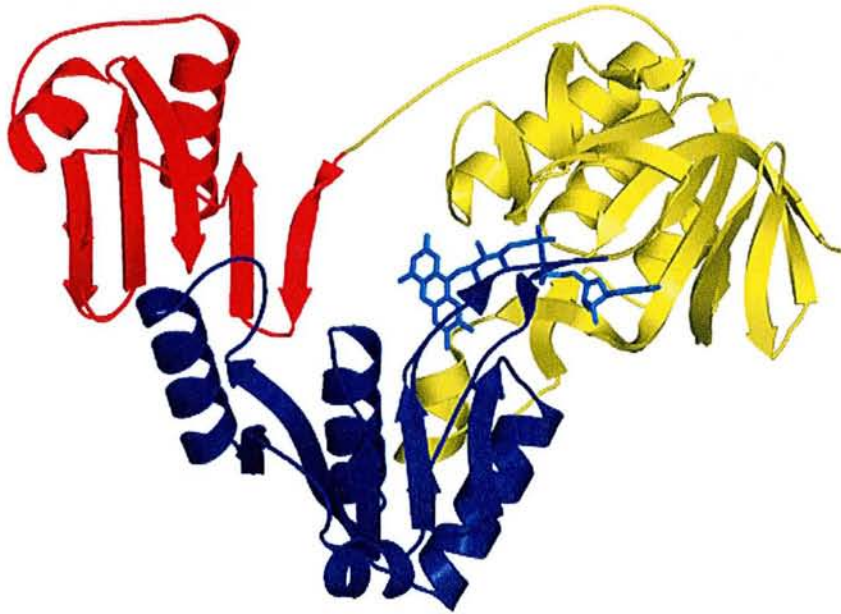


Figure 77 : Représentation en mode ruban de la structure tridimensionnelle de la NROR. Le domaine de fixation du FAD est en jaune, le domaine du NADH en bleu et le troisième domaine en rouge. Le FAD est représenté en marine en mode bâton. Figure générée par le logiciel PyMOL version 0.90 (DeLano Scientific, 2003)

La caractéristique principale et originale de la structure globale de la NROR au sein de la famille GR₁ réside dans la position du troisième domaine par rapport au module constitué des domaines FAD et NADH. La structure de la NROR est beaucoup moins compacte : une grande boucle constituée des résidus 290 à 300 éloigne le domaine de fixation du FAD du troisième domaine en délimitant la partie supérieure d'un orifice qui traverse de part en part la structure. On constate également, comme le montre la figure 78, que les cycles isoalloxazine du FAD se trouvent beaucoup plus accessibles au solvant.

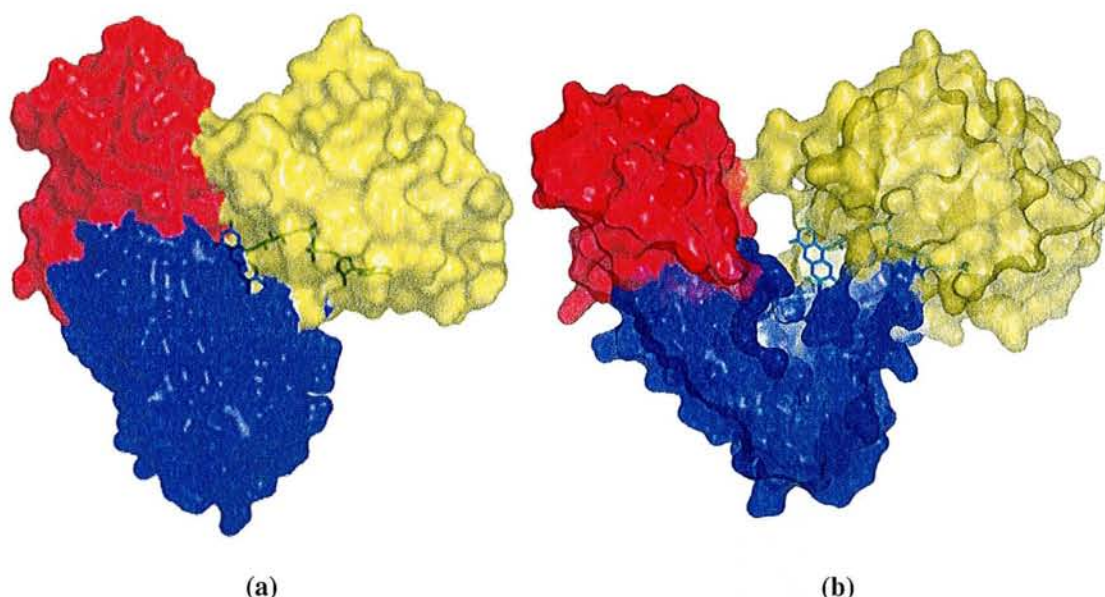


Figure 78 : Surface moléculaire de la NROR (b) et de BphA4 (a).
Le code couleur est identique à celui de la figure 77.

La compacité des trois domaines est une caractéristique de l'ensemble des structures de la famille GR₁. Dans toutes ces structures le troisième domaine est en interaction directe avec soit le domaine de fixation du FAD, soit le domaine de fixation du NADH, soit les deux. La NROR se distingue donc de cette famille en ce qui concerne la compacité, puisque le troisième domaine ne partage que peu d'interactions avec le reste de la structure. Cet aspect sera développé plus loin dans le manuscrit.

Les différences observées d'une protéine à l'autre au sein de la sous-famille GR₁ concernent essentiellement les boucles ou structures secondaires impliquées dans les interactions inter-domaines.

D'autres particularités spécifiques de la NROR et de BphA4, les distinguant encore de la famille GR₁, sont à noter : par exemple, les deux grandes hélices alpha (résidus 57 à 122) décrites comme impliquées dans la dimérisation et le mécanisme catalytique de la GR, et partageant de nombreuses interactions interdomaines (Karplus & Schulz, 1987), n'existent ni dans la structure de la NROR ni dans celle de BphA4 où la région équivalente est beaucoup plus courte (résidus 39 à 68 pour la NROR et 41 à 73 pour BphA4). La NROR et BphA4 présentent également des différences, la boucle constituée des acides aminés 260 à 269 du domaine de fixation du FAD de la NROR est plus courte de sept acides aminés comparée à celle de BphA4 (résidus 274 à 289) qui est en interaction avec le troisième domaine. Notons que l'équivalent de cette boucle est de taille minimale dans la structure de la glutathione réductase (GR) et ne partage aucune liaison hydrogène avec le troisième domaine. En

conclusion, à la vue des différences observées sur la taille et les interactions des boucles, la NROR et BphA4 pourraient constituer des membres d'une sous-famille de la sous-famille structurale GR₁. Cependant la NROR reste la structure la plus difficile à classer essentiellement du fait de la position de son troisième domaine et des interactions interdomaines observées.

Le domaine 3 de la structure de la NROR (résidus 300 à 379) se trouve donc excentré de 15° par rapport à la position de ce domaine dans les structures de la famille GR₁ lorsque sont superposés les modules FAD-NADH de ces différents modèles (figure 79). Ce déplacement ouvre le « V » que décrit la structure. Conjointement à ce déplacement, on observe une légère rotation autour de l'axe reliant les barycentres du domaine NADH et du troisième domaine.



Figure 79 : Superposition des modules FAD-NADH (carbones alpha) de trois membres de la famille GR₁. NROR : rouge ; GR : jaune ; BphA4 : vert

Les troisièmes domaines des structures de la famille GR₁, sont décrits comme des éléments moteurs de la multimérisation de ces protéines. En effet, contrairement à la NROR

physiologiquement active sous forme monomérique (Petitdemange *et al.*,1979), l'ensemble des structures de la famille GR₁ est de nature homodimérique au minimum. La superposition des troisièmes domaines de GR, BphA4 et NROR montre que ces domaines sont sensiblement repliés de manière similaire (figure 80) et organisés autour d'un feuillet antiparallèle à cinq brins.



Figure 80 : Vue stéréoscopique de la superposition des domaines 3 de GR (jaune), BphA4 (vert) et NROR (rouge)

La différence majeure dans la structure de ces domaines est liée à la taille de leur premier brin . Ce brin est constitué de six résidus (Pro299 à Ser304) et débute par une proline (Pro299 dans la NROR), position ultra-conservée dans toutes les structures de la famille GR₁. Ainsi, la proline Pro317 débute un brin composé de huit résidus (Pro317 à Gly324) dans la structure de BphA4. La particularité de la séquence de la NROR dans cette région est la présence d'un second résidu proline (Pro297), deux résidus en amont du début du brin . Cette proline supplémentaire engendre le prolongement de la boucle 290-299 et le décalage du début du premier brin (figure 81).

Ainsi, la région charnière précédant le premier brin du domaine 3 doit jouer un rôle primordial dans la position de ce troisième domaine dans les structures de la famille GR₁ et par conséquent dans la multimérisation de ces protéines. La NROR est la seule enzyme monomérique de cette famille décrite à ce jour. La mutagenèse dirigée de ces résidus proline et l'analyse de l'état d'oligomérisation de ces mutants devraient permettre dans un futur proche de répondre à ces interrogations.

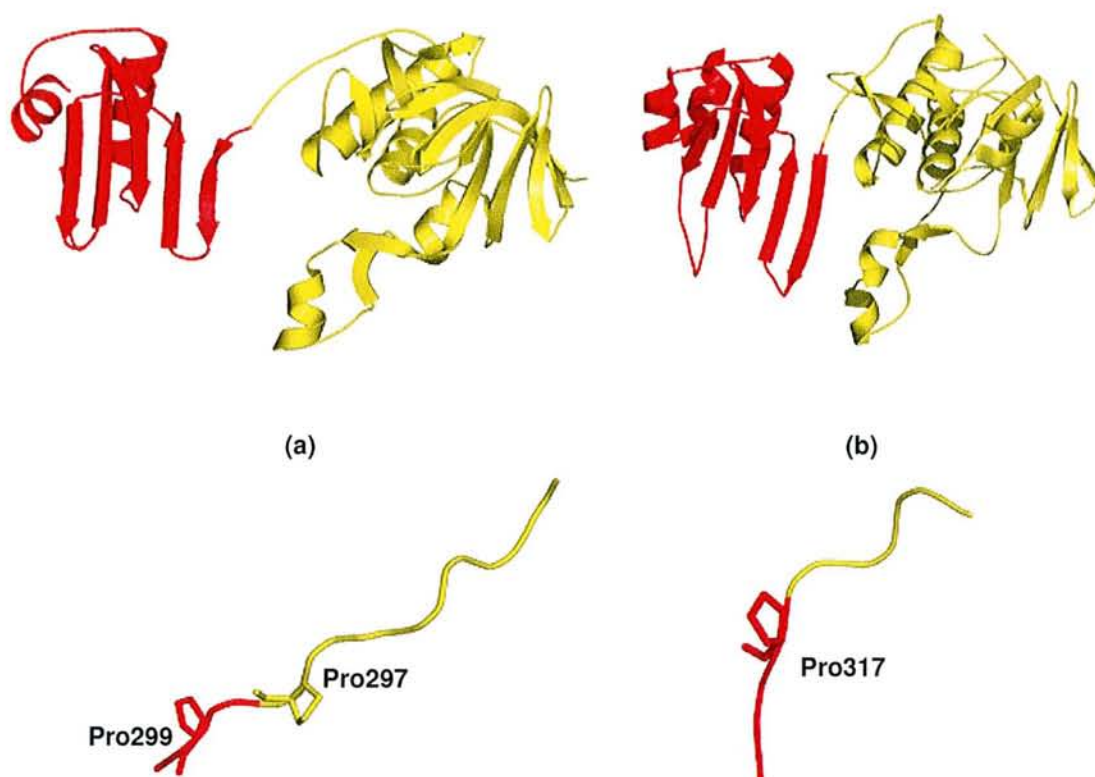


Figure 81 : Représentation des domaines FAD (rouge) et domaines 3 (jaune) de NROR (a) et BphA4 (b) ; En bas, agrandissement correspondant à la région charnière reliant ces deux domaines, à l'entrée du premier brin du domaine 3.

Une autre question soulevée par l'observation de la structure de la NROR concerne l'empilement cristallin dans la maille monoclinique. Celui-ci aurait-il pu contraindre le troisième domaine de la NROR dans une position non physiologique ?

D'après les paramètres de maille des cristaux et le poids moléculaire de la NROR, le taux de solvant peut être estimé à 50 % (coefficient de Matthews 2.46 Å³ par Dalton) ce qui correspond à la moyenne de ce qui est observé dans les cristaux de protéines.

Le troisième domaine de la NROR se trouve au sein du cristal en contact avec les domaines de fixation du FAD de deux molécules voisines et le domaine de fixation du NADH d'une troisième (figure 82). Ces contacts concernent essentiellement les deux hélices C-terminales du domaine (Asp349-Leu363 ; Ser371-Leu379). Aucun pont salin ni aucune liaison hydrogène impliquant directement deux résidus de deux molécules symétriques ne stabilise l'empilement. Les interactions impliquent toujours des molécules de solvant, bien que dans les zones les plus compactes une seule couche de solvation sépare les molécules symétriques. De ce fait, il semble peu raisonnable d'imputer le mouvement du troisième

domaine de la NROR, en comparaison avec les protéines de la même famille, à une force exercée par l'empilement des molécules dans le cristal.

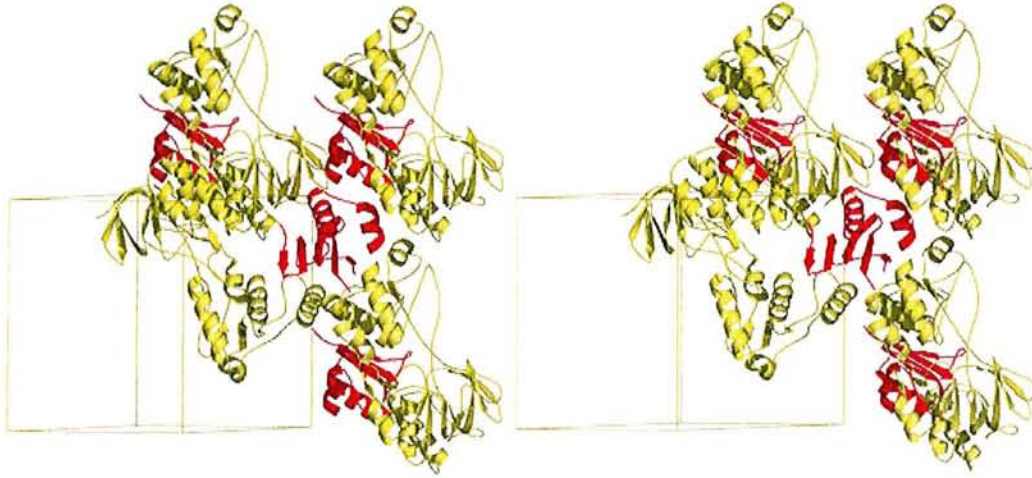


Figure 82 : Vue stéréoscopique de l'empilement cristallin de la NROR dans la maille monoclinique. Le troisième domaine de chaque molécule est représenté en rouge

III.4.2 Fixation du FAD

Le domaine de fixation du FAD de la NROR (résidus 1 à 106 et 225 à 290) est un repliement de Rossmann organisé autour d'un feuillet à cinq brins parallèles et complété de deux hélices α (figure 83), très similaire à celui des membres de la famille GR₁.

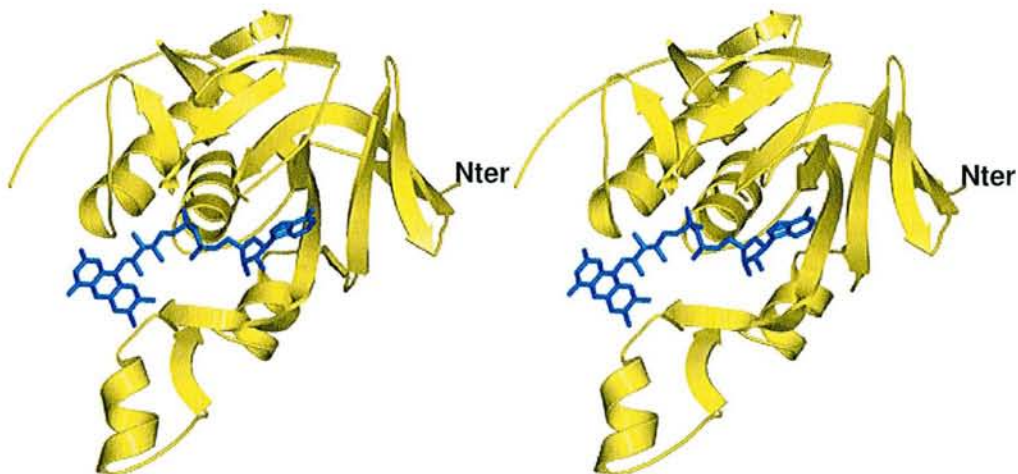


Figure 83 : Vue stéréoscopique du domaine de fixation du FAD (le FAD est en bleu)

Le FAD est fixé de façon non covalente en conformation étendue. La stabilisation de la partie ADP du FAD est comparable à celle observée dans les structures de la famille GR₁ (figure 84).

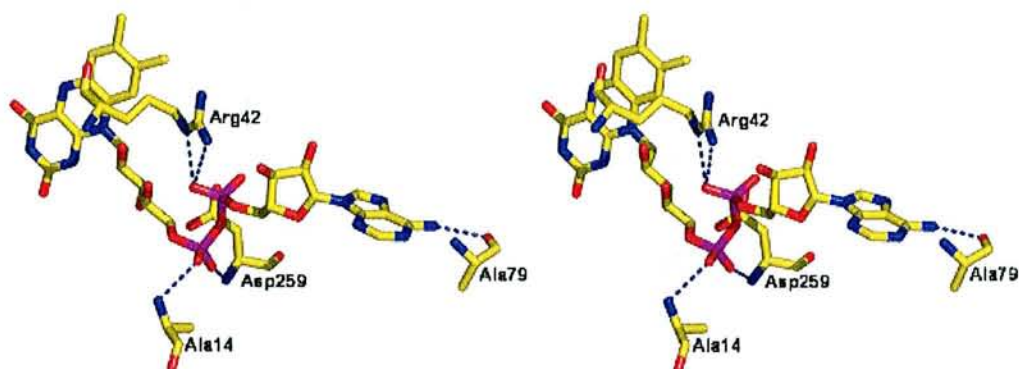


Figure 84 : Vue stéréoscopique des interactions stabilisatrices de la partie ADP du FAD de la NROR

Les distances interatomiques et les résidus impliqués dans la stabilisation sont répertoriés dans le tableau 26

Interactions	Distances (Å)
Asp259 N – O2P	2.88
Ala14 N – O1P	2.84
Arg42 N – AO1	3.28
Arg42 NH2 – AO1	2.82
Ala79 N6 – AN6	2.94

Tableau 26 : Distances interatomiques stabilisatrices de la partie ADP du FAD de la NROR

Le cycle isoalloxazine du FAD se décompose en une moitié xylène caractérisée par deux groupements méthyle et une moitié ptérine comportant les fonctions carboxyliques (cf figure 43).

La moitié xylène du cycle isoalloxazine est située comme dans les autres modèles dans une poche hydrophobe (figure 85) constituée des résidus Leu45, Leu124, Tyr125, Leu151 et Val223.

La partie aliphatique de la chaîne latérale de Arg42 participe également à l'ancrage de la partie hydrophobe du FAD.

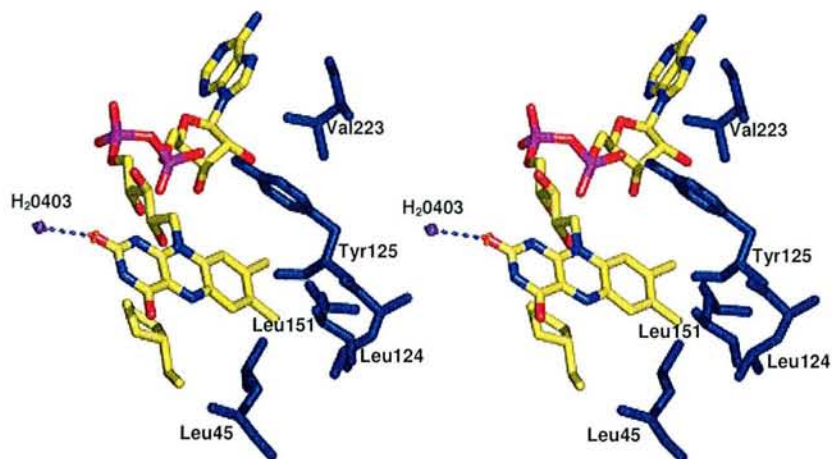


Figure 85 : Stabilisation de la partie xylène du cycle isoalloxazine du FAD de la NROR

La partie ptérine du cycle isoalloxazine est décrite dans tous les modèles de flavoprotéines comme se trouvant dans un environnement polaire positif destiné à augmenter le potentiel red/ox de la flavine (Ghisla & Massey, 1989).

L'atome O₂ du cycle isoalloxazine partage une liaison hydrogène avec l'atome d'azote de la fonction amide de la chaîne principale de Leu271 (figure 86). Cette leucine se situe à l'extrémité N-terminale d'une hélice (Leu271-Cys286) dont la charge positive partielle, induite par le macrodipôle qu'elle représente, participe à la stabilisation de la charge négative induite par la délocalisation des électrons dans cette moitié du cycle.

La différence majeure observée chez la NROR en comparaison des structures homologues dans la stabilisation de la partie ptérine du FAD concerne les atomes O4 et N5 qui ne partagent aucune interaction au sein du site actif de la NROR et sont totalement exposés au solvant. Dans toutes les structures de la famille GR₁ une lysine ultra-conservée forme une liaison hydrogène via son N avec le N5 du cycle isoalloxazine. Un résidu glutamate lui aussi conservé stabilise la lysine par un pont salin (figure 87). Cette série d'interactions stabilisatrices communes à tous les membres de la famille GR₁ mis à part la NROR est décrite comme un élément moteur du mécanisme catalytique de ces enzymes en participant à la catalyse du transfert d'hydrure (Pai *et al.*, 1983).

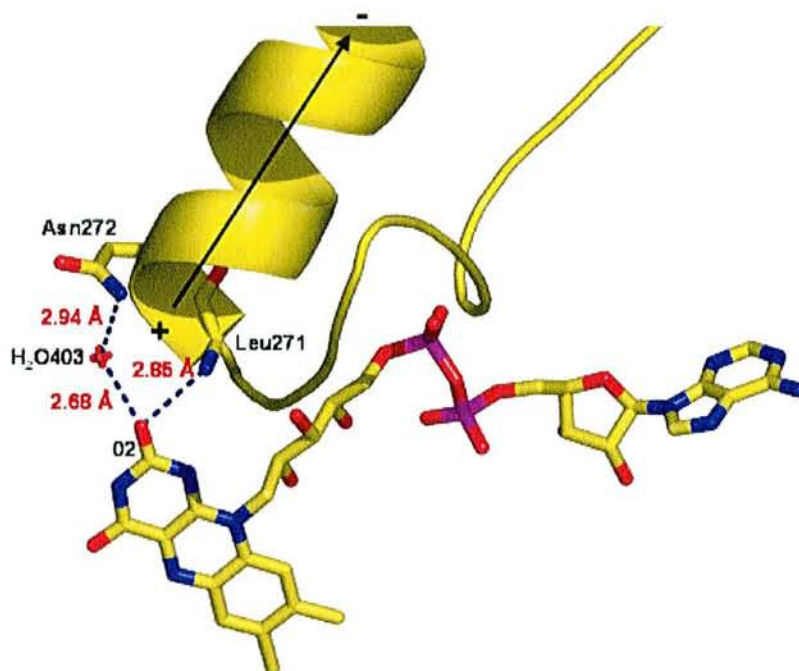


Figure 86 : Stabilisation de la moitié ptérine du cycle isoalloxazine de la NROR

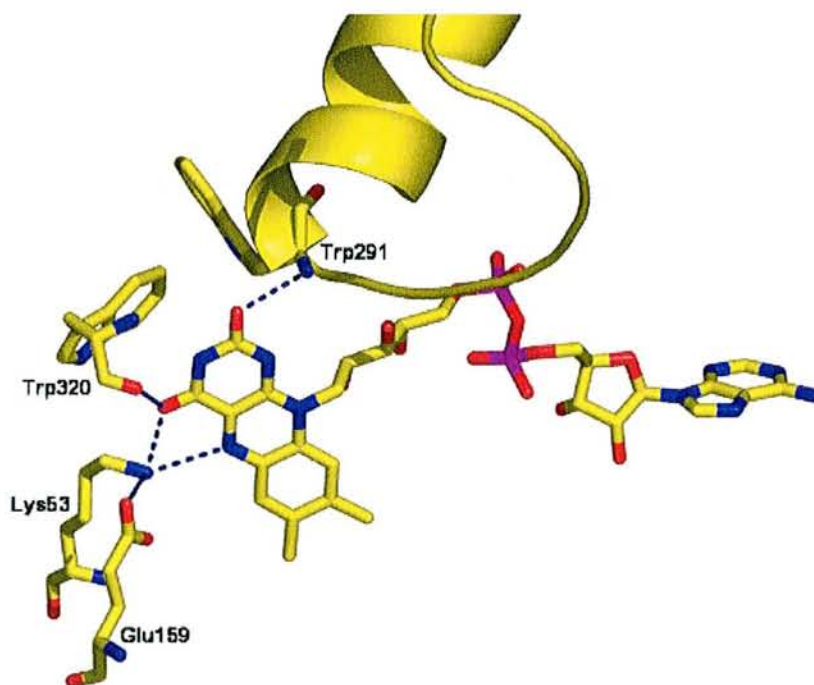


Figure 87 : Stabilisation de la moitié ptérine du FAD de BphA4

L'environnement protéique du FAD définit la réactivité spécifique des flavoenzymes (Massey & Hemmerich, 1980). Ces interactions sont de type liaisons hydrogène, interactions
 - Cependant, le mécanisme précis qui régit la façon dont ces interactions influencent les propriétés red/ox et catalytiques du coenzyme n'est pas encore bien compris.

La conformation préférentielle des cycles isoalloxazines de la forme totalement oxydée du FAD est attendue plane, alors que celle de la forme totalement réduite doit présenter une courbure selon l'axe N5,N10. Ces prédictions ont été confirmées par des analyses de chimie théorique (Zheng *et al.*, 1996) et par la résolution de structures cristallographiques de différents dérivés de flavine (Wouters *et al.*, 1995). Massey et Hemmerich ont proposé que l'un des mécanismes par lesquels une protéine contrôle les propriétés red/ox de son cofacteur FAD est un effet « conformationnel » sur les cycles isoalloxazines.

Le cycle isoalloxazine du FAD de la NROR dans sa forme oxydée n'est pas plan et présente une courbure autour de l'axe N5-N10 caractéristique des formes réduites (figure 88 et 89). Cette particularité n'est pas spécifique de la NROR, ce phénomène est déjà décrit par exemple pour les FAD des formes oxydées de la pyruvate oxydase ou encore de la triméthylamine déshydrogénase (Barber *et al.*, 1992 ; Lim *et al.*, 1986 ; Muller *et al.*, 1993).

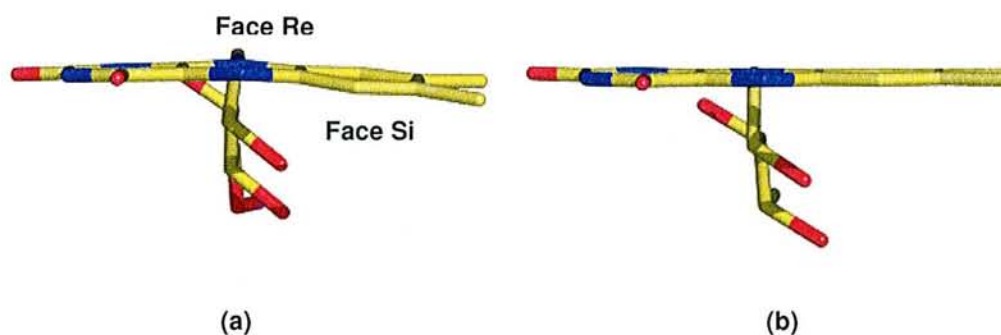


Figure 88 : Illustration de la courbure des cycles isoalloxazines du FAD de la NROR oxydée (a).
 (b) : Structure plane du FAD dans le site actif de la BphA4 sous forme oxydée

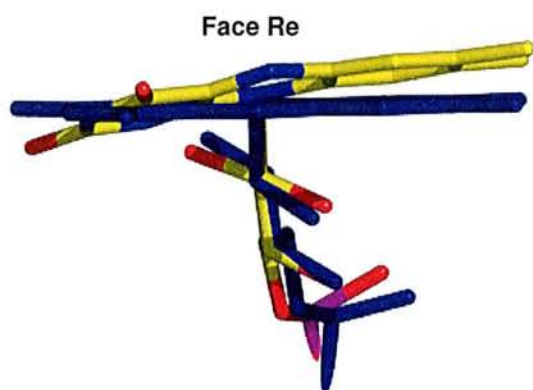


Figure 89 : Superposition des molécules de FAD de la NROR (jaune) et de BphA4 (bleu). La superposition est basée sur la partie ADP-ribitol des deux molécules.

La superposition des parties ADP-ribitol des FAD de la NROR et de BphA4 montre en plus de la courbure selon l'axe N5-N10, une rotation d'environ 10° de l'ensemble du cycle autour de la liaison N10-C1* (figure 89). L'absence de stabilisation des atomes O4 et N5 de la moitié xylène des cycles pourrait expliquer ce positionnement différent du FAD au niveau du cycle très largement exposé au solvant. Notons qu'aucune contrainte de planéité pour le cycle isoalloxazine n'a été imposée durant l'affinement à haute résolution, cette haute résolution permettant de quantifier avec précision les amplitudes de courbure.

La pyruvate oxydase (code PDB :1POW) constitue le modèle d'une des classes de flavoprotéines définies par Dym et Eisenberg (classe PO). Le cycle isoalloxazine du FAD de la forme oxydée de cette protéine présente une courbure prononcée selon l'axe N5-N10. La face Re des cycles est fortement concave et par conséquent la face Si convexe. Par contre, la face Re des cycles du FAD de la NROR est convexe (figure 90). L'amplitude de courbure des cycles du FAD de la NROR est moindre, cependant la face Re du FAD de la pyruvate oxydase se trouve dans un environnement très chargé qui influence fortement la conformation de ces cycles.

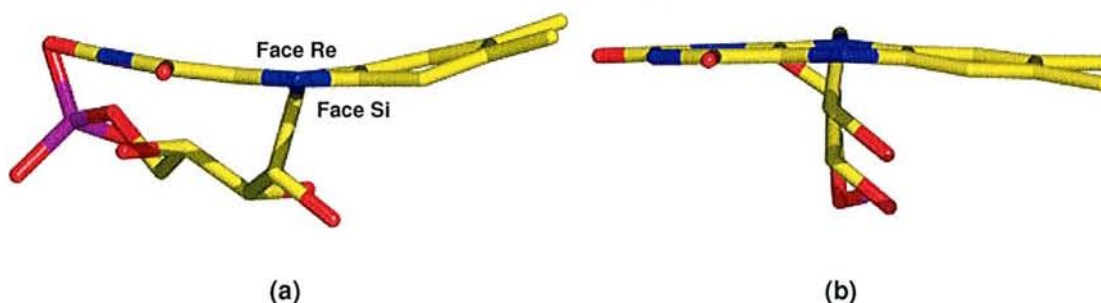


Figure 90 : Illustration de la courbure concave de la face Re du FAD de la pyruvate oxydase (a) et convexe de la face Re du FAD de la NROR (b). Vue dans l'axe N5-N10

Si la première étape des réactions red/ox catalysées par les flavoprotéines de la famille GR₁ oxydant le NADH semble être identique (Dym & Eisenberg, 2001), la seconde étape, de réoxydation du FADH₂ se trouve être beaucoup plus variable. En effet, les protéines de la famille GR₁ listées par Dym possèdent pour la plupart (exemple de la glutathion réductase) un pont disulfure (ou au moins une cystéine catalytique) conservé qui joue le rôle d'accepteur d'électrons pour oxyder le FADH₂. La BphA4 et la NROR ne possèdent pas ce pont disulfure. La face Si du FAD de ces dernières est en interaction avec un résidu proline (figure 91) en lieu et place du pont disulfure des disulfide réductases. Cette proline participe à l'ancrage du FAD et en particulier de la partie isoalloxazine au domaine. Sa position centrale en interaction avec le cycle N5-C4A-C10A-N10-C9A-C5A limite de trop grandes amplitudes de la rotation selon l'axe N10-C1*.

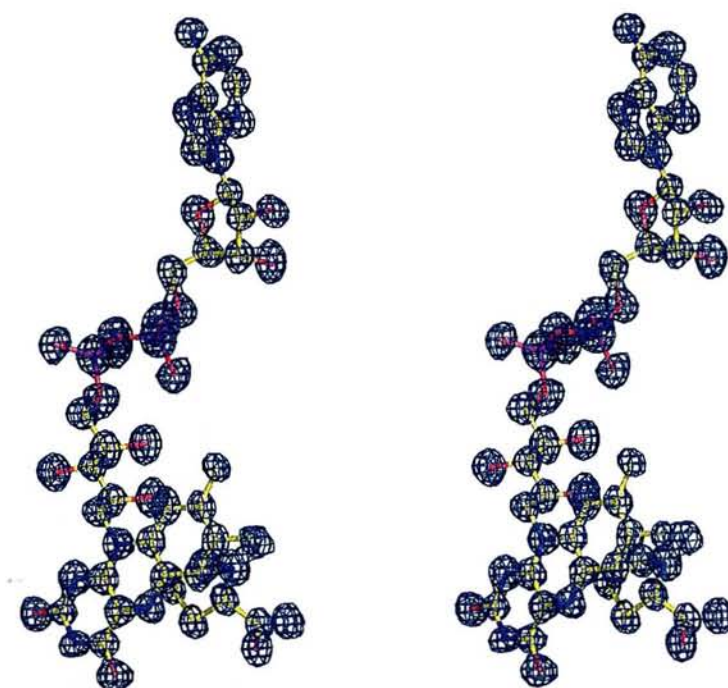


Figure 91 : Vue stéréoscopique de la densité électronique superposée au FAD et à Pro43 de la NROR.
Carte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ contournée à 2.5

La face Si du FAD de BphA4, comme pour les autres membres de la famille GR₁, interagit avec des résidus du troisième domaine et en particulier une triade Phe-Ser-Asp proche de la moitié xylène du FAD. Largement exposée au solvant, la phénylalanine de ce motif pourrait jouer un rôle dans le transfert d'électrons vers la ferrédoxine (Senda *et al.*, 2000).

suite CCP4 (Vagin *et al.*, 1997). Le modèle a été affiné en utilisant le programme CNS version 1.1 (Brünger *et al.*, 1998). Les caractéristiques du cristal, ainsi que les statistiques de collecte et d'affinement sont répertoriées dans le tableau 27.

Collecte	Paramètres
Paramètres de maille	a=46.47 Å; b=75.95 Å; c=56.91 Å; $\beta=90.04^\circ$
Groupe d'espace	P2 ₁
Longueur d'onde (Å)	0.84
Réflexions uniques	28909
R _{sym} (%)	5.6 (35)
Complétude (%)	100
I/SigI	14.8
Affinement	
R _{crys} %	19.8
R _{free} %	21.2
Molécules d'eau	166
r.m.s.d sur liaisons (Å)	0.02
r.m.s.d sur angles (°)	2.01

Tableau 27 : Caractéristiques de la collecte et de l'affinement de la structure du complexe NROR-NADH

b) Caractéristiques structurales du domaine de fixation du NADH de la NROR

Le domaine de fixation du NADH (résidus 106 à 224) est également un repliement de Rossmann. Sa topologie est organisée autour d'un feuillet parallèle à cinq brins complété de trois hélices. Ce domaine diffère de ceux des protéines de la famille GR₁ qui possèdent un feuillet antiparallèle à trois brins en lieu et place de l'hélice formée par les résidus 209 à 215 (figure 92). Une telle hélice est présente par exemple dans la structure du domaine de fixation du NAD⁺ de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Moras *et al.*, 1975). Cependant cette hélice se replie sur le feuillet central et participe directement à la fixation du NAD⁺. Dans la structure de la NROR complexée au NADH, l'hélice ne partage aucune interaction avec le cofacteur. Le feuillet présent dans les autres membres de la famille GR participe quant à lui à la stabilisation du cycle adénine en apportant la proximité de résidus à chaînes latérales hydrophobes.

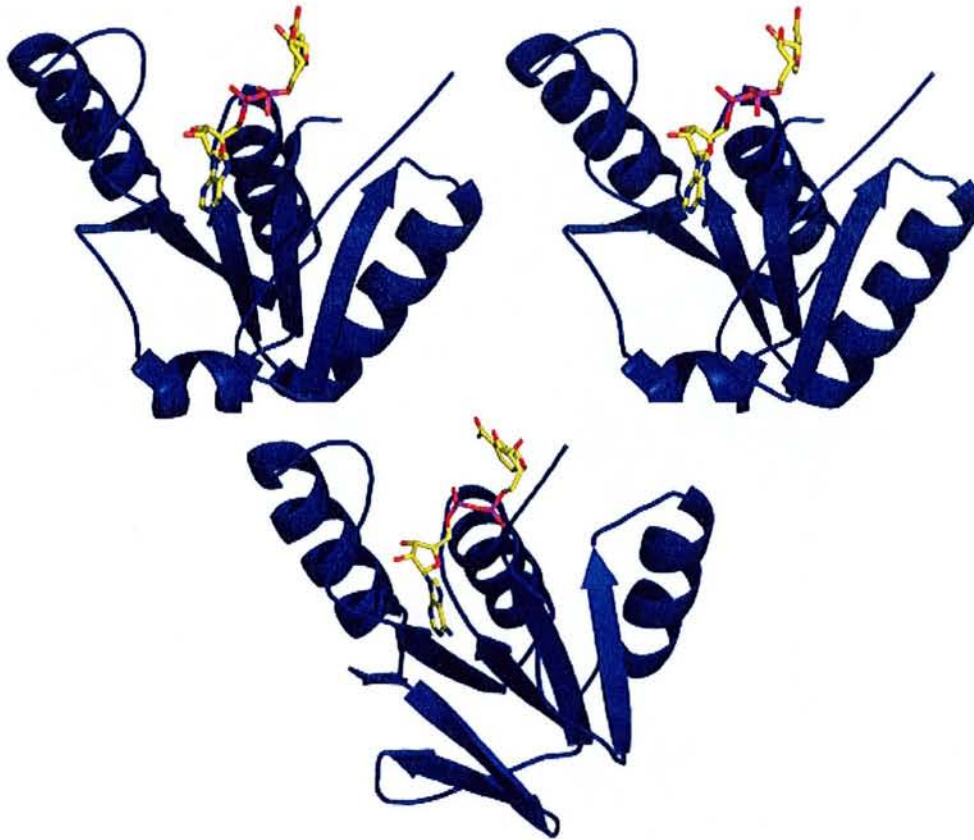


Figure 92 : **En haut** : Vue stéréoscopique du domaine de fixation du NADH de la NROR. Le NADH est issu de la structure cristalline du complexe NROR-NADH.
En bas : Représentation du domaine de fixation du NADH de BphA4 (code PDB 1F3P, Senda *et al.*, 2000).

c) Fixation du NADH et interactions avec le site actif

Dans les conditions de notre expérience il est difficile de connaître exactement l'état d'oxydation du NADH ou NAD⁺ dans le site de fixation, dans la suite de ce chapitre je continuerai cependant à citer le NADH. Ce dernier a d'ailleurs été assez difficile à modéliser dans la densité électronique. La partie ADP du cofacteur se trouve bien résolue alors que la partie nicotinamide et surtout le ribose précédant ce cycle semblent beaucoup plus agités, mais une seule conformation du cofacteur NADH a cependant été modélisée (figure 93).

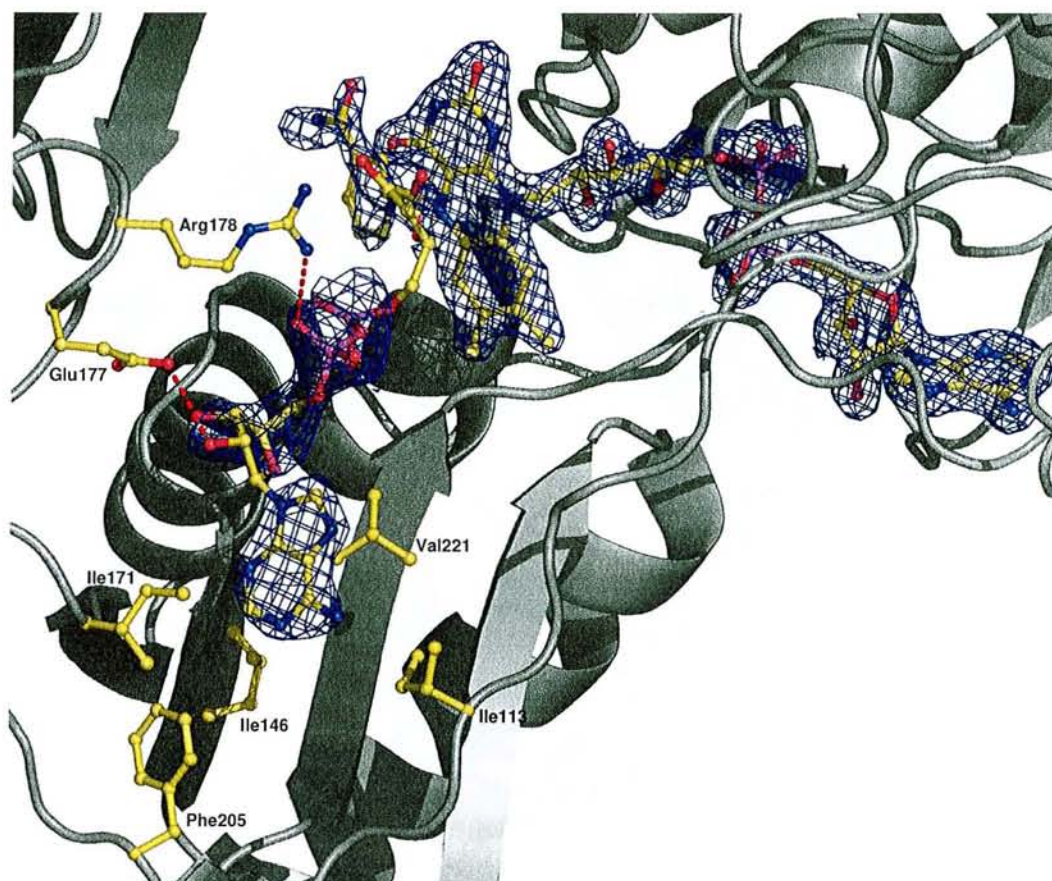


Figure 93 : Représentation du site actif du complexe NROR-NADH.
 Superposition de la densité électronique sur le FAD et le NADH. $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ (1.2 σ) autour du FAD.
 Carte omit $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ (3 σ) autour du NADH

La partie adénine du NADH est positionnée dans une poche hydrophobe délimitée par les chaînes latérales des résidus Ile113, Ile146, Ile171, Phe205 et Val221. Ces interactions sont en nombre supérieur en comparaison de la stabilisation de la moitié adénine du NADH dans le site actif de BphA4 (figure 95). La position Arg178 de la NROR (Arg183 chez BphA4) est une position conservée dans la famille des protéines GR₁ fixant un second cofacteur nucléotidique. La chaîne latérale de Arg178 (NH₂) stabilise l'atome d'oxygène AO2 du NADH (figure 94). Cette interaction est une liaison hydrogène forte dans le site de BphA4 (distance 2.55 Å) mais beaucoup moins dans le site de la NROR (distance 3.6 Å) où la chaîne latérale de Arg178 se trouve relativement agitée. Glu177 possède également un équivalent dans le site de BphA4 pour la stabilisation du ribose de l'adénine. La distance entre Glu177 OE1 et l'atome d'oxygène du ribose O2* est de 3.16 Å dans le site de la NROR contre 2.6 Å (Glu175 OE1 avec O2*) dans celui de BphA4. On constate donc encore la faiblesse des interactions stabilisatrices dans le modèle du complexe de la NROR.

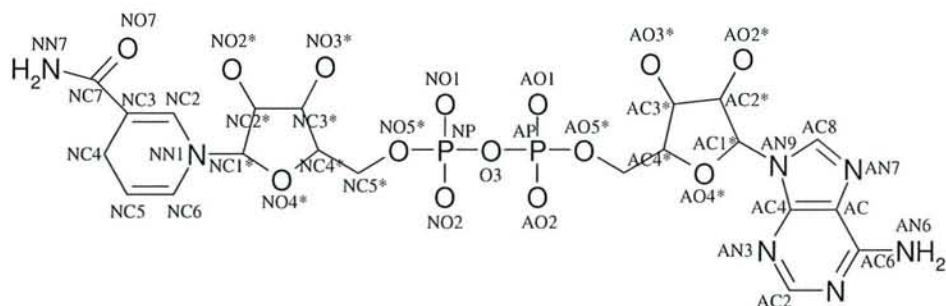


Figure 94 : Nomenclature des atomes de la molécule de NAD

Contrairement à ce qui est observé pour BphA4, la partie nicotinamide du NADH dans le complexe NROR-NADH n'est absolument pas stabilisée par l'environnement protéique. Le cycle est observé cependant dans la même position en interaction - avec les cycles isoalloxazines. Dans le site de BphA4, l'atome d'azote NN7 partage des liaisons hydrogènes avec l'oxygène de la chaîne principale d'un résidu tryptophane (Trp320) et l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'un résidu glutamate (Glu159). De plus le cycle nicotinamide, se trouve pris en étau entre les cycles isoalloxazines du FAD et la chaîne latérale hydrophobe d'une valine (Val155) (figure 95).

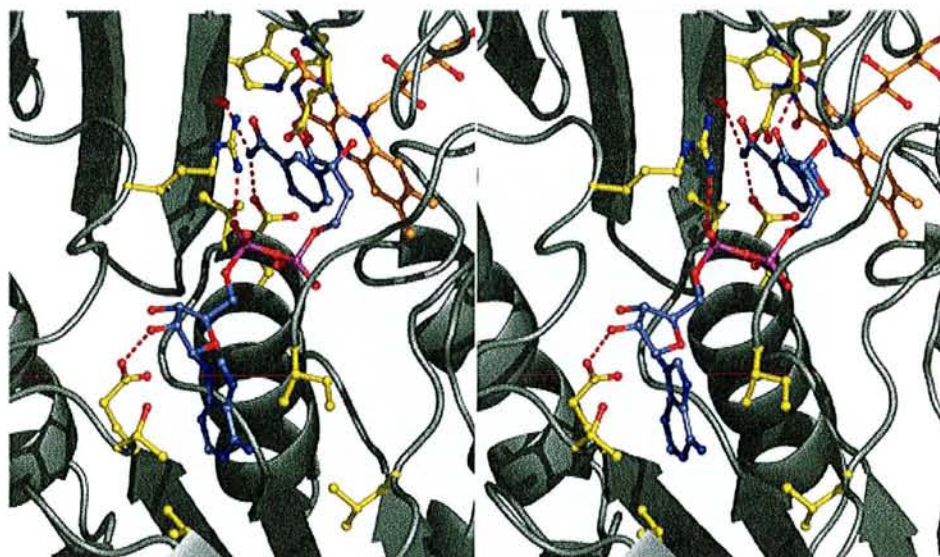


Figure 95 : Vue stéréoscopique de la stabilisation du NADH dans le site actif de BphA4 (code PDB 1F3P).

Le site de fixation du NADH dans la NROR offre donc moins de contacts spécifiques pour la fixation du cofacteur, ce qui suggère une fixation plus faible traduite par une densité électronique ténue et explique la difficulté de modélisation.

Les figures 96 et 97 illustrent la différence d'accessibilité de la cavité offerte au NADH dans la NROR et BphA4. L'existence d'une telle cavité dans la structure de la NROR soulève une question sur la spécificité de substrat de l'enzyme et la possibilité d'accepter un autre agent réducteur du FAD encore inconnu.

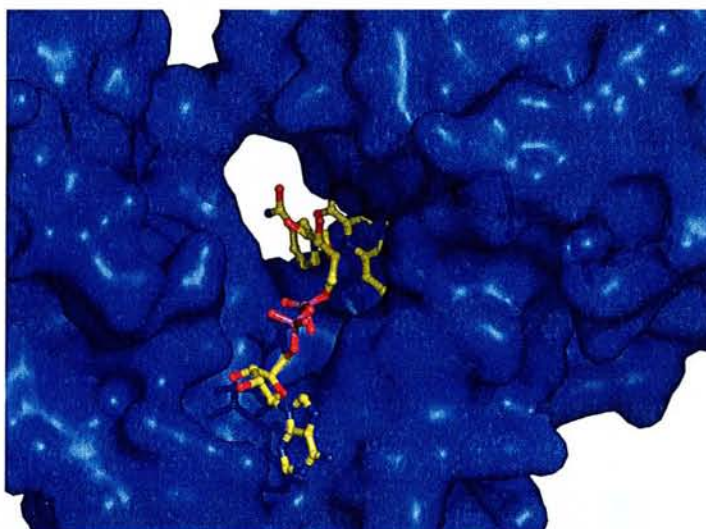


Figure 96 : Représentation de la surface accessible au NADH dans le site actif de la NROR

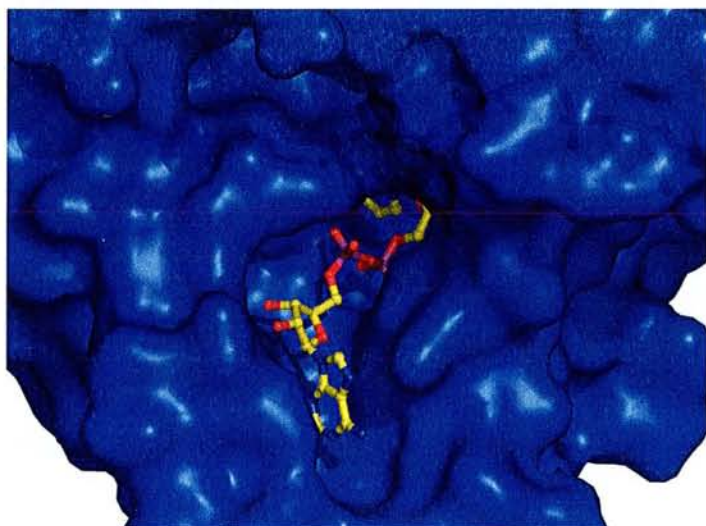


Figure 97 : Représentation de la surface accessible au NADH dans le site actif de BphA4 (code PDB 1F3P)

d) Comparaison des structures oxydée et réduite de la NROR

Les structures des formes oxydée et réduite de la NROR présentent une déviation standard (r.m.s.d) sur la position des carbones alpha de 0.436 Å. Deux aspects se dégagent de la superposition des deux formes de l'enzyme (figure 98) :

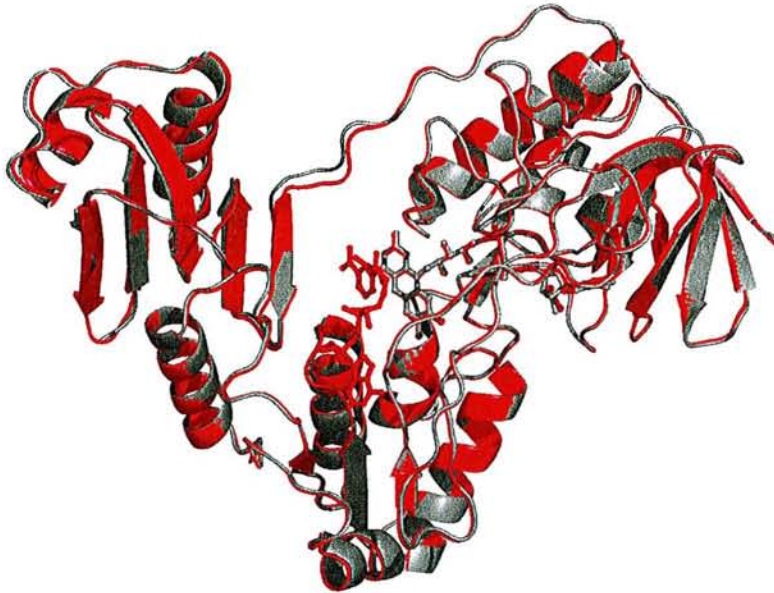
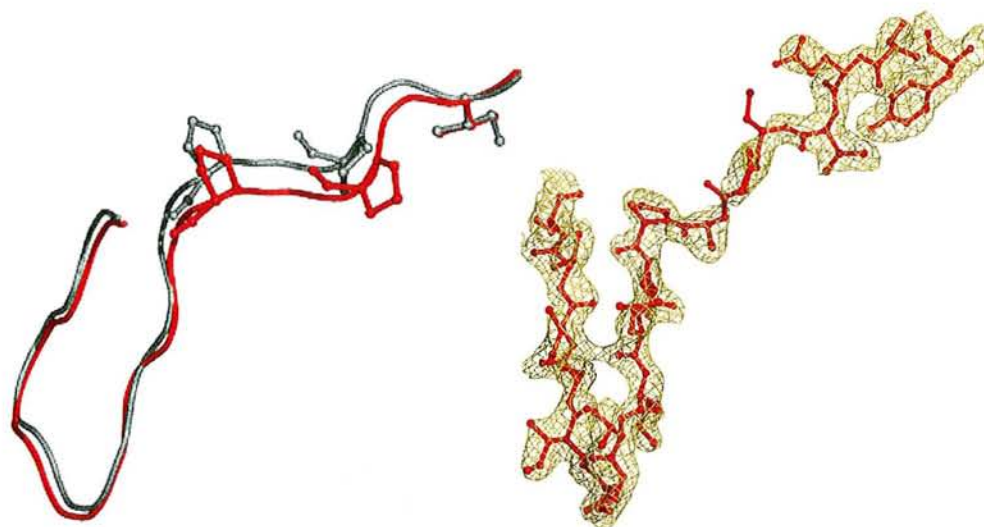


Figure 98 : Superposition des structures des formes oxydée (gris) et réduite (rouge) de la NROR.

- La réduction du FAD dans les conditions de notre expérience s'accompagne d'un mouvement de contraction global de la protéine qui tend à rapprocher le troisième domaine du module FAD-NADH. Cette légère mobilité s'apparente à une « respiration » de l'enzyme, contractée sous forme réduite et relâchée sous forme oxydée. La boucle 290-299, reliant le domaine FAD au troisième domaine est particulièrement concernée. La région charnière incluant les deux résidus proline (Pro297 et Pro299) est la partie la plus mobile de cette boucle 290-300 et se déplace vers le site actif d'environ 2 Å (figure 99). Notons enfin que cette « respiration » observée lors de la diffusion du NADH dans les canaux de solvant du cristal est peut-être limitée en amplitude du fait de l'empilement cristallin.



(a)

(b)

Figure 99 : (a) Superposition des formes oxydée (gris) et réduite (rouge) de la NROR dans la région charnière de la boucle 290-300.
(b) densité électronique superposée au modèle de la forme réduite ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ contour 1.2)

- Un pont disulfure impliquant les résidus Cys286 et Cys26 s'est formé dans les conditions de notre expérience lors de la réduction du FAD par le NADH. Ce pont connecte la boucle qui fait suite à la dernière hélice du domaine de fixation du FAD à la boucle 26-31 (figure 100).

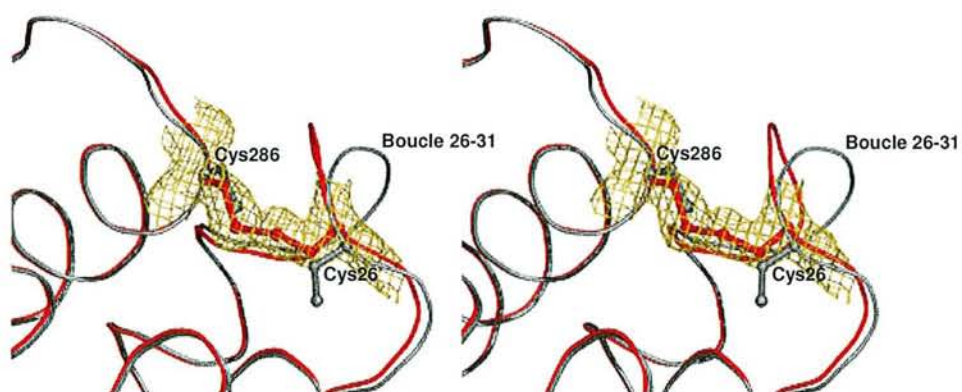


Figure 100 : Vue stéréoscopique de la superposition des structures oxydée (gris) et réduite (rouge) de la NROR dans la région du pont disulfure Cys286-Cys26 formé lors de la réduction. La densité électronique ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ contourée à 1.2) est superposée au pont disulfure.

La superposition des formes oxydée et réduite montre que la chaîne latérale du résidu Cys286 est invariante en position mais que Cys26 voit sa chaîne latérale tourner de 180°

pour former ce pont disulfure. Cette rotation s'accompagne d'un mouvement global de la boucle 26-31 dont les résidus ne forment cependant pas de nouvelles interactions avec le reste de la protéine. Ce pont disulfure se forme à 25 Å du site actif composé du FAD et du NADH (figure 101).

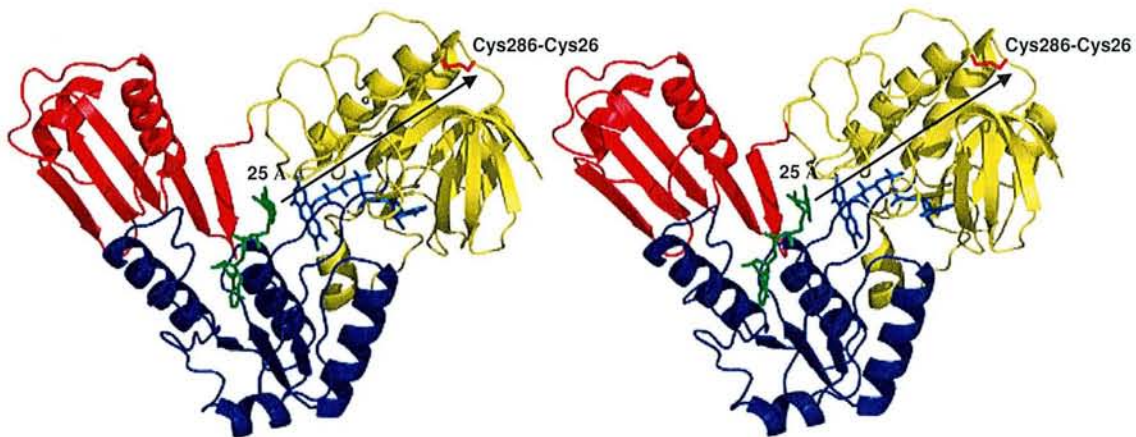


Figure 101 : Vue stéréoscopique du monomère de la forme réduite de la NROR indiquant la position du pont disulfure 26-286 par rapport au site actif.

Cette distance semble beaucoup trop grande pour imaginer un transfert d'électron depuis le FADH₂ vers la cystéine Cys286 le long de l'hélice 271-286. De plus, dans les disulfides réductases de la famille GR₁, comme la glutathion réductase ou la thiorédoxine réductase, le pont disulfure spatialement proche du FADH₂ est réduit par la réoxydation de ce dernier. Dans le cas de la NROR, la réoxydation du FADH₂ dépend de la rubrédoxine, et la réduction du pont disulfure formé par l'oxydation du NADH nécessiterait, quant à elle, un système de régénération supplémentaire du type thiorédoxine par exemple.

La question principale posée par l'observation de ce pont disulfure est de savoir si ce pont a une signification physiologique, ou s'il s'agit d'un artefact expérimental ?

Ce pont se trouve à la surface de la molécule, ceci peut plaider en faveur d'une formation artéfactuelle face à un changement d'environnement. En effet, les conditions relativement drastiques de réduction de la NROR par diffusion du NADH dans les canaux de solvant des cristaux peuvent avoir modifié localement le potentiel d'oxydo-réduction des résidus cystéine. Il est difficile de répondre à ces questions uniquement en interprétant les résultats structuraux. Cependant, l'un des résultats importants des études biochimiques préliminaires à nos travaux structuraux était la forte inhibition de l'activité de l'enzyme par les agents chimiques se fixant sur les résidus cystéine (Petitdemange *et al.*, 1979). Les cinq autres cystéines de la séquence de la NROR ne subissent aucun changement au cours de la

réduction de l'enzyme dans notre expérience. Des études biochimiques et enzymologiques complémentaires sont nécessaires afin d'élucider le rôle des cystéines dans la réaction catalysée par la NROR. La mutagenèse dirigée de ces résidus cystéine apparaît indispensable afin de mesurer la participation de chacune d'elle au mécanisme catalytique. La titration des cystéines libres (dosage spectroscopique au DTNB par exemple) en conditions natives et dénaturantes sur l'enzyme oxydée et réduite par le NADH permettra sans doute de savoir si ce pont se forme en solution lors de la réduction de l'enzyme. Cette dernière expérience a déjà été effectuée mais s'est révélée peu concluante en raison de problèmes techniques liés aux propriétés spectroscopiques intrinsèques des flavoprotéines. Après ajustements, elle devra être rééditée. Une autre expérience sera menée prochainement par électrophorèse dénaturante sur les formes réduite et oxydée de la protéine, afin de séparer ces deux populations si un pont disulfure est formé lors de la réduction.

La légère réoxydation du FADH_2 observée au cours de la collecte des données a pour conséquence la cohabitation de deux populations d'état d'oxydation différent du FAD au sein du cristal. L'espèce majoritaire doit cependant être le FADH_2 . Aucune restriction de planarité n'a été appliquée à la molécule de FADH_2 au cours de l'affinement. Celui-ci semble cependant avoir retrouvé sa planéité. Notons que la résolution de cette structure n'est que de 1.95 Å et que l'amplitude de déviation de la planéité observée dans la structure oxydée était très faible. Si l'on considère que la forme réduite du FAD adopte préférentiellement dans ces flavoprotéines une conformation de la face Re concave, comme observé dans la structure de la thiorédoxine réductase d'*Escherichia coli* (Lennon *et al.*, 1999) membre de la famille GR_1 , la réduction du FAD oxydé de la NROR, observé avec une face Re convexe, peut correspondre à un retour à la planéité.

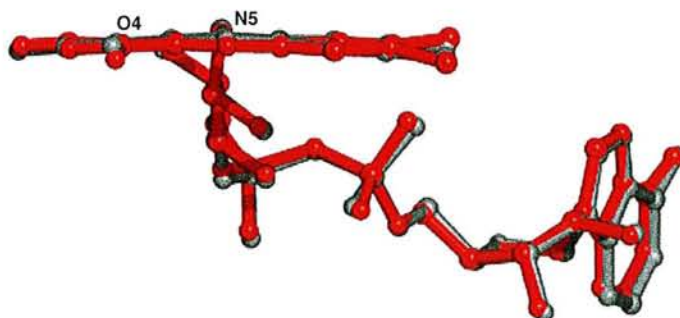


Figure 102 : Superposition des molécules de FAD dans la forme oxydée (gris) et la forme réduite (rouge) de la NROR.

La superposition des molécules de FAD et FADH₂ illustre ce léger changement de conformation et montre que les atomes les plus déplacés lors de la réduction sont l'atome d'oxygène O4 et l'atome d'azote N5 (figure 102). L'atome d'azote N5 est protoné lors de la réduction du FAD. L'environnement proche de ces atomes est modifié lors de la réduction de l'enzyme par la rotation des chaînes latérales de deux résidus relativement proches des cycles isoalloxazines. La chaîne latérale de Glu154 pivote de 180 ° pour se trouver à environ 5 Å des atomes O4 et N5. Ce mouvement a pour conséquence la rotation de 180 ° de la chaîne latérale de Asn46 qui pointe alors dans la direction opposée au FAD vers l'extérieur du site (figure 103).

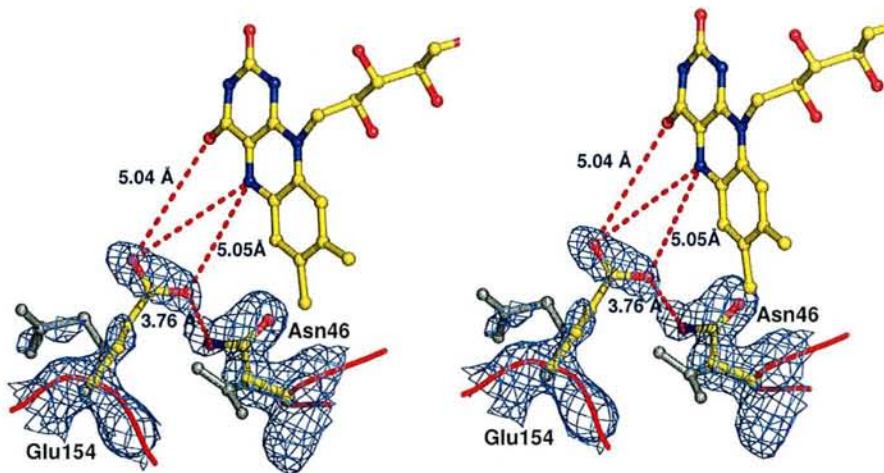


Figure 103 : Vue stéréoscopique illustrant les mouvements des chaînes latérales des résidus Glu154 et Asn46 lors de la réduction de l'enzyme
La position de ces résidus dans le modèle de la forme oxydée est représentée en gris.

Ces deux résidus pourraient jouer un rôle dans le transfert d'électrons vers la rubrédoxine puisque la chaîne latérale de Asn46, exposée au solvant, devient accessible au centre fer-soufre. La mutagenèse dirigée de ces résidus est nécessaire afin de confirmer leur implication dans le transfert d'électrons.

III.4.4. Interactions avec la rubrédoxine : Etude préliminaire du complexe NROR-rubrédoxine

La spécificité d'interaction avec la rubrédoxine a été vérifiée et démontrée par quenching de fluorescence du FAD. Cette expérience consiste à titrer la NROR par la rubrédoxine. Le signal suivi est la décroissance de l'émission de fluorescence à 520 nm (figure 104). L'addition de rubrédoxine provoque un "quenching" de fluorescence sans

changer la longueur d'onde de l'émission maximale : $\lambda = 520$ nm. Ce "quenching" est attribué à une interaction spécifique entre les deux protéines modifiant l'environnement protéique autour de la molécule de FAD. La stoechiométrie de la réaction est donnée par l'abscisse du point d'inflexion de la courbe de titration. Les deux protéines se complexent dans des proportions équimolaires : une molécule de rubrédoxine par molécule de NROR.

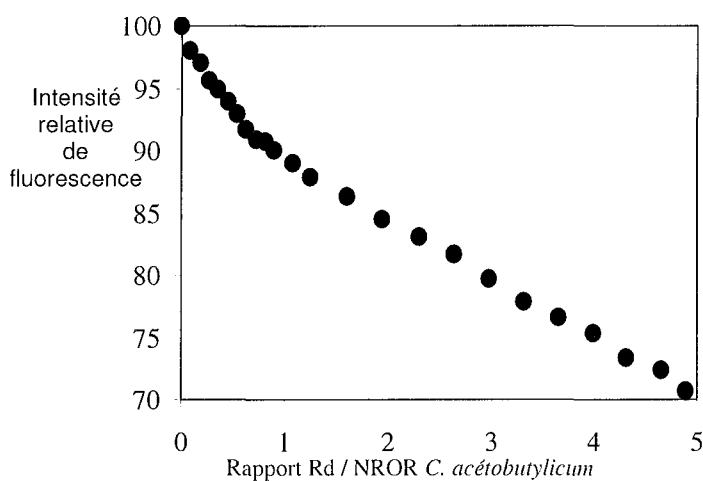


Figure 104 : Décroissance du signal de fluorescence à 520 nm lors de la titration de la NROR par la rubrédoxine

La constante de dissociation K_d du complexe est de l'ordre du micromolaire ($K_d = 2.5 \cdot 10^{-7}$) ce qui doit permettre d'isoler le complexe en vue d'expériences de cristallogénèse.

Plusieurs essais de cristallogénèse sur le complexe ont été menés au laboratoire et à l'IMB de Jena avec l'aide d'un robot de cristallisation qui effectue des micro-gouttes en "batch" dans une huile de paraffine. Les solutions protéiques de complexe ont été préparées de deux façons : par simple mélange (équimolaire ou légèrement excédentaire en NROR) des deux protéines dans un même tampon acétate à pH 4.6, ou par mélange des deux partenaires dans un rapport Rd/NROR supérieur à 1, dialysé contre de l'eau sur une cellule d'ultra-filtration de type Centricon (seuil de coupure 3000 Da) et reconcentré sur une seconde cellule mais de seuil de coupure ne filtrant que le complexe et éliminant l'excédant de rubrédoxine. Seuls des essais à température ambiante ont été effectués jusqu'à présent. Ces premiers essais nous ont permis d'obtenir un petit cristal dont la couleur rouge-brun correspond à celle attendue pour le complexe de la NROR oxydée (jaune vif) et de la rubrédoxine réduite (rouge-noir) (figure 105). Ce cristal n'a malheureusement pas pu être testé en diffraction ni reproduit à ce jour.

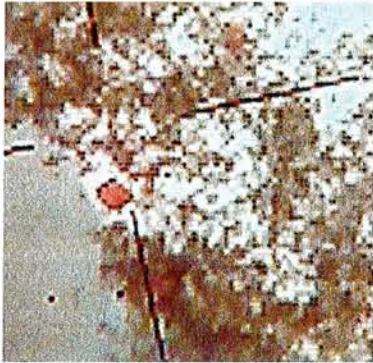


Figure 105 : Cristal du complexe NROR-Rd obtenu en batch dans de l'huile.

50

L'analyse des structures de la NROR sous ses formes oxydée et réduite nous permet cependant d'émettre l'hypothèse d'interaction de la rubrédoxine avec la NROR via la face opposée à la poche de fixation du NADH (figure 106). L'observation des mouvements des chaînes latérales des résidus Glu154 et Asn46 laisse supposer que le transfert des électrons s'effectue par "effet tunnel", cependant la moitié ptérine du cycle isoalloxazine semble suffisamment accessible au solvant pour permettre le transfert direct des électrons.

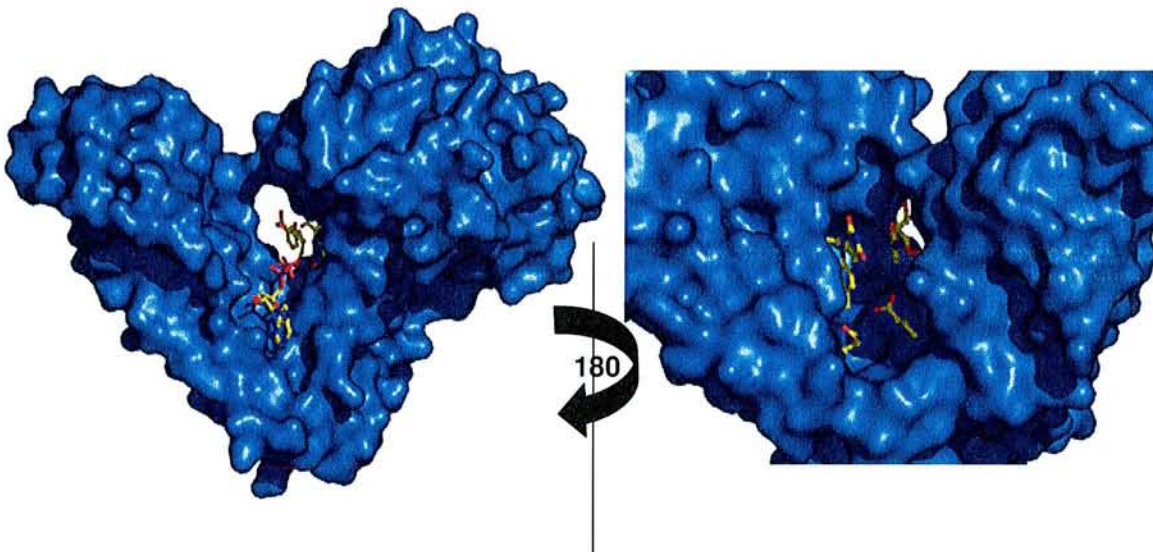


Figure 106 : Illustration de la surface accessible à la rubrédoxine pour le transfert d'électrons.

La résolution de la structure du complexe NROR-Rd reste donc l'objectif majeur dans la poursuite de cette étude, cependant une modélisation par "docking" de la rubrédoxine, en tenant compte de l'ensemble des informations apportées par la cristallographie, pourrait

permettre de valider certaines hypothèses. Ces travaux menés au sein de notre groupe en collaboration avec G. Mulliert sont en cours. Des études de "docking" ont été menées par exemple récemment sur le système rubrédoxine/rubrédoxine-oxygène-oxydoréductase (ROOR) de *D. gigas* (Victor *et al.*, 2003). La ROOR a pour fonction de réduire la rubrédoxine dans une chaîne d'oxydation du NADH dont l'accepteur final est l'oxygène. Cette chaîne met en jeu également une NROR en amont de la ROOR et est impliquée dans la détoxification et la protection contre le stress oxydatif de ce micro-organisme microaérophile (Frazao *et al.*, 2000). L'équivalent de cette ROOR n'existe pas dans le génome de *C. acetobutylicum*.

IV. Etude préliminaire de la superoxyde réductase (SOR) de *C. acetobutylicum*

Comme mentionné dans l'introduction générale, un des produits de réduction de l'oxygène, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), réagit avec le peroxyde d'hydrogène en présence de cations métalliques pour produire un radical hydroxyl OH^{\cdot} responsable de l'effet toxique de l'oxygène moléculaire (Beauchamp *et al.*, 1970).

Les organismes aérobies ont développé un mécanisme de protection impliquant plusieurs enzymes dont une superoxyde dismutase (SOD) (Tainer *et al.*, 1983 ; Choudhury *et al.*, 1999), une catalase (Chance *et al.*, 1979), et des peroxydases non spécifiques (Ortiz de Montellano, 1992). Les activités SOD et catalases sont en majorité absentes des organismes anaérobies, puisque productrices d'oxygène. Cependant, deux gènes codant des SOD ont été identifiés dans le génome totalement séquencé de *C. acetobutylicum* (<http://gib.genes.nig.jp/>), mais aucun susceptible de coder une activité catalase.

Le problème de la détoxification cellulaire chez les microorganismes anaérobies se pose donc.

IV.1. Introduction

Jenney et collaborateurs chez *P. furiosus* (Jenney *et al.*, 1999) puis Coulter et collaborateurs chez *Desulfovibrio vulgaris* (*D. vulgaris*) (Coulter *et al.*, 2001) ont proposé une voie de réduction du radical $O_2^{\cdot-}$ impliquant la rubrédoxine, une NROR et une superoxyde réductase (SOR) (figure 107). De nombreuses données se sont accumulées depuis ces deux dernières années sur cette dernière classe d'enzyme (Adams, *et al.*, 2002 ; Imlay, 2002 ; Auchère & Rusnak, 2002 ; Kurtz & Coulter, 2002).

Un mécanisme sensiblement similaire pourrait exister chez *C. acetobutylicum*, son génome contenant en effet un gène codant une enzyme proche de la superoxyde réductase de *P. furiosus*, mais annoté sous le nom de désulfoferrodoxine. La dernière partie de ce chapitre décrit les résultats préliminaires sur cette enzyme.

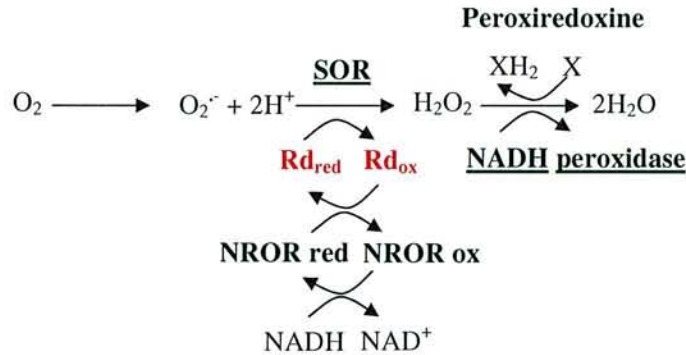


Figure 107 : Modèle de réduction de l'oxygène moléculaire via une activité SOR chez *P. furiosus*.
(D'après Jenney *et al.*, 1999)

Les désulfoferrodoxines (Dfx) ont tout d'abord été isolées chez l'espèce *desulfovibrio* et leur activité caractérisée par différentes techniques biochimiques et spectroscopiques (UV/Visible ; Mössbauer...) (Moura *et al.*, 1990 ; Verhagen *et al.*, 1993 ; Tavares *et al.*, 1994). Ces protéines dimériques de 14 kDa présentent deux centres fer-soufre :

- En N-terminal (centre de type I), l'atome de fer présente une coordination tétraédrique (Fe(S-Cys)₄)

- En C-terminal (centre de type II) la coordination est pyramidale impliquant les atomes d'azote de quatre résidus histidine et l'atome de soufre d'une cystéine axiale (Ascenso *et al.*, 2000). Cette coordination est similaire à celle observée dans les neelaredoxines (Nlr) (Chen *et al.*, 1994).

La distance séparant ces centres métalliques est supérieure à 20 Å. La structure de la SOR de *P. furiosus* a également été résolue. C'est une protéine tétramérique qui complexe un seul atome de fer (centre de type II) (figure 108).

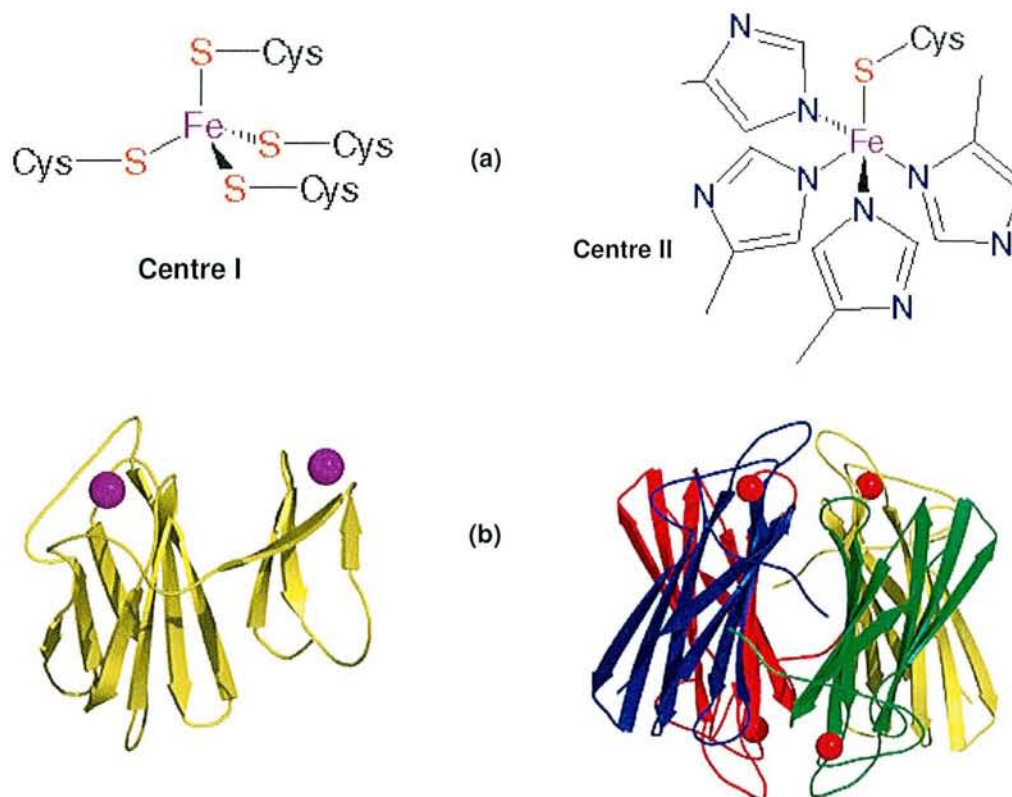


Figure 108 : (a) Centres fer-soufre de types I et II.
 (b) Structures du monomère de la désulfoferrodoxine de *Desulfovibrio desulfuricans* (à gauche, code PDB : 1dfx ; Coelho *et al.*, 1997) et du tétramère de la SOR de *P. furiosus* (à droite, code PDB :1dqj ; Yeh *et al.*, 2000)

L'alignement des séquences des protéines possédant au moins un centre de type II montre que l'on peut classer ces protéines en trois groupes (figure 109) (Ascenso *et al.*, 2000). Le groupe **G1** regroupe les désulfoferrodoxines avec deux centres métalliques (type I et type II), le groupe **G3** est constitué des protéines ne complexant qu'un atome de fer dans un centre de type II (neelarédoxines (Nlr), SOR de *P. furiosus*...) et donc présentant une séquence tronquée en N-terminal. Enfin, le groupe **G2**, dont fait partie la SOR de *C. acetobutylicum*, possède le centre de type II et une séquence N-terminale mais dépourvue de trois des quatre cystéines conservées dans les désulfoferrodoxines (figure 109). Les trois cystéines, non conservées dans la séquence de la SOR de *C. acetobutylicum*, sont remplacées par deux sérines et une glycine. Le domaine N-terminal des protéines de la famille **G2** ne doit donc pas complexer de cation métallique. Comme dans le cas des MsrB

(dont certaines complexent un cation métallique, cf chapitre 1), les désulfoferrodoxines, selon le microorganisme, ont gardé ou acquis au cours de l'évolution la capacité de complexer un second cation métallique.

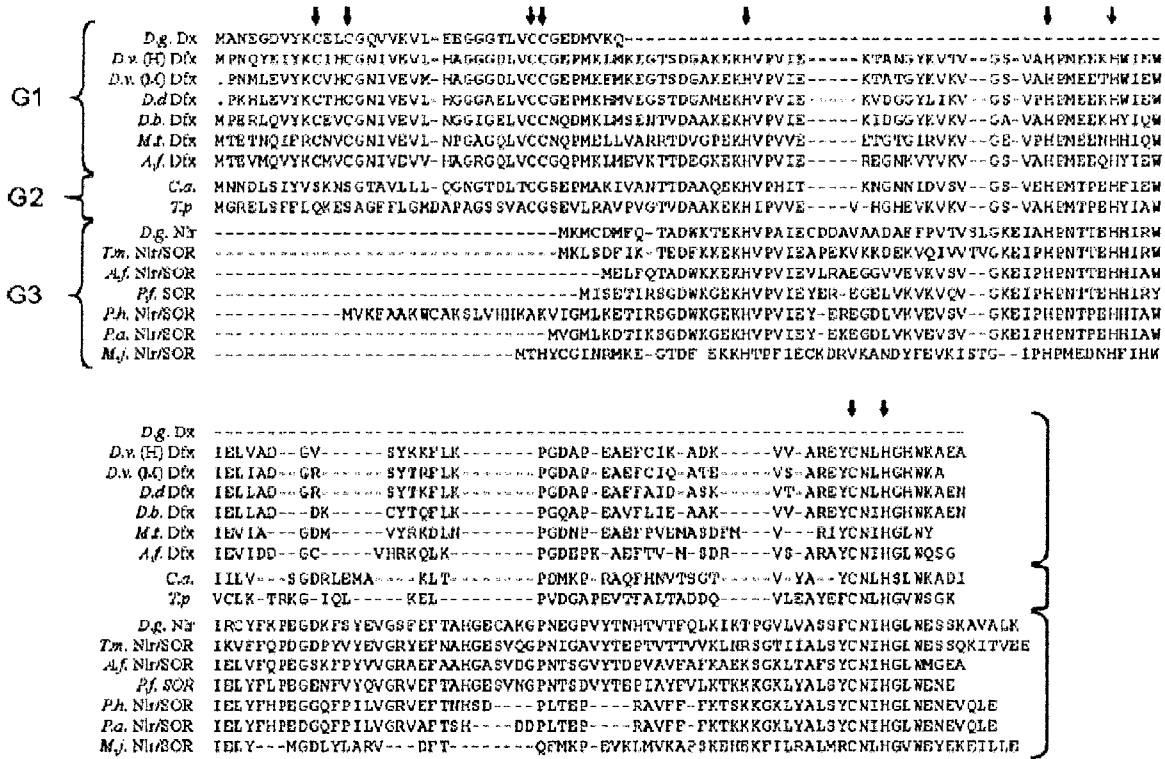


Figure 109 : Alignement des séquences des désulfoferrodoxines et des protéines présentant un centre métallique de type I ou de type II.

G1 : Famille présentant un centre de type I en N-terminal et un centre de type II en C-terminal.

G2 : Famille présentant en N-terminal un domaine inconnu et en C-terminal un centre de type II

G3 : Famille présentant uniquement un centre de type II

Dx : Désulfoferrodoxine ; Nlr : Neelarédoxine

D.g. : *Desulfovibrio gigas* ; *D.v. (H)* : *Desulfovibrio vulgaris souche Hildenborough, (M) souche Miyasaki* ; *D.d.* : *Desulfovibrio desulfuricans* ; *D.b.* : *Desulfoarculus baarsii* ; *M.t.* : *Methanobacterium thermoautotrophicum* ; *A.f.* : *Archaeoglobus fulgidus* ; *C.a.* : *Clostridium acetobutylicum* ; *T.p.* : *Treponema pallidum* ; *T.m.* : *Thermotoga maritima* ; *P.f.* : *Pyrococcus furiosus* ; *P.h.* : *Pyrococcus horikoshii* ; *P.a.* : *Pyrococcus abyssi* ; *M.j.* : *Methanococcus jannashii*

Les flèches noires indiquent la position des résidus impliqués dans les centres métalliques I et II

Seules des structures d'un représentant de chacun des autres groupes (G1 et G3) sont actuellement résolues (figure 108). L'étude de la SOR de *C. acetobutylicum* présente donc l'intérêt de résoudre la première structure de la sous-famille G2.

IV.2. Surexpression et purification de la SOR de *C. acetobutylicum*.

Les constructions génétiques ont été préparées dans le laboratoire du professeur H. Petitdemange par M. Desvaux durant sa thèse. Notre travail a consisté en l'élaboration des protocoles de surexpression et purification en prévision de la cristallogénèse.

Nous disposons des constructions génétiques de la protéine complète et d'une forme tronquée de la partie N-terminale, correspondant à la partie neelarédoxine (Nlr) de l'enzyme (figure 109). Ces deux protéines ont été surexprimées chez *E. coli* et purifiées. La séquence de la forme tronquée commence par la séquence M₃₄AKIVAN (figure 109). Les cellules ont été cultivées sur un milieu LB modifié dont les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 28.

Milieu LB modifié	Proportions (pour 1L)
Peptone	6g
Caséine	2g
Extrait de levure	1g
NaCl	5g
NH ₄ Cl	2g
Fe SO ₄	2mM
Ampicilline	200mg/L

Tableau 28 : Milieu de culture LB modifié utilisée pour surexprimer la SOR dans la souche BL21DE3 d'*E. coli*

Le système de surexpression utilisant la polymérase du phage T7 et l'induction à l'IPTG est le même que celui utilisé dans le cas de la NROR. Le même protocole de purification a été mis au point et utilisé pour les formes complète et tronquée de la SOR (figure 110). La pureté des échantillons purifiés a été confirmée par la présence de deux bandes électrophorétiques en gel d'acrylamide à 12% respectivement à 16 KDa et 10 KDa pour la SOR et la moitié Nlr de la SOR.

Le diagramme de la figure 30 résume les différentes étapes mises au point pour la purification de la SOR et de la Nlr.

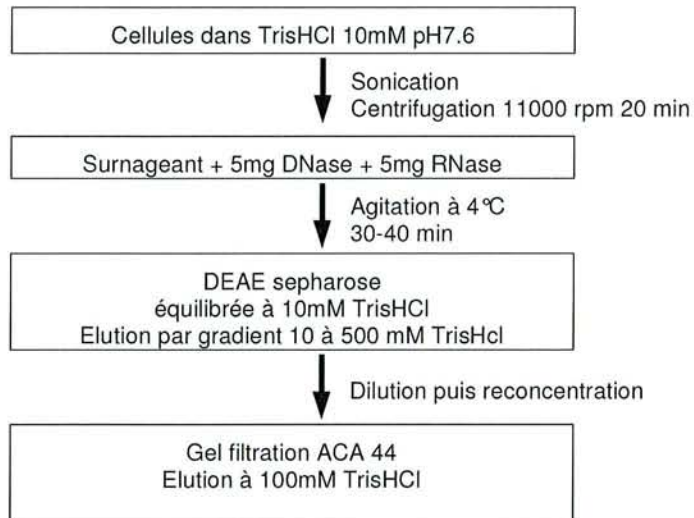


Figure 110 : Diagramme des différentes étapes de purification de la SOR et de sa forme tronquée

IV.3. Cristallisation de la SOR de *C. acetobutylicum*.

Les premiers essais de cristallogénèse sur les formes tronquée (Nlr) et complète de la SOR ont permis d'obtenir des cristaux qui n'ont cependant pas encore été testés en diffraction des rayons X (figure 111).

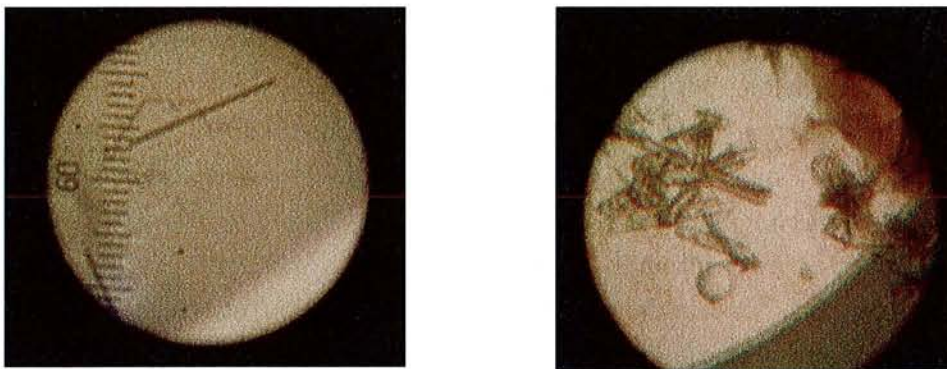


Figure 111 : Photos des cristaux de la SOR (à gauche) et de sa forme tronquée (à droite).

Les cristaux ont été obtenus en quelques jours, en utilisant la méthode en batch immergé dans l'huile. La condition de cristallisation conduisant aux cristaux de la forme tronquée dérive d'une matrice de cristallogénèse commerciale (Hampton research, Screen I, condition

15). Les gouttes de cristallisation sont composées de 2 l de la solution protéique à $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (tampon Tris HCl 0.1 M pH 8) et 2 l de la solution de cristallisation (30 % PEG8000, 0.1M tampon cacodylate de sodium pH 6.5 et 0.2 M de sulfate de NH_4^+).

La condition de cristallisation obtenue pour la SOR dérive d'une autre matrice commerciale (Jena Bioscience, JBS screen 1, condition C2). 2 l de la solution protéique à $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (tampon TrisHCl pH 8) ont été mélangés à 2 l de la solution de cristallisation composée de 25 % PEG 550, 0.1M Na MES pH 6.5 et 0.01 M de sulfate de zinc.

L'amélioration des conditions de cristallisation afin d'augmenter la reproductibilité et la qualité des cristaux est en cours et devrait permettre de collecter prochainement des données par diffraction

En parallèle à ces études structurales, la caractérisation biochimique de l'activité SOR de cette enzyme est nécessaire. Des travaux du même type ont été menés chez *D. vulgaris* (Coulter *et al.*, 2000) et *Desulfoarculus baarsii* (Nivière *et al.*, 2002) et devraient nous servir de modèles. La caractérisation de l'interaction avec la rubrédoxine sera également nécessaire pour évaluer la faisabilité de la structure d'un complexe rubrédoxine-SOR.

V. Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces travaux a permis de surproduire, purifier et cristalliser trois protéines (la rubrédoxine, la NROR, la SOR) potentiellement impliquées dans une voie de détoxification de la cellule anaérobie, *C. acetobutylicum*.

Les structures de la rubrédoxine et de la NROR sous forme oxydée, première structure de cette famille d'enzyme, ont pu être résolues à la résolution atomique (1.14 Å et 1.01 Å respectivement). La structure de la NROR, enzyme monomérique, montre un repliement caractéristique de la famille de la glutathion réductase (GR), protéine dimérique, mais avec une position de son troisième domaine différente. Celui-ci serait maintenu plus éloigné des autres domaines, en comparaison des structures de la famille de GR, par une région charnière composée de deux prolines. Ce point, et son lien avec l'état d'oligomérisation de la protéine, devront être confirmés par mutagenèse dirigée des résidus supposés impliqués.

L'étude de la NROR a été complétée par la détermination à 1.95 Å de résolution de la structure d'une forme réduite de la NROR complexée au NADH. Cette structure, obtenue après diffusion du NADH dans des cristaux de la forme oxydée, semble montrer que la fixation du NADH et la réduction du FAD engendre une « respiration globale » de la protéine

qui rapproche le troisième domaine des deux autres. Un pont disulfure intramoléculaire semble également se former durant la réduction de la NROR. Ces résultats devront être complétés par des études de titration des cystéines libres et de mutagenèse des cystéines impliquées afin d'évaluer leur rôle durant la phase de réduction du FAD. La résolution d'une structure réduite de la NROR sans NADH pourrait également apporter des réponses quant au mécanisme catalytique de l'enzyme.

Des essais préliminaires de cristallisation du complexe NROR-rubrédoxine ont permis d'obtenir un premier cristal qui n'a malheureusement pas permis de collecter des données par diffraction des rayons X. La poursuite de ces travaux de cristallogénèse est une des perspectives importantes de cette étude.

Le rôle de la NROR *in vivo* est lié à la détoxification cellulaire, cependant, la protéine est exprimée constitutivement dans la cellule (Guedon *et al.*, 2001) et pourrait avoir d'autres fonctions. En effet, une recherche d'homologies structurales sur l'ensemble des flavoprotéines nous a permis de constater que la structure de la NROR est proche de la structure du facteur d'induction de l'apoptose (AIF) décrit chez la souris (Mate *et al.*, 2002). Cette protéine est capable de complexer l'ADN et joue un rôle de facteur de transcription inducteur de la mort cellulaire programmée (Daugas *et al.*, 2000). Notons qu'une activité NADH oxydase a également été décrite pour AIF (Miramar, 2001). Le rôle potentiel de facteur de transcription de la NROR reste à démontrer et pourrait constituer une base de collaboration avec des biologistes moléculaires.

Enfin, notre étude a permis de surexprimer, purifier et cristalliser la SOR de *C. acetobutylicum*. L'activité SOR et l'interaction de cette enzyme avec la rubrédoxine n'ont pas encore été caractérisées biochimiquement, ces travaux devront être menés dans un futur proche conjointement à l'amélioration des conditions de cristallisation. La mise en évidence d'une interaction spécifique avec la rubrédoxine pourrait permettre d'espérer cristalliser un complexe entre ces deux protéines afin d'étudier un nouveau type de transfert d'électrons impliquant la rubrédoxine.

CONCLUSION

Conclusion générale

Les objectifs des travaux exposés dans ce manuscrit étaient centrés sur l'étude structurale et biochimique de systèmes enzymatiques d'oxydo-réduction impliqués dans les réponses cellulaires au stress oxydatif. Les deux systèmes enzymatiques étudiés sont d'une part les méthionine sulfoxyde réductases qui catalysent la réduction des résidus méthionine oxydés lorsque la cellule est soumise à des conditions de stress oxydant, et d'autre part un système rubrédoxine-NADH rubrédoxine oxydoréductase potentiellement impliqué dans une voie de détoxification cellulaire chez la bactérie anaérobie stricte *C. acetobutylicum*.

Deux types de Msr (MsrA et MsrB) ont été étudiés dans le but de caractériser les déterminants structuraux qui gouvernent le mécanisme catalytique et qui contrôlent la stéréospécificité envers les isomères R et S de la méthionine sulfoxyde. Nos travaux ont permis de résoudre la première structure d'une MsrB (le module MsrB de la protéine de fusion PILB de *N. meningitidis*), dans sa forme réduite et oxydée respectivement à 1.8 et 3 Å de résolution. L'analyse comparée des deux formes du module MsrB révèle qu'aucun changement conformationnel drastique n'accompagne l'oxydation de l'enzyme par la méthionine sulfoxyde, et confirme les hypothèses et analyses biochimiques sur le rôle de certains résidus du site actif et en particulier His103, His100 et Trp65. La modélisation d'une méthionine sulfoxyde dans le site actif de la forme oxydée, pour expliquer la densité électronique observée, permet de proposer un modèle pour la fixation du substrat. La faible résolution de la structure oxydée laisse cependant des incertitudes sur les mécanismes d'activation de la cystéine catalytique mais aussi sur le positionnement exact de la méthionine sulfoxyde dans le site actif. La résolution de la structure comportant la cystéine catalytique mutée en sérine, complexée à une méthionine sulfoxyde modifiée par deux groupements protecteurs simulant des liaisons peptidiques devrait compléter et affiner notre compréhension du mécanisme catalytique.

L'étude structurale des MsrA, spécifiques de l'isomère S de la méthionine sulfoxyde, concerne d'une part la forme oxydée du module MsrA de la protéine PILB de *N. meningitidis*, enzyme de la sous-famille à deux cystéines catalytiques, et d'autre part la forme réduite de la MsrA chloroplastique de peuplier, membre de la sous-famille à trois cystéines. La structure de la forme oxydée du module MsrA de PILB a été résolue à 1.9 Å de résolution et soulève une question quant au déplacement d'une boucle, obstruant le site actif dans la structure observée, lors du changement d'état d'oxydation. De plus la résolution de cette structure confirme l'implication de Glu94 dans le mécanisme catalytique. La résolution de la structure du module MsrA sous forme réduite de PILB devraient compléter ces travaux et

répondre aux questions soulevées. Enfin la résolution de la structure d'un mutant inactif de la MsrA complexé à la Met-S-SO permettra d'affiner notre compréhension du mécanisme.

La structure de la MsrA chloroplastique de peuplier a été résolue à 1.77 Å de résolution. Cette structure correspond à la première structure d'une MsrA de plante et présente un repliement caractéristique des MsrA connues. Contrairement aux autres structures déjà résolues, la partie C-terminale comprenant les deux cystéines de régénération, a pu être modélisée dans la densité électronique. Cependant, les distances mesurées entre les atomes de soufre des trois cystéines sont toujours (comme observé dans les structures résolues à ce jour) incompatibles avec le mécanisme proposé. L'observation d'une partie C-terminale repliée et stabilisée au sein de la structure nous a conduit à modéliser par dynamique moléculaire la formation des ponts disulfure successifs. Cette modélisation, dont le but n'était pas de définir un mécanisme universel de formation de ces ponts disulfure, apporte deux types d'informations nouvelles. Tout d'abord, la formation des ponts disulfure est possible sans déstructurer totalement le repliement de la partie C-terminale de la protéine. Enfin, cette modélisation permet d'émettre une hypothèse sur un mouvement potentiel de la cystéine catalytique, incluse dans une boucle, pour favoriser sa régénération.

La seconde partie du manuscrit concerne l'étude structurale et biochimique d'un système rubrédoxine-NADH rubrédoxine oxydoréductase. L'ensemble de ces travaux a permis de surproduire, purifier et cristalliser trois protéines (la rubrédoxine, la NROR, la SOR) potentiellement impliquées dans une voie de détoxification de la cellule anaérobie, *C. acetobutylicum*.

Les structures de la rubrédoxine et de la NROR sous forme oxydée (première structure de NROR) ont pu être résolues à la résolution atomique (1.14 Å et 1.01 Å respectivement). La structure de la NROR, enzyme monomérique, montre un repliement caractéristique de la famille de la glutathion réductase (GR), protéine dimérique, mais avec une position différente de son troisième domaine. Celui-ci est maintenu plus éloigné des autres domaines, en comparaison des structures de la famille des GR, par une région charnière comportant deux prolines. Le lien entre ces deux résidus proline et l'état d'oligomérisation de la protéine devra être confirmé par mutagenèse dirigée de ces deux prolines.

L'étude de la NROR a été complétée par la détermination à 1.95 Å de résolution de la structure d'une forme réduite de la NROR complexée au NADH. Cette structure, obtenue après diffusion du NADH dans des cristaux de la forme oxydée, semble montrer que la fixation du NADH et la réduction du FAD engendrent une « respiration globale » de la protéine qui rapproche le troisième domaine des deux autres. Un pont disulfure intramoléculaire semble également se former durant la réduction de la NROR. Ces résultats devront être complétés par des études de titration des cystéines libres et de mutagenèse des

cystéines impliquées afin d'évaluer leur rôle durant la phase de réduction du FAD. La résolution d'une structure réduite de la NROR sans NADH pourrait également apporter des réponses quant au mécanisme catalytique de l'enzyme.

Des essais préliminaires de cristallisation du complexe NROR-rubrédoxine ont permis d'obtenir un premier cristal qui n'a malheureusement pas permis de collecter des données par diffraction des rayons X. La poursuite de ces travaux de cristallogénèse est une des perspectives importantes de cette étude.

Enfin, notre étude a permis de surexprimer, purifier et cristalliser la SOR de *C. acetobutylicum*. L'activité SOR et l'interaction de cette enzyme avec la rubrédoxine n'ont pas encore été caractérisées biochimiquement, ces travaux devront être menés dans un futur proche conjointement à l'amélioration des conditions de cristallisation. La mise en évidence d'une interaction spécifique avec la rubrédoxine pourrait permettre d'espérer cristalliser un complexe entre ces deux protéines afin d'étudier un nouveau type de transfert d'électrons impliquant la rubrédoxine.

ANNEXE

Annexe 1

Phasage *de novo* par la méthode MAD et cas particulier du SAD

Grâce au développement du rayonnement synchrotron, la méthode MAD (Multiwavelength Anomalous Dispersion) est devenue une des méthodes de détermination de la phase des facteurs de structure de macromolécules biologiques les plus utilisées. En effet, un des avantages de cette méthode est de s'affranchir des problèmes de non-isomorphisme des cristaux en collectant différents jeux de données à des longueurs d'onde différentes sur un même cristal.

Cette méthode utilise la modification des intensités des ondes diffusées lorsque l'on fait varier la longueur d'onde autour du seuil d'absorption des atomes lourds présents dans le cristal. Une contribution supplémentaire s'ajoute alors au facteur de diffusion normal (loin du seuil d'absorption), ceci traduit le phénomène de diffusion anormale.

Dans les processus de diffusion élastique de type Thomson, chacun des électrons de l'atome considéré vibre sous l'action du champ électrique fluctuant porté par l'onde électromagnétique incidente. Il ré-émet alors une onde électromagnétique de même fréquence que l'onde incidente mais en opposition de phase. Lorsque la longueur d'onde incidente est proche d'un des seuils d'absorption de l'atome, une résonance s'établit et modifie la diffusion élastique : c'est la diffusion anormale. L'onde ré-émise conserve toujours la même longueur d'onde, mais voit son amplitude modifiée et l'introduction d'un déphasage supplémentaire par rapport à l'onde incidente. Le facteur de diffusion de l'atome cesse d'être réel et dépend de la longueur d'onde λ (équation 1).

$$\lambda_f = O_f + \lambda_f' + i\lambda_f'' = O_f + O_f \left(\frac{\lambda_f'}{O_f} + \frac{i\lambda_f''}{O_f} \right) \quad (\text{équation 1})$$

On distingue les seuils d'absorption K, L et M qui correspondent respectivement aux transitions vers les orbitales 1s, 2p, et 3d. La multiplicité des états d'énergie des orbitales 2p et 3d, conduit à trois seuils L et cinq seuils M. La contribution anormale au facteur de diffusion

atomique (en nombre d'électrons) est plus importante pour les seuils M que pour les seuils L, cette dernière étant elle-même plus importante que celle observée aux seuils K.

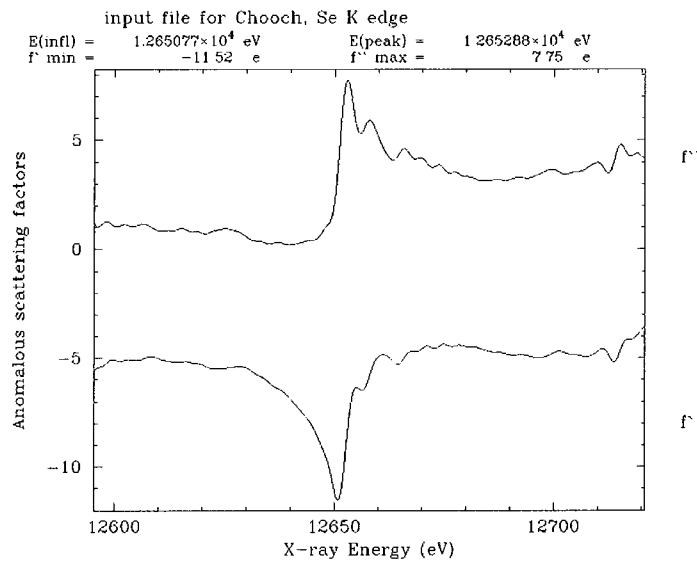


Figure A : Facteurs de diffusion anomaux près du seuil d'absorption K du sélénium dans le cristal de NROR sélénié

Des mesures d'absorption permettent d'accéder au spectre de f'' , partie imaginaire du facteur de diffusion atomique, en fonction de la longueur d'onde. En effet, f'' est liée au coefficient linéaire d'absorption par la relation :

$$f''(\lambda) = \frac{1}{2} \frac{M}{\lambda r_0} \frac{\mu(\lambda)}{N \rho} = K \frac{\mu(\lambda)}{\lambda} \quad (\text{équation 2})$$

où $r_0 = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_0 c^2}$, est le rayon de l'électron,

λ , la longueur d'onde du rayonnement utilisé,

M , la masse atomique de l'élément,

N , le nombre d'Avogadro,

ρ , la masse volumique de l'espèce atomique,

K , coefficient de proportionnalité.

Les mesures sont le plus souvent réalisées en observant la fluorescence de l'échantillon. A partir de ces mesures, le spectre de f'' en fonction de l'énergie est calculé grâce au programme *CHOOCH* (Evans & Pettifer, 2001). Les spectres calculés sont mis à l'échelle par rapport aux valeurs obtenues à partir de calculs de mécanique quantique, pour des énergies éloignées du seuil (Cromer & Liberman, 1970).

La relation de dispersion de Kramers-Kronig permet de calculer le spectre de f' en fonction de l'énergie (équation 3) :

$$f'(E) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{E'f''(E')dE'}{E^2 - E'^2} \quad (\text{équation 3})$$

La figure A montre les variations des facteurs de diffusion anomaux f' et f'' en fonction de la longueur d'onde, au voisinage du seuil K du sélénium dans les cristaux de NROR séléniés. La méthode MAD nécessite une extrême précision sur les longueurs d'onde à utiliser (à 10^{-4} Å près) de manière à exploiter au mieux la variation des composantes f' et f'' autour du seuil d'absorption concerné. Cette variation des composantes du facteur de diffusion est une caractéristique intrinsèque de la structure électronique de l'atome résonnant et dépend de son environnement chimique. Elle doit donc être mesurée sur le cristal étudié.

La diffusion anormale produit deux effets sur les intensités observées :

- 1) La loi de Friedel entre les deux membres d'une paire de Bijvoet n'existe plus. Dans le but de quantifier cet effet, on définit un rapport anomal pour une longueur d'onde donnée.
- 2) L'amplitude du facteur de structure devient dépendante de la longueur d'onde. On définit alors un rapport dispersif pour une paire de longueurs d'onde λ_1 et λ_2 .

L'acquisition des données requiert également une attention particulière, car la méthode repose sur la mesure d'intensités de diffraction conduisant à de petites différences d'intensité. L'unique cristal utilisé est souvent orienté de manière à mesurer simultanément les intensités des réflexions d'une paire de Bijvoet.

En général trois collectes sont effectuées de manière à optimiser les différences d'intensité dues au signal anomal. Les longueurs d'onde exploitées incluent la longueur d'onde

correspondant au maximum de f'' et la longueur d'onde pour laquelle f' atteint son minimum. La dernière valeur est choisie loin du seuil.

Le choix des diffuseurs anomaux dépend essentiellement de la protéine et des cristaux étudiés. Dans le cas des acides nucléiques, le Brome peut être introduit sous forme de bases bromées. Lorsque la protéine contient naturellement un atome métallique (Fe, Zn...) cet atome peut être utilisé comme diffuseur anomal. Cependant, la substitution des atomes de soufre des méthionines d'une protéine par des atomes de sélénium reste la méthode la plus utilisée.

Le problème d'ambiguïté de phase inhérent à la méthode de remplacement isomorphe est la caractéristique principale également de la méthode MAD. Cette ambiguïté est levée par la mesure des différents jeux de données aux différentes longueurs d'onde. Dans un jeu SAD (Single wavelength Anomalous Dispersion) une seule collecte à une seule longueur d'onde est effectuée. Les deux jeux de phases trouvées ne sont pas équiprobables. Il existe une probabilité plus importante pour que la bonne solution pour la phase de la structure totale soit la solution la plus proche de la phase de la substructure des atomes lourds. Cette probabilité augmente d'autant que la contribution des atomes lourds au facteur de structure total est importante. Les phases de la substructure des atomes lourds peuvent alors être utilisées comme phases de départ.

Dans la pratique, les déterminations de structures par la méthode SAD utilisent des méthodes de calculs de probabilités sur la phase à travers des programmes comme MLPHARE (Otwinowski, 1991) ou SHARP (de la Fortelle & Bricogne, 1997), couplées à des méthodes de modification de densité comme DM (Cowtan & Main, 1996), SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) ou RESOLVE (Terwilliger, 2000). Cette méthode est encore plus dépendante de la qualité des données mesurées, et les données collectées à la longueur d'onde où la contribution f'' du facteur anomal est maximale offre le plus de chances de réussite. Enfin, la multiplicité des mesures est également un facteur essentiel pour une bonne collecte SAD (Dauter *et al.*, 2002).

Dans de nombreux cas de phasage par la méthode MAD, la collecte d'un seul jeu de données aurait été suffisant pour la résolution de la structure (Rice *et al.*, 2000). Par souci d'optimisation de l'utilisation du rayonnement synchrotron et sans doute aussi pour répondre aux attentes qu'a fait naître la génomique structurale, les biocristallographes tendent à privilégier aujourd'hui la méthode SAD. L'argument le plus important pour privilégier cette méthode reste cependant la diminution du temps de collectes des données et donc du temps d'irradiation des cristaux permettant d'éviter ou de minimiser les problèmes de dégradation de ceux-ci.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

A

Abrahams J. P. and Leslie A. G. W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Cryst.* **D52**:30-42.

Abrams, W. R., Weinbaum, G., Weissbach, L., Weissbach, H. and Brot, N. (1981) Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **78**, 7483-7486.

Achim, C., Bominaar, E. L., Meyer, J., Peterson, J. and Munck, E. (1999). Observation and interpretation of temperature-dependent valence delocalization in the cluster of a ferredoxin from *C. pasteurianum*. *J. Am. Chem. Soc.* **121**:3704-3714.

Adams MW, Jenney FE Jr, Clay MD, Johnson MK. (2002). Superoxide reductase: fact or fiction? *J Biol Inorg Chem.* **7**:647-52. Review.

Antoine M, Boschi-Muller S, Branlant G. (2003). Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. (sous-presse).

Ascenso, C., Rusnak, F., Cabrito, I., Lima, M. J., Naylor, S., Moura, I., Moura, J. J. G. (2000). Desulfoferredoxin : a modular protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**:720-729.

Auchere F, Rusnak F. (2002). What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo? *J Biol Inorg Chem.* **7**:664-7. Review.

B

Baldwin TO, Christopher JA, Raushel FM, Sinclair JF, Ziegler MM, Fisher AJ, Rayment I. (1995). Structure of bacterial luciferase. *Curr Opin Struct Biol.* **5**:798-809. Review.

Balog, E. M., Norton, L. E., Bloomquist, R. A., Cornea, R. L., Black, D. J., Louis, C. F., Thomas, D. D. and Fruen, B. R. (2003) Calmodulin oxidation and methionine to glutamine substitutions reveal methionine residues critical for functional interaction with ryanodine receptor-1. *J. Biol. Chem.*, **278**:5615-15621.

Barber MJ, Neame PJ, Lim LW, White S, Matthews FS. (1992). Correlation of x-ray deduced and experimental amino acid sequences of trimethylamine dehydrogenase. *J Biol Chem.* **267**:6611-9.

Barman BG, Tollin G. (1972). Flavine-protein interactions in flavoenzymes. Temperature-jump and stopped-flow studies of flavine analog binding to the apoprotein of *Azotobacter flavodoxin*. *Biochemistry.* **11**:4746-54.

Barr, S. D. and Gedamu, L. (2003) Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* **278**:10816-10823.

Beauchamp C, Fridovich I. (1970). A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem.* **245**:4641-6.

- Beckman, J. S., Beckamn, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:1620-1624.
- Beinert H, Kennedy MC. (1989). 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes. *Eur J Biochem*. **186**:5-15.
- Beraud, S., Bersch, B., Brutscher, B., Gans, P., Barras, F. and 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.
- Berlett, B. & Stadtman, E. (1997). Protein oxidation in Aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem*. **272**:20313-20316.
- Black, S., Harte, E. M., Hudson, B., Wartofsky, L. (1960) A specific enzymatic reduction of L(-) methionine sulfoxide and a related nonspecific reduction of disulfides. *J. Biol. Chem*. **235**:2910-2916.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. and 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.
- Boschi-Muller, S., Azza, S. and 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**:2272-2279.
- Bricogne, G. De la Fortelle, E. (1997). Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction. *Methods. In Methods in Enzymology*. **276**:472-494. Academic Press, San Diego.
- Brot, N. and Weissbach, H. (1983). Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residue in protein. *Arch. Biochem. Biophys*. **223**:271-281.
- Brot, N. and Weissbach, H. (1991) Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors*. **3**:91-96.
- Brot, N. and Weissbach, H. (2000) Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers*. **55**:288-296.
- Brune, B. and Lapetina, E. G. (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a target for nitric oxide signaling. *Adv. Pharmacol*. **34**:351-360.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst*. **D54**:905-921.
- Brünger, A. T. (1992). The Rfree value : a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*. **355**:472-475.

C

Caldwell, K. A. and Tappel, A. L. (1964). Reactions of seleno- and sulfon-amino acids with hydroperoxydes. *Biochemistry*. **3**:1643-1647.

Cammack R. (1999). Hydrogenase sophistication. *Nature*. **397**:214-5.

Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF, Floyd RA. (1991) Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:3633-3636.

Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. **59**:527-605.

Chao, C. C., Ma, Y. S. and Stadtman, E. R. (1997) Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **94**:2969-2974.

Chatelet C, Meyer J. (1999). The [2Fe-2S] protein I (Shetna protein I) from *Azotobacter vinelandii* is homologous to the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* **274**:311-7.

Chidwick K, Winyard PG, Zhang Z, Farrell AJ, Blake DR. (1991). Inactivation of the elastase inhibitory activity of alpha 1 antitrypsin in fresh samples of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. **50**:915-916

Chen L, Liu MY, Legall J, Fareleira P, Santos H, Xavier AV. (1993). Purification and characterization of an NADH-rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by *Desulfovibrio gigas*. *Eur J Biochem*. **216**:443-8.

Chen L, Sharma P, Le Gall J, Mariano AM, Teixeira M, Xavier AV. (1994). A blue non-heme iron protein from *Desulfovibrio gigas*. *Eur J Biochem*. **226**:613-8.

Choudhury SB, Lee JW, Davidson G, Yim YI, Bose K, Sharma ML, Kang SO, Cabelli DE, Maroney MJ. (1999). Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in *Streptomyces seoulensis* superoxide dismutase. *Biochemistry*. **38**:3744-52.

Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. and Hoshi, T. (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **94**:9932-9937.

Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. and Hoshi, T. (1999) Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS. Lett.* **442**:48-52.

Clark, R. A., Stone, P. J., El-Hag, A., Calore, J. D. and Franzblau, C. (1981). Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor by human neutrophil. *J. Biol. Chem.* **256**:3348-3353.

Clement-Jones, V., Lowry, P. J., Rees, L. H. and Besser, G. M. (1980). Met-enkephalin circulates in human plasma. *Nature*. **283**:295-297.

Coelho, A. V., Matias P., Fülöp, V., Thompson, A., Gonzales, A., Carrondo, M. A. (1997). Desulfoferredoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9 Å resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS₄ centre with a square pyramidal FeSN₄ centre. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**:680-689.

Coulter ED, Kurtz DM Jr. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys.* **394**:76-86.

Cowan K., Main P. (1996). Phase Combination and Cross Validation in Iterated Density Modification Calculations. *Acta Cryst.* **D52**, 43-48

Crichton RR. Proteins of iron storage and transport. (1991). *Adv Protein Chem.* **40**:281-363. Review.

D

Dauter Z, Wilson KS, Sieker LC, Moulis JM, Meyer J. (1996). Zinc- and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: a high-precision model of a ZnS₄ coordination unit in a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:8836-40.

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**:729-39.

Dauter Z, Dauter M, Dodson E. (2002). Jolly SAD. *Acta Crystallogr.* **D58**:494-506.

Davies, K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* **83**:301-310.

DeLano Scientific, 2003

Dhandayuthapani, S., Blaylock, M. W., Bebear, C. M., Rasmussen, W. G. and Baseman, J. B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.* **183**:5645-5650.

Doublet S, Kapp U, Aberg A, Brown K, Strub K, Cusack S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the 9 kDa protein of the mouse signal recognition particle and the selenomethionyl-SRP9. *FEBS Lett.* **384**:219-21.

Dym O, Eisenberg D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **10**:1712-28. Review.

E

Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B. (1990). Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol.* **212**:135-42.

Eidsness MK, Richie KA, Burden AE, Kurtz DM Jr, Scott RA. (1997). Dissecting contributions to the thermostability of *Pyrococcus furiosus* rubredoxin: beta-sheet chimeras. *Biochemistry.* **36**:10406-13.

Ejiri, S. I., Weissbach, H. and Brot, N. (1979) Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **139**:161-164.

Engh R A & Huber R (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**:392-400.

Etienne, F., Spector, D., Brot, N. and Weissbach, H. (2003) A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**:378-382.

Evans G., Pettifer R. F. (2001). CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J. Appl. Cryst.* **34**:82–86

F

Ferrer J. L. , (2001). Automated data processing on beamline FIP (BM30A) at ESRF. *Acta Crystallogr.* **D57**:1752-3.

Folkman J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* **1**:27-31.

Frankel, E. N. (1985). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research.* **23**:197-221.

Frazao C, Silva G, Gomes CM, Matias P, Coelho R, Sieker L, Macedo S, Liu MY, Oliveira S, Teixeira M, Xavier AV, Rodrigues-Pousada C, Carrondo MA, Le Gall J. (2000). Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat Struct Biol.* **7**:1041-5.

Freeman, B. (1994). Free radical chemistry of nitric oxide : looking of the dark side. *Chest* **105** (suppl.):79S-84S.

Fujinaga, J. and Meyer, J. (1993). Cloning and expression in *E. coli* of the gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin from *C. pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **192**:1115-1122.

G

Gabbita SP, Aksenov MY, Lovell MA, Markesbery WR. (1999). Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* **73**:1660-1666.

Gao, J., Yin, D. H., Yao, Y., Sun, H., Qin, Z., Schoneich, C., Williams, T. D. and Squier, T. C. (1998) Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys. J.* **74**:1115-1134.

Gao, J., Yao, Y. and Squier, T. C. (2001) Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex. *Biophys. J.* **80**:1791-1801.

Garland D, Russell P, Zigler JS Jr. (1988). The oxidative modification of lens proteins. *Basic Life Sci.* **49**:347-352.

Garland DL. (1991). Ascorbic acid and the eye. *Am J Clin Nutr.* **54(6 Suppl)**:1198S-1202S. Review.

Ghisla S, Massey V. (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem.* **181**:1-17. Review.

Giégé & Ducruix, 1990

Gill, S. C. and Von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**:319-26.

Gilles de Pelichy LD, Smith ET. (1999). Redox properties of mesophilic and hyperthermophilic rubredoxins as a function of pressure and temperature. *Biochemistry*. **38**:7874-80.

Gitlin, G., Tsarbopoulos, A., Patel, S. T., Sydor, W., Pramanik, B. N., Jacobs, S., Westreich, L., Mittelman, S. and Bausch, J. N. (1996) Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. *Pharm. Res.* **13**:762-769.

Ghisla S, Massey V. (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem.* **181**:1-17. Review.

Godzik A. (1995). In search of the ideal protein sequence. *Protein Eng.* **8**:409-16.

Golinelli, M. P., Gagnon, J. and Meyer, J. (1997). Specific interaction of the [2Fe-2S] ferredoxin from *C. pasteurianum* with the nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry*. **36**:11797-11803.

Gomez-Moreno C, Choy M, Edmondson DE. (1979). Purification and properties of the bacterial flavoprotein: thiamin dehydrogenase. *J Biol Chem.* **254**:7630-5.

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**:48915-48920.

Guedon E, Petitdemange H. (2001). Identification of the gene encoding NADH-rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **285**:496-502.

Gustavsson, N., Kokke, B. P., Anzelius, B., Boelens, W. C. and Sundby, C. (2001) Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity. *Protein. Sci.* **10**:1785-1793.

H

Haas, A. & Goebel W. (1992). Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Res. Commun.* **16**:137-157.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1981). Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* **128**:347-352.

Hansel, A., Kuschel, L., Hehl, S., Lemke, C., Agricola, H. J., Hoshi, T. and 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**:911-913.

Harndahl, U., Kokke, B. P., Gustavsson, N., Linse, S., Berggren, K., Tjerneld, F., Boelens, W. C. and 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**:227-237.

Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F. and 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**:887-892.

Holm L, Sander C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci.* **20**:478-80

Holmgren, A. (1972) Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **247**:1992-8

Hou, L., Kang, I., Marchant, R. E. and 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**:40173-40176.

Hoshi, T. and Heinemann, S. H. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* **531**:1-11.

Hsu, Y. R., Narhi, L. O., Spahr, C., Langley, K. E. and Lu, H. S. (1996) In vitro methionine oxidation of Escherichia coli-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization. *Protein Sci.* **5**:1165-1173.

I

Imlay, J. A. & Linn, S. (1986). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* **240**:1302-1309.

Imlay, J. A. & Linn, S. (1986). Bimodal pattern of killing of DNA-repair defective or anoxically grown E.coli by hydrogen peroxyde. *J. Bacteriol.* **166**:519-527.

Imlay JA. (2002). What biological purpose is served by superoxide reductase? *J Biol Inorg Chem.* **7**:659-63. Review.

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**:461-463.

J

Jacquamet L., Bertoni A., Borel F., Joly P., Carpentier P., Charrault E., Fanchon E., Israel-Gouy P., Kahn R., Ohana J., Pirocchi P., Legrand P., Roth M. and Ferrer J.L. (2003). FIP : une ligne de lumière automatisée. Communication orale congrès AFC Caen (7-10 juillet).

Jacquot JP, Rouhier N, Gelhaye E. (2002). Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants: I. The chloroplastic systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**:508-19.

Janoff A, Carp H, Lee DK, Drew RT. (1979) Cigarette smoke inhalation decreases alpha 1-antitrypsin activity in rat lung. *Science.* **206**:13-14.

Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* **23**:03-5.

Jenney FE Jr, Verhagen MF, Cui X, Adams MW. (1999). Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science.* **286**:306-9.

Johnson D, Travis J. (1979). The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem.* **254**:4022-4026.

Jones T.A., Zou, J-Y., Cowan S.W. & M. Kjeldgaard (1991). Improved methods for the building of protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**:110-119.

Jones DT, Woods DR. (1991). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev.* **50**:484-524. Review.

Jung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T. and 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**:91-94.

Jungermann K, Thauer RK, Leimenstoll G, Decker K. (1973). Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia. *Biochim Biophys Acta.* **305**:268-80.

K

Kabsch, W. (2001) Chapter 25.2.9. XDS in International Tables for Crystallography, Volume F. Crystallography of Biological Macromolecules, Rossmann, M.G. and Arnold, E. Editors. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Karplus PA, Schulz GE. (1987). Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J Mol Biol.* **195**:701-29.

Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Olry, A., Boschi-Muller, S., Carpentier, P., Branlant, G. and Aubry, A. (2002) 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**:1467-1469.

Keis S, Bennett CF, Ward VK, Jones DT. (1995). Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int J Syst Bacteriol.* **45**:693-705.

Kok M, Oldenhuis R, van der Linden MP, Meulenberg CH, Kingma J, Witholt B. (1989). The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem.* **264**:5442-51.

Krebs, E. G. (1979). Phosphorylation-Dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **48**:923-959.

Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. and Gladyshev, V. N. (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**:4245-4250.

Kurusu G, Kusunoki M, Katoh E, Yamazaki T, Teshima K, Onda Y, Kimata-Arigo Y, Hase T. (2001). Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nat Struct Biol.* **8**:117-21.

Kumar RA, Koc A, Cerny RL, Gladyshev VN. (2002). Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase. *J Biol Chem.* **277**:37527-37535.

Kummerle R, Zhuang-Jackson H, Gaillard J, Moulis JM. Site-directed mutagenesis of rubredoxin reveals the molecular basis of its electron transfer properties. *Biochemistry.* **36**:15983-91.

Kurtz DM Jr, Coulter ED. (2002). The mechanism(s) of superoxide reduction by superoxide reductases in vitro and in vivo. *J Biol Inorg Chem.* **7**:653-8. Review.

Kuschel, L., Hansel, A., Schonherr, R., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T. and Heinemann, S. H. (1999) Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS. Lett.* **456**:17-21.

L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.

Laskowski RA; MacArthur MW; Moss DS; Thornton JM (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291

Lennon BW, Williams CH Jr, Ludwig ML. (1999). Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. *Protein Sci.* **8**:2366-79.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**:15036-15040.

Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L. and Stadtman, E. R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing. Dev.* **107**:323-332.

Leys D, Basran J, Talfournier F, Sutcliffe MJ, Scrutton NS. (2003). Extensive conformational sampling in a ternary electron transfer complex. *Nat Struct Biol.* **10**:219-25.

Lim LW, Shamala N, Mathews FS, Steenkamp DJ, Hamlin R, Xuong NH. (1986). Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-Å resolution. *J Biol Chem.* **261**:15140-6.

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

Ling, N., Guillemin, R. (1976). Morphinomimetic activity of synthetic fragments of β -lipotropin and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **73**:3308-3310.

Lovenberg W, Sobel BE. (1965). Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **54**:193-9.

Lovenberg W. (1972). Clostridial rubredoxin. *Methods Enzymol.* **24**:477-80.

Lowther WT, Matthews BW. (2002). Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim Biophys Acta.* **1477**:157-67. Review.

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

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

Lumprio, H. L., Shenvi, N. V., Summers, A. O., Voordow, G., Kurtz, J. R. (2000). Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris* : a novel oxidative stress protection system. **183**:101-108.

M

Ma K, Adams MW. (1999). A hyperactive NAD(P)H:Rubredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol.* **181**:5530-3.

Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, Alzari PM. (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol.* **9**:442-6.

McPherson A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem.* **189**:1-23. Review.

Meyer J. (1981). Comparison of carbon monoxide, nitric oxide, and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch Biochem Biophys.* **210**:246-56

Meyer J. (2000). Clostridial iron-sulphur proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**:9-14. Review.

Min T, Ergenekan CE, Eidsness MK, Ichiye T, Kang C. (2001). Leucine 41 is a gate for water entry in the reduction of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin. *Protein Sci.* **10**:613-21.

Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. (2001). *J Biol Chem.* **276**:16391-8.

Mitchell, W. J. (1998). Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microb. Physiol.* **39**:31-130.

Miura R. (2001). Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. *Chem Rec.* **1**:183-94. Review.

Mohsenin V, Gee JL. (1989). Oxidation of alpha 1-protease inhibitor: role of lipid peroxidation products. *J Appl Physiol.* **66**:2211-2215.

Morales R, Charon MH, Kachalova G, Serre L, Medina M, Gomez-Moreno C, Frey M. (2000). A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep.* **1**:271-6.

Moras D, Olsen KW, Sabesan MN, Buehner M, Ford GC, Rossmann MG. (1975). Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem.* **250**:9137-62.

Moskovitz, J., Rahman, M. A., Strassman, J., Yancey, S. O., Kushner, S. R., Brot, N. and Weissbach, H. (1995) *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J. Bacteriol.* **177**:502-507.

Moskovitz, J., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jursky, F., Weissbach, H. and 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**:3205-3208.

Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. and Stadtman, E. R. (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**:9585-9589.

Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M. and 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**:14071-14075.

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**:14167-14172.

Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**:12920-12925.

Moskovitz, J., Singh, V. K., Requena, J., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K. and Stadtman, E. R. (2002) Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**:62-65.

Moura I, Tavares P, Moura JJ, Ravi N, Huynh BH, Liu MY, LeGall J. (1990). Purification and characterization of desulfoferrodoxin. A novel protein from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) and from *Desulfovibrio vulgaris* (strain Hildenborough) that contains a distorted rubredoxin center and a mononuclear ferrous center. *J Biol Chem.* **265**:21596-602.

Muller YA, Schulz GE. Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science.* **259**:965-7.

Muller A, Muller JJ, Muller YA, Uhlmann H, Bernhardt R, Heinemann U. (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108). *Structure.* **6**:269-80.

Muller JJ, Lapko A, Bourenkov G, Ruckpaul K, Heinemann U. (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J Biol Chem.* **276**:2786-9.

R. S. Mulliken. (1952). Molecular compounds and their spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **5**:811-823.

R. S. Mulliken. (1962). *J. Chem. Phys.* **36**:3428.

N

Nathan, C. & Xie, Q. (1994). Nitric oxide synthases : roles, tolls and controls. *Cell.* **78**:915-918.

Nathan, C. and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**:8841-8848.

Nicholls, A., Sharp, K. A., and Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct. Funct. Gen.* **11**:282.

Nishina Y, Sato K, Shi R, Setoyama C, Miura R, Shiga K. (2001). On the ligands in charge-transfer complexes of porcine kidney flavoenzyme D-amino acid oxidase in three redox states: a resonance Raman study. *J Biochem (Tokyo)*. **130**:637-47.

Nivière V., Berthomieu C, Dupeyrat F, Fontecave M, Vermeglio A, (2002). Redox-dependent structural changes in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* and *Treponema pallidum*: a FTIR study. *Biochemistry*. **41**:10360-8.

Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR. (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **183**:4823-38.

Novick P, Brennwald P. (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell*. **75**:597-601. Review.

O

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem*. **262**:5488-5491.

Oleinick, N. L., Chiu, S., Ramakrishnan, N. and Xue, L. (1986). The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Brit. J. Cancer* **55**:Suppl. **8**:135-140.

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

Ortiz de Montellano PR. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **32**:89-107. Review.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology*. **276(A)**:307-326. Academic Press

P

Pai, E. F., & Schulz, G. E. (1983). The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* **258**:1752

Paik, W. K. & Kim, S. (1975). Protein methylation : chemical, enzymological and biological significance. *Adv. Enzymol.* **42**:227-286.

Palmblad, M., Westlind-Danielsson, A. and Bergquist, J. (2002) Oxidation of methionine 35 attenuates formation of amyloid beta - peptide 1-40 oligomers. *J. Biol. Chem.* **277**:19506-19510.

Perrakis A, Morris R, Lamzin VS. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol.* **6**:458-63.

Petitdemange H, Marczak R, Blusson H, Gay R. (1979). Isolation and properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide reductase of *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **91**:1258-65.

Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M. and Friguët, 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**:819-825.

Pichon-Pesme, V., Lecomte, C. & Lachekar, H. (1995). *J. Phys. Chem.* **99**:6242-6250.

Pryor, W. A. & Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxyxynitrite : a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **268**:L699-L722.

Q

Quinonez, M., DiFranco, M. and Gonzalez, F. (1999) Involvement of methionine residues in the fast inactivation mechanism of the sodium current from toad skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.* **169**:83-90.

R

Rahman, M. A., Nelson, H., Weissbach, H. and Brot, N. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene. *J. Biol. Chem.* **267**:15549-15551.

Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature.* **362**:219-23.

Reddy, V. Y., Desorchers, P. E., Pizzo, S. V., Gonias, S. L., Sahakian, J. A., Levine, R. L. and Weiss, S. J. (1994) Oxidative dissociation of human alpha 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. *J Biol Chem.* **269**:4683-4691.

Roderick SL, Matthews BW. (1993). Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry.* **32**:3907-12.

Rohl, C. A., Boeckman, F. A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W. A. and Klevit, R. E. (1999) Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry.* **38**:855-861.

Rood, J. I., McClane, B. A., Songer, J. G. and Titball, R. W. (1997). The clostridia : Molecular biology and pathogenesis. Academic press, San Diego.

Roos, D., Eckmann, C. M., Yazdanbakhsh, M., Hamers, M. N. and DeBoer, M. (1984). Excretion of superoxide by phagocytes measured with cytochrome c entrapped in resealed erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* **259**:1770-1775.

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. (2002). Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants: II. The cytosolic and mitochondrial systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**:520-8.

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. (2002). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem.* **277**:13609-13614.

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. and Joiner, M. A. (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**:2748-2753.

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

S

Sancar A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev.* **103**:2203-37. Review.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

Sadanandom, A., Poghosyan, Z., Fairbairn, D. J. and Murphy, D. J. (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant. Physiol.* **123**:255-264.

Senda T, Yamada T, Sakurai N, Kubota M, Nishizaki T, Masai E, Fukuda M, Mitsuidagger Y. (2000). Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J Mol Biol.* **304**:397-410.

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

Shechter, Y., Burstein, Y. and Patchornik, A. (1975). Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry.* **14**:4497-4503.

Shechter, Y. (1986). Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.* **261**:66-70.

Sheldrick GM, Schneider TR. (1997). SHELXL: High Resolution Refinement. *Methods in Enzymology.* Academic Press; Orlando. **277**:319-343.

Sigalov, A. B. and Stern, L. J. (2001) Oxidation of methionine residues affects the structure and stability of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein particles. *Chem. Phys. Lipids.* **113**:133-146.

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:10540-10543.

Smith MA, Tabaton M, Perry G. (1996). Early contribution of oxidative glycation in Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* **217**:210-211.

Spector, D., Etienne, F., Brot, N. and Weissbach, H. (2003) New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**:284-289.

Stackebrandt E, Kramer I, Swiderski J, Hippe H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus Clostridium. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **24**:253-8.
Stadtman *et al.*, 1965

Stadtman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science.* **257**:1220-1224. Review.

Stadtman ER, Berlett BS. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* **30**:225-243. Review.

Sun, H., Gao, J., Ferrington, D. A., Biesiada, H., Williams, T. D. and Squier, T. C. (1999) Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry.* **38**:105-112.

Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* **1366**:151-65. Review.

Sutcliffe MJ, Scrutton NS. (2002). A new conceptual framework for enzyme catalysis. Hydrogen tunnelling coupled to enzyme dynamics in flavoprotein and quinoprotein enzymes. *Eur J Biochem.* **269**:3096-102. Review.

T

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature.* **306**:284-7.

Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N. G., Wehr, N., Moss, J. and 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**:27258-27265.

Tang, X. D., Daggett, H., Hanner, M., Garcia, M. L., McManus, O. B., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H. and Hoshi, T. (2001) Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **117**:253-274.

Tavares P, Ravi N, Moura JJ, LeGall J, Huang YH, Crouse BR, Johnson MK, Huynh BH, Moura I. (1994). Spectroscopic properties of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774). *J Biol Chem.* **269**:10504-10.

Taylor AB, Benglis DM Jr, Dhandayuthapani S, Hart PJ. (2003). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. *J Bacteriol.* **185**:4119-26.

Terwilliger TC. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr.* **D56**:965-72.

Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ. (2001). Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol.* **8**:701-4.

Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold. Des.* **8**:1167-1178.

V

Vagin A., Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**:1022-1025.

Verhagen MF, Voorhorst WG, Kolkman JA, Wolbert RB, Hagen WR. (1993). On the two iron centers of desulfoferrodoxin. *FEBS Lett.* **336**:13-8.

Victor BL, Vicente JB, Rodrigues R, Oliveira S, Rodrigues-Pousada C, Frazao C, Gomes CM, Teixeira M, Soares CM. (2003). Docking and electron transfer studies between rubredoxin and rubredoxin:oxygen oxidoreductase. *J Biol Inorg Chem.* **8**:475-88.

Vogt, W., Zimmermann, B., Hesse, D. and Note, R. (1992). Activation of the fifth component of human complement, without cleavage, by methionine oxidizing agents. *Mol. Immunol.* **29**:251-256.

Vogt, W. (1979). Substrate modulations as a control mechanism in the activation of plasma multienzyme systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **120B**:125-131.

Vogt, W. (1995). Oxydation of methionyl residues in proteins : tools, targets and reversal. *Free Radical Biology and Medecine.* **18**:93-105.

Voordouw JK, Voordouw G. (1998). Deletion of the rbo gene increases the oxygen sensitivity of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol.* **64**:2882-7.

W

Wang ZY, Shimonaga M, Muraoka Y, Kobayashi M, Nozawa T. (2001). Methionine oxidation and its effect on the stability of a reconstituted subunit of the light-harvesting complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur J Biochem.* **268**:3375-82.

Wastl J, Duin EC, Iuzzolino L, Dorner W, Link T, Hoffmann S, Sticht H, Dau H, Lingelbach K, Maier UG. (2000). Eukaryotically encoded and chloroplast-located rubredoxin is associated with photosystem II. *J Biol Chem.* **275**:30058-63.

Weiss, S. J., Lampert, M. B. and Test, S. T. (1983). Long-lived oxidants by human neutrophils : Characterization and bioactivity. *Science.* **222**:625-628.

Weiss, S. J. (1986). Oxygen ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**:9-37.

Weeks, C. M. & Miller, R. (1999). Optimizing Shake-and-Bake for proteins. *Acta Cryst.* **D55**:492-500.

M. S. Weiss (2001). Global indicators of X-ray data quality. *J. Appl. Cryst.* **34** :130-135.

Wizemann, T. M., Moskovitz, J., Pearce, B. J., Cundell, D., Arvidson, C. G., So, M., Weissbach, H., Brot, N. and 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**:7985-7990.

Wouters J., Evrard, G. and Durant F. (1995). Lumiflavinium (7,8,10-Trimethylisoalloxazinium) Nitrate. *Acta Cryst.* **C51**:1223-1227

Y

Yeh JI, Hol WG. (1998). A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **54**:479-80.

Yeh AP, Chatelet C, Soltis SM, Kuhn P, Meyer J, Rees DC. Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol.* **300**:587-95.

Yu, H. and Schreiber, S. L. (1995) Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface. *Nature.* **376**:788-791.

Yu, H. and Schreiber, S. L. (1995) Cloning, Zn²⁺ binding, and structural characterization of the guanine nucleotide exchange factor human Mss4. *Biochemistry*. **34**:9103-9110.

Z

Zheng, Y. J., Ornstein, R. L. (1996). A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:9402-9408.

Ziegler GA, Vonrhein C, Hanukoglu I, Schulz GE. (1999). The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *J Mol Biol.* **289**:981-90.

Zhu, Z., Dumas, J. J., Lietzke, S. E. and Lambright, D. G. (2001) A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release. *Biochemistry*. **40** :3027-3036.

Zumft, W. G. (1993). The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**:253-264.

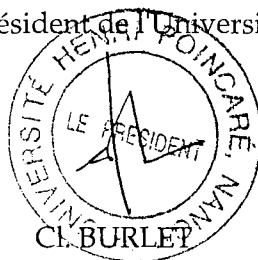
Monsieur KAUFFMANN Brice

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLECULAIRE & CELLULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 894

Nancy, le 10 décembre 2003

Le Président de l'Université



RESUME

Ce mémoire présente l'étude structurale par cristallographie des rayons X de deux familles d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant. La première partie est dédiée à l'étude de peptide méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Ces enzymes catalysent la réduction des méthionine sulfoxydes, produits de l'oxydation du résidu méthionine par des entités oxygénées (ERO) ou nitrées réactives (NRO). Quatre structures de formes oxydées et réduites de ces enzymes ont été résolues. Les travaux correspondants ont été réalisés en collaboration avec les équipes du professeur G. Branlant au MAEM et du professeur J.-P. Jacquot au laboratoire Interactions Arbres-Microorganismes, à l'UHP de Nancy. La deuxième partie de ce manuscrit présente les travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire des bactéries Gram+ dirigé par H. Petitdemange à l'UHP sur la NADH rubrédoxine oxydoréductase (NROR) de *Clostridium acetobutylicum*, une bactérie solvantogène anaérobie. La forme native de l'enzyme a été résolue à 1.01 Å de résolution. Cette enzyme est proposée intervenir dans une voie de réduction du radical superoxyde.

SUMMARY

This work presents the structural analysis by X-Ray crystallography of two families of enzymes involved in defence mechanism against oxidative stress. The first part is dedicated to peptide methionine sulfoxide reductases (Msr) which catalyse methionine sulfoxide (MetSO) reduction. MetSO are formed by oxidation of the methionine residue by oxygen and nitrogen species. Four structures of oxidised and reduced forms of Msr have been solved, in collaboration with the team directed by Pr. G. Branlant in MAEM and with the team of Pr. J.P. Jacquot in IAM, at the UHP Nancy I. The second part of this work was done in collaboration with the laboratory of "Bactéries Gram +" (directed by Pr. H. Petitdemange) at UHP and concerns the NADH rubredoxin oxidoreductase (NROR) from *Clostridium acetobutylicum*, a solvantogenic anaerobe. The structure of the native form of NROR was solved at 1.01 Å resolution. This enzyme was proposed to be involved in the reduction pathway of the superoxide radical.

Mots clés : cristallographie biologique ; diffraction des rayons X ; structure tridimensionnelle ; stress oxydant ; peptide methionine sulfoxyde réductase ; NADH rubrédoxine oxydoréductase ; cystéine catalytique ; flavoprotéine