



**HAL**  
open science

# Mécanisme, catalyse et spécificité structurale des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A et caractérisation de disulfure oxydoréductases de *Neisseria meningitidis*

Adeline Gand

► **To cite this version:**

Adeline Gand. Mécanisme, catalyse et spécificité structurale des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A et caractérisation de disulfure oxydoréductases de *Neisseria meningitidis*. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10031 . tel-01748520

**HAL Id: tel-01748520**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748520>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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





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

## **Thèse**

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I**

en Enzymologie Moléculaire

**par Adeline GAND**

**Mécanisme, catalyse et spécificité structurale des  
Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A et  
caractérisation de disulfure oxydoréductases de  
*Neisseria meningitidis***

Soutenance publique le 23 juin 2008

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mr B. Friguet	Professeur, Université Denis Diderot, Paris 7
	Mr V. Nivière	Directeur de Recherche CNRS, Grenoble I
Examineurs :	Mme G. Bonnard	Directeur de Recherche CNRS, ULP Strasbourg
	Mr. M. Ruiz-Lopez	Directeur de Recherche, CNRS/UHP Nancy I
	Mr. G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	Mme S. Boschi-Muller	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I



# Remerciements





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

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

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller qui a encadré mon travail depuis le DEA. Je la remercie pour sa disponibilité, ses compétences, ses conseils, les discussions scientifiques que nous avons partagé et surtout pour m'avoir soutenu pendant les moments de stress. Merci encore pour son aide tout au long de ma thèse et lors de la rédaction de ce manuscrit.*

*Mes remerciements s'adressent à Messieurs Bertrand Friguet et Vincent Nivière qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Madame Géraldine Bonnard et Monsieur Manuel Ruiz-Lopez d'avoir accepté de juger cette thèse.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Merci à Marc Quinternet, Christel Beaufiles et au Dr. Manh Thong Cung du laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR 7568 CNRS-ENSIC). Merci au Dr. Bulent Balta, Eddy Thiriot, et aux Dr. Gérald Monard et Manuel Ruiz-Lopez du laboratoire CBT (UMR 7565 CNRS-UHP) pour l'étude de chimie théorique du mécanisme des Msr, ainsi que pour les réunions et discussions enrichissantes que nous avons eues. Merci à Guillaume Béchade et au Dr. Sarah Sanglier du LSMBO à Strasbourg pour les très nombreuses analyses de spectrométrie de masse.*

*Merci aux Docteurs François Talfournier, Sophie Rahuel pour leurs conseils, les discussions, l'aide et la bonne humeur partagés ensemble.*

*Merci au Docteur Christophe Jacob pour avoir toujours été là pour m'aider et me supporter.*

*J'adresse un remerciement tout particulier à Mathias et Arnaud, les anciens thésards (même s'ils m'ont abandonné !) Merci de m'avoir appris tant de choses, de m'avoir autant aidé, supporté et surtout pour m'avoir appris autant de blagues nulles.*

*Je remercie aussi tout particulièrement Magali et Gaby pour m'avoir soutenu au cours de cette dernière année, pour m'avoir fait à manger et m'avoir déstressé pendant ma rédaction (je sais que c'était dur!!!). Merci également à Sylvain, Christelle, Arnaud, Athanase, Aileen pour leur bonne humeur.*

*Je remercie également le groupe des joyeux chimistes : Jeff, Rafik, David, Estelle, Anne, Phloup's en souvenir de nos déjeuners (délicieux) au RU et de nos blagues à 2 francs. Merci d'avoir toujours été là pour moi.*

*Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, Laure, Xav', Carine, Christophe, Alex, Séverine.*

*Enfin, je tiens à remercier toute ma famille sans qui je ne serais pas arrivé là où j'en suis aujourd'hui.*

# Table des matières



## INTRODUCTION

<b>Partie I : Les Méthionine Sulfoxyde Reductases (Msr).....</b>	<b>2</b>
<b>I.1 Oxydation des Méthionines par les Formes Activées de l'Oxygène (FAO).....</b>	<b>2</b>
I.1.1 Oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	3
I.1.2 Oxydation par le radical hydroxyle (OH <sup>•</sup> ).....	4
I.1.3 Oxydation par le peroxydinitrite (HOONO).....	5
<b>I.2 Propriétés des sulfoxydes.....</b>	<b>6</b>
<b>I.3 Conséquence de l'oxydation des méthionines.....</b>	<b>6</b>
I.3.1 Modulation de la fonction des protéines.....	7
I.3.1.1 Altération de la fonction des protéines.....	7
I.3.1.2 Modulation des canaux ioniques.....	8
I.3.2 Rôle dans la protection des protéines.....	9
I.3.3 Maladies neurodégénératives.....	9
I.3.4 Dégradation des protéines.....	10
<b>I.4 Rôle des Msr.....</b>	<b>10</b>
I.4.1 Lutte contre le stress oxydant.....	10
I.4.2 Régulation et réparation de protéines.....	11
I.4.2.1 La calmoduline.....	11
I.4.2.2 Ffh.....	12
I.4.2.3 La protéine ribosomique L7/L12.....	12
I.4.3 Implication dans le vieillissement cellulaire.....	13
I.4.4 Pathogénicité des bactéries.....	14
<b>I.5 Propriétés des Msr.....</b>	<b>15</b>
I.5.1 Distribution tissulaire et localisation subcellulaire.....	15
I.5.1.1 MsrA.....	15
I.5.1.2 MsrB.....	16
I.5.2 Organisation génomique.....	16
I.5.3 Mécanisme catalytique des Msr.....	17
I.5.4 Structures tridimensionnelles.....	19
I.5.4.1 Structure tridimensionnelle des MsrA.....	19
I.5.4.2 Structures tridimensionnelles des MsrB.....	22
I.5.5 Les différentes sous-classes de Msr.....	24
I.5.5.1 Les différentes sous-classes de MsrA.....	24
I.5.5.2 Les différentes sous-classes de MsrB.....	26
I.5.6 Stéréosélectivité et spécificité de substrat.....	29
<b>Partie II : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx.....</b>	<b>30</b>
<b>II.1 Les disulfure oxydoréductases cytoplasmiques.....</b>	<b>31</b>
II.1.1 Les Trx.....	31
II.1.1.1 Rôle des Trx.....	31
II.1.1.2 Mécanisme catalytique.....	32
II.1.1.3 Spécificité de substrat.....	33
II.1.2 Les Glutarédoxines.....	35
II.1.3 Les Protéines Disulfure Isoméras (PDI).....	37
<b>II.2 Les disulfure oxydoréductases périplasmiques.....</b>	<b>38</b>
II.2.1 Les Dsb (DsbA/DsbC/DsbG/cDsbD/DsbE).....	38
II.2.2 Le domaine N-terminal de la protéine PilB de <i>N. meningitidis</i> .....	40
<b>II.3 Les DsbE.....</b>	<b>41</b>
II.3.1 Les cytochromes <i>c</i> bactériens et leurs systèmes de maturation.....	41

## Table des matières

II.3.1.1 Les cytochromes <i>c</i> bactériens.....	41
II.3.1.2 Rôle des cytochromes <i>c</i> .....	42
II.3.1.3 Les cytochromes de <i>N. meningitidis</i> .....	46
II.3.1.4 Les différents systèmes de maturation des cytochromes <i>c</i> et les systèmes modèles.....	47
II.3.1.4.1 Système I.....	47
II.3.1.4.2 Système II.....	49
II.3.1.4.3 Système III.....	50
II.3.2 Les DsbE.....	50
II.3.2.1 Propriétés biochimiques. ....	51
II.3.2.2 Caractéristiques structurales.....	51
II.3.2.3 Rôle des DsbE dans la maturation des cytochromes <i>c</i> .....	54
II.3.2.3.1 Rôle dans la réduction d'un apocytochrome <i>c</i> .....	54
II.3.2.3.2 Rôle vis-à-vis de leur partenaire réducteur.....	57
<b>Objectifs.....</b>	<b>61</b>

## RESULTATS

<b>Partie I : Caractérisation des acides aminés de la MsrA de <i>N. meningitidis</i> impliqués dans la catalyse de l'étape réductase et dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde.....</b>	<b>63</b>
<b>I.1 Résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase.....</b>	<b>64</b>
I.1.1 Résumé des résultats.....	64
I.1.2 Publication 1.....	65
<b>I.2 Résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde.....</b>	<b>75</b>
I.2.1 Résumé des résultats.....	75
I.2.2 Publication 2.....	76
<b>I.3 Etude d'un substrat protéique : la protéine L7/L12 d'<i>E. coli</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>Partie II : Les disulfure oxydoréductases périplasmiques de <i>N. meningitidis</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>II.1 Analyse des séquences des DsbE1, DsbE2 et DsbE3.....</b>	<b>89</b>
<b>II.2 Etudes <i>in vitro</i> des 3 DsbE putatives.....</b>	<b>92</b>
II.2.1 Production et purification des formes solubles des trois DsbE.....	92
II.2.2 Caractérisation biochimique de la DsbE1t et de la DsbE2t.....	94
II.2.2.1 Détermination du potentiel redox de la DsbE1t et de la DsbE2t.....	94
II.2.2.2 Détermination des pKa des Cys .....	96
II.2.3 Réduction des DsbEt oxydées par la nDsbD.....	99
II.2.4 Réduction de l'apocytochrome <i>c</i> oxydé par la DsbEt.....	100
II.2.4.1 Production/purification d'un apocytochrome <i>c</i> oxydé.....	100
II.2.4.2 Réduction de l'apocytochrome <i>c</i> oxydé par le DsbE1t.....	103
<b>II.3 Détermination du rôle des DsbE <i>in vivo</i>.....</b>	<b>105</b>
II.3.1 Tests de complémentation chez <i>E. coli</i> .....	105
II.3.2 Tests de complémentation chez <i>B. pertussis</i> .....	107

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

<b>Partie I : Mécanisme catalytique de l'étape réductase des MsrA.....</b>	<b>109</b>
<b>Partie II : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde.....</b>	<b>117</b>
<b>Partie III : Régénération de l'activité réductase.....</b>	<b>121</b>
<b>Partie IV : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans l'interaction entre MsrA et Trx.....</b>	<b>124</b>
<b>Partie V : Les disulfure oxydoréductases périplasmiques de <i>N. meningitidis</i>.....</b>	<b>128</b>

## ANNEXES

<b>Annexe 1.....</b>	<b>134</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>143</b>

## MATERIELS ET METHODES

<b>I Matériel biologique et milieux de culture.....</b>	<b>151</b>
<b>I.1 Souches bactériennes.....</b>	<b>151</b>
<b>I.2 Vecteurs plasmidiques.....</b>	<b>152</b>
<b>I.3 Milieux de culture bactérienne.....</b>	<b>153</b>
I.3.1 Milieu riche LB.....	153
I.3.2 Milieu riche SOC.....	153
I.3.3 Milieu Bordet-Gengou.....	153
I.3.4 Milieu minimum pour culture en anaérobie et en présence de nitrites.....	153
<b>II Techniques de génie génétique.....</b>	<b>154</b>
<b>II.1 Préparation de l'ADN plasmidique.....</b>	<b>154</b>
II.1.1 La minipréparation.....	154
II.1.2 Préparation et transformation des bactéries compétentes.....	154
<b>II.2 Mutagenèse du matériel plasmidique.....</b>	<b>155</b>
<b>II.3 Clonage des ORF.....</b>	<b>155</b>
<b>II.4 Construction d'une chimère DsbE <i>N. meningitidis</i>/ADN génomique de <i>B. pertussis</i>.....</b>	<b>156</b>
<b>III Production et purification des différentes protéines.....</b>	<b>157</b>
<b>III.1 Production des protéines recombinantes.....</b>	<b>157</b>
<b>III.2 Désintégration des cellules.....</b>	<b>158</b>
<b>III.3 Purifications.....</b>	<b>158</b>

## Table des matières

III.3.1 Purification de la MsrA et de la DsbE1t.....	158
III.3.1.1 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.....	158
III.3.1.2 Filtration sur gel.....	158
III.3.1.3 Chromatographie d'échange d'anions.....	159
III.3.1.4 Concentration et conservation des protéines.....	159
III.3.2 Purification de la DsbE2t.....	160
III.3.3 Purification de l'apocytochrome <i>c'</i> .....	160
III.3.4 Purification de la protéine L7/L12.....	160
III.3.4.1 Chromatographie d'affinité sur complexe Ni <sup>2+</sup> (IMAC).....	160
III.3.4.2 Concentration et conservation des protéines.....	161
<b>III.4 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées.....</b>	<b>161</b>
III.4.1 Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes.....	161
III.4.2 Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes.....	161
<b>IV Préparation des substrats sulfoxydes.....</b>	<b>162</b>
<b>V Techniques d'étude enzymatique pour la MsrA de <i>N. meningitidis</i>.....</b>	<b>162</b>
V.1 Dosage des groupements thiols libres par le 5, 5'-dinitrobis (2-nitro) benzoate (DTNB).....	163
V.2 Récapitulatif des procédures décrites dans les publications et manuscrits.....	163
<b>VI Caractérisation biochimique des DsbE1t et DsbE2t.....</b>	<b>164</b>
VI.1 Détermination du potentiel rédox des DsbE1t et DsbE2t à l'équilibre avec les formes GSH/GSSG.....	164
VI.2 Spectres de dichroïsme circulaire.....	165
<b>VII Etude du mécanisme des DsbE.....</b>	<b>165</b>
VII.1 Test de réduction de l'apocytochrome <i>c'</i> oxydé et de la cystine.....	165
VII.2 Test de réduction des DsbE oxydées par la protéine nDsbD.....	166
<b>VIII Tests de complémentation fonctionnelle bactérienne.....</b>	<b>166</b>
VIII.1 Complémentation chez <i>E. coli</i> .....	166
VIII.1.1 Fractionnement subcellulaire.....	167
VIII.1.2 Technique de coloration de l'hème.....	167
VIII.2 Complémentation chez <i>B. pertussis</i> .....	167
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>169</b>



# Abréviations



2PDS	: 2, 2' dithiodipyridine
AniA	: nitrite réductase
APS	: adénosine-5'-phosphosulfate
ArsC	: arsenate réductase C
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DMSOR	: diméthyl sulfoxyde réductase
DO	: densité optique
Dsb	: disulfide bond protéine
DTNB	: dithionitrobenzoate
DTT	: dithiothréitol
FAO	: formes activées de l'oxygène
FPLC	: chromatographie liquide moyenne pression
Grx	: glutarédoxine
GSH	: glutathion
GSSG	: glutathion oxydé
GST	: glutathione-S-transférase
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
huSCF	: human stem cell factor
IAM	: iodo-acétamide
IPTG	: isopentényl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
$k_{cat}$	: constante catalytique
$K_M$	: constante de Michaélis
$k_{max}$	: constante de vitesse observée maximale
$k_{obs}$	: constante de vitesse observée
$K_S$	: constante apparente d'affinité
LB	: Luria Bertani
MetSO	: méthionine sulfoxyde
MOX	: Méthanol déshydrogénase
Msr	: méthionine sulfoxyde réductase
NAD	: nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NorB	: nitrique oxyde réductase
ORF	: phase ouverte de lecture
PAGE	: gel d'électrophorèse en polyacrylamide
PAPS	: 3'-Phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
PDI	: protéine disulfure isomérase
<i>Pfu</i>	: ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
Prx	: peroxyrédoxine
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RNR	: ribonucléotide réductase
RyR	: récepteur à la ryanodine
SDS	: sodium dodécyle sulfate
SOD	: superoxyde dismutase
SRP	: signal recognition particule
TFA	: acide trifluoroacétique
TGR	: thiorédoxine glutarédoxine réductase
TMAO	: triméthylamine n-oxyde
TMPD	: tétraméthyl- $\rho$ -phénylènediamine
Tris	: N-tris(hydroxyméthyle)éthyle-2-aminométhanesulfonate

## **Abréviations**

Trx	: thiorédoxine
TrxR	: thiorédoxine réductase
<i>A. thaliana</i>	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. pertussis</i>	: <i>Bordetella pertussis</i>
<i>B. taurus</i>	: <i>Bos taurus</i>
<i>B. japonicum</i>	: <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>C. reinhardtii</i>	: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>E. chrysanthemi</i>	: <i>Erwinia chrysanthemi</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapiens</i>	: <i>Homo sapiens</i>
<i>M. pulmonis</i>	: <i>Mycobacterium pulmonis</i>
<i>M. smegmatis</i>	: <i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	: <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>R. capsulatus</i>	: <i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>X. campestris</i>	: <i>Xanthomonas campestris</i>

# Introduction



## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

Les bactéries du genre *Neisseria* sont des bactéries aérobies gram négatives, et les espèces *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* sont des pathogènes obligatoires de l'homme. *N. gonorrhoeae* colonise les tractus génitaux masculin et féminin et est responsable de la blennorragie ou gonorrhée, alors que *N. meningitidis* est responsable de méningites et de septicémies. Pendant l'infection, les bactéries pathogènes sont exposées à un stress oxydant généré par les mécanismes de défense de l'hôte. C'est pourquoi les bactéries pathogènes du genre *Neisseria* ont acquis différents mécanismes de défense pour détecter et combattre ce stress oxydant, parmi lesquels certains sont également associés à leur virulence (Seib *et al.*, 2004; Seib *et al.*, 2006). Ainsi, les travaux de Taha *et al.* avaient dès 1988 identifié un gène spécifique des bactéries du genre *Neisseria*, appelé *pilB*, impliqué dans la virulence de ces bactéries *via* un rôle dans la régulation de la piliation (Taha *et al.*, 1998). Depuis, différentes études ont montré que PilB ne joue aucun rôle dans la piliation mais serait impliquée dans la résistance au stress oxydant (Skaar *et al.*, 2002). La protéine PilB est composée de trois domaines, le domaine central et le domaine C-terminal qui portent respectivement des activités méthionine sulfoxyde réductases (Msr) A et B (Olry *et al.*, 2002) et un domaine N-terminal à activité disulfure oxydoréductase possédant un repliement de type DsbE (Wu *et al.*, 2005 ; Ranaivoson *et al.*, 2006). Les Msr catalysent la réduction des méthionines oxydées sous forme de méthionine sulfoxyde (MetSO) en Met en présence de thiorédoxine (Trx). Deux classes de Msr ont été caractérisées, chacune spécifique de la réduction d'un stéréoisomère de la MetSO au niveau de la fonction sulfoxyde : la MsrA réduit spécifiquement l'isomère *S* de la MetSO alors que la MsrB est spécifique de la réduction de l'isomère *R*. Il est à noter que les domaines Msr de PilB ont été étudiés sous forme isolées, et que la dénomination « Msr de *Neisseria* » dans ce manuscrit fait référence à ces domaines isolés.

Mon travail de thèse concerne l'étude d'une part des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la catalyse et dans la reconnaissance du substrat de la MsrA de *N. meningitidis*, et d'autre part des disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis* possédant un repliement de type DsbE. La première partie de l'introduction est dédiée aux mécanismes d'oxydation des Met, aux conséquences de cette oxydation ainsi qu'à la présentation des propriétés biologiques, biochimiques, enzymatiques et structurales des Msr. La seconde partie est consacrée aux disulfure oxydoréductases de la famille des Trx et plus particulièrement aux protéines DsbE impliquées dans la voie de maturation des cytochromes *c*.

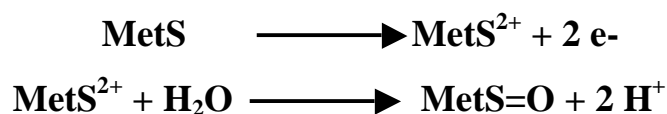
## **Partie I : Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr)**

Les Msr catalysent la réduction des Met oxydées sous forme de MetSO en Met. Les paragraphes qui suivent font l'état des connaissances 1) sur l'oxydation des Met et des conséquences de cette oxydation au travers d'exemples non exhaustifs, et 2) sur les Msr.

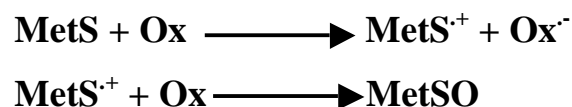
### **I.1 Oxydation des méthionines par les Formes Activées de l'Oxygène (FAO)**

Le métabolisme aérobie produit en permanence des FAO. Cette production de FAO est contrebalancée par des systèmes de défenses antioxydants (catalases, peroxydases, superoxyde dismutase...). Cependant, dans certaines conditions, cet équilibre peut être rompu, suite soit à une augmentation de la production de FAO (exposition à des concentrations élevées en O<sub>2</sub>, infection bactérienne...), soit à une diminution de l'efficacité des systèmes antioxydants. Ceci conduit alors à une augmentation des concentrations intracellulaires en FAO appelée communément stress oxydant. Ces FAO vont réagir avec de nombreuses biomolécules, notamment avec l'ADN, les lipides ou encore les protéines. Au niveau des protéines, un des acides aminés le plus sensible à l'oxydation par les FAO est la Met.

Les Met vont être oxydées par deux mécanismes différents, impliquant une oxydation à un ou deux électrons. L'oxydation à deux électrons entraîne la formation d'un dication qui en présence d'eau, ou d'un réactif oxydant, va former la MetSO.



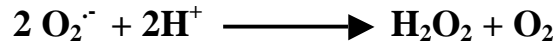
L'oxydation à un électron entraîne la formation d'un radical cation. Cette espèce est très instable et peut être oxydée en sulfoxyde par certaines FAO *via* une oxydation à un électron (pour revue, voir Schoneich 2005).





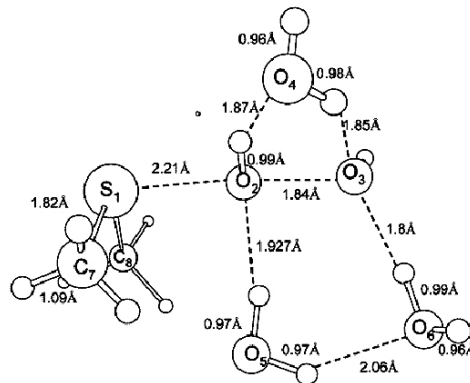
I.1.1 Oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une petite molécule non chargée qui va donc pouvoir diffuser aisément à travers les membranes et donc dans les cellules. La principale source de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provient de la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, qui est spontanée, ou est catalysée par les superoxyde dismutases (SOD).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va être responsable, directement ou indirectement *via* la formation d'OH<sup>•</sup>, de l'oxydation de nombreuses biomolécules. Il peut ainsi intervenir dans la transduction du message cellulaire ou dans la régulation de l'expression de certains gènes.

A forte concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable d'oxyder les Met directement, sans passer par la production d'OH<sup>•</sup>, par un processus d'oxydation à deux électrons. Des études de chimie théorique ont montré que le mécanisme d'oxydation d'un diméthyl sulfure se fait de façon concertée avec la rupture de la liaison O-O de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la formation du sulfoxyde (Chu et Trout, 2004). Au cours de ce mécanisme, des molécules d'eau vont stabiliser les charges de l'état de transition grâce à la formation de liaisons hydrogènes avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 1).



**Figure 1 :** Stabilisation de l'état de transition de l'oxydation d'une molécule de diméthyl sulfure par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> faisant intervenir trois molécules d'eau (d'après Chu et Trout, 2004).

Dans ce modèle, trois molécules d'eau (O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub> et O<sub>6</sub>) stabilisent la distribution de charge induite par la séparation entre les deux oxygènes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> et O<sub>3</sub>). C<sub>7</sub>-S<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> représente la molécule de diméthyl sulfure.

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

### **I.1.2 Oxydation par le radical hydroxyle (OH·)**

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

Il peut être généré dans la cellule par clivage réducteur de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1), par coupure homolytique d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2), ou par la réaction de Fenton faisant intervenir le fer sous forme Fe<sup>2+</sup> ou des métaux de transition (3).



OH· va réagir avec la Met suivant une réaction d'oxydation à un électron. La première étape de la réaction consiste en une addition d'OH· sur l'atome de soufre de la Met entraînant la formation d'un radical hydroxysulfuranyl.

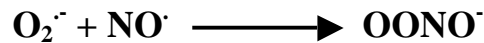


Ce radical sulfuranyl est très instable et présente une réactivité assez complexe au niveau des protéines et des peptides. En effet, la déshydratation de ce radical engendre la formation d'intermédiaires radical cations à liaison à trois électrons de type S·:N ou S·:O (deux électrons dans une orbitale  $\sigma$ -liante et un électron sur une orbitale  $\sigma^*$ -antiliante). Ces intermédiaires radicalaires vont pouvoir évoluer vers différentes formes et notamment vers le clivage de la chaîne principale des protéines et des peptides.

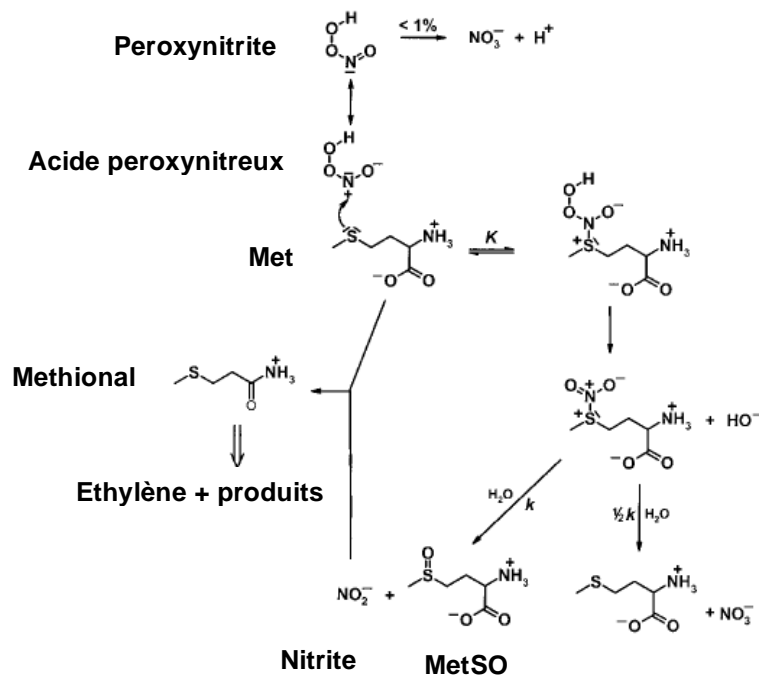
Les MetSO ne pourront être formées qu'en présence d'O<sub>2</sub>. Le radical cation peut ainsi réagir avec O<sub>2</sub> pour former un azasulfonium, qui pourra s'hydrolyser pour former un sulfoxyde (Miller *et al.*, 1998), ou encore réagir directement avec O<sub>2</sub> pour former un intermédiaire radical peroxyde. Ce radical peroxyde peut ensuite réagir *via* une oxydation à deux électrons pour former un sulfoxyde (Schoneich et Bobrowski, 1994).

I.1.3 Oxydation par le peroxy-nitrite (HOONO)

Le peroxy-nitrite provient de la réaction entre le  $\text{NO}^\cdot$  et  $\text{l'O}_2^\cdot$  et présente une faible durée de vie. Les sites de production du peroxy-nitrite sont associés aux sources d' $\text{O}_2^\cdot$  (NADPH oxydases ou chaîne respiratoire des mitochondries), puisque  $\text{l'O}_2^\cdot$ , contrairement au  $\text{NO}^\cdot$  qui est relativement stable et diffusible, présente une demi-vie très courte et donc ne peut diffuser à travers les membranes.



Le peroxy-nitrite va oxyder les Met suivant une réaction d'oxydation à deux électrons (Perrin et Koppenol, 2000). Un mécanisme catalytique de cette oxydation a été proposé (Figure 2). La première étape de ce mécanisme consiste en l'attaque nucléophile du soufre de la Met sur l'azote du HOONO entraînant la formation d'un adduit entre ces deux molécules. La perte d'un groupement hydroxyle au niveau de cet adduit ainsi que l'addition d'une molécule d'eau au niveau du soufre de la Met entraîne la formation d'une MetSO et de nitrite. Si l'addition de la molécule d'eau a lieu sur l'atome d'azote, il y a alors formation de Met et de nitrate. Le nitrite formé va lui pouvoir réagir avec une autre Met, selon un mécanisme d'oxydation à un électron, entraînant entre autre la formation d'éthylène.



**Figure 2 :** Mécanisme proposé pour l'oxydation de la Met par le peroxy-nitrite (d'après Perrin et Koppenol, 2000).

## **I.2 Propriétés des sulfoxydes**

Avant de s'intéresser plus particulièrement au mécanisme catalytique des Msr, il est important de connaître les propriétés associées à la fonction sulfoxyde. La structure électronique des sulfoxydes a été l'objet de très nombreuses études notamment sur la nature de la liaison S-O. En réalité, la liaison S=O n'est pas une double liaison ordinaire de type  $p-\pi$  mais dans ce cas particulier, en plus de la liaison  $\sigma$ , une liaison  $\pi$  peut être formée *via* l'interaction entre une paire d'électrons libres de l'oxygène et l'orbitale d vacante du soufre, ce qui entraîne la formation d'une double liaison  $p-d$ . De plus, les distances observées grâce à des structures obtenues par rayon X, les fréquences d'élongation obtenues par IR, le fort moment dipolaire mesuré ainsi que les études de chimie théorique, suggèrent que la double liaison S=O est fortement polarisée (Cioloswski et Mixon, 1993 ; Dobado *et al.*, 1999 ; Reed et Schleyer, 1990 ; Davies, 1981 ; Dreizler et Dendle, 1964). Enfin, la moyenne des longueurs de la liaison S-O, calculée à partir de résultats RX, passe de 1,492 Å pour un sulfoxyde libre à 1,587 Å pour un sulfoxyde protoné (Calligaris, 2004). Tous ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la liaison S-O serait une liaison simple  $\sigma$  polarisée dont la longueur dépend fortement des interactions électrostatiques mises en jeu. Les atomes de soufre et d'oxygène portent alors respectivement des charges, totales ou partielles, positives et négatives.

## **I.3 Conséquence de l'oxydation des méthionines**

L'oxydation des Met peut être considérée comme une modification post-traductionnelle non enzymatique qui entraîne des changements de propriété de ce résidu. En effet, la chaîne latérale de la Met est plutôt hydrophobe et flexible. Au contraire, après oxydation en MetSO, la chaîne latérale devient plus polaire et plus encombrante. En fonction de la localisation des résidus Met oxydés, les conséquences peuvent être différentes. Ainsi l'oxydation de Met enfouies au sein d'une protéine va engendrer des changements conformationnels locaux pouvant mener à l'altération ou à la perte de la fonction de certaines protéines. L'oxydation de résidus Met localisés à la surface de protéines peut avoir un rôle de protection de ces protéines vis-à-vis d'un stress oxydant. Ces conséquences variées de l'oxydation des Met sont illustrées au travers d'exemples non exhaustifs dans les paragraphes suivants.

### I.3.1 Modulation de la fonction des protéines

#### I.3.1.1 Altération de la fonction des protéines

Dans certains cas, l'oxydation des Met en MetSO va entraîner une altération de la fonction des protéines. C'est le cas par exemple de la cathepsine G, une protéase à Ser présente dans les granules azurophiles des neutrophiles. Cette protéase est impliquée dans les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis des microorganismes pathogènes. L'activité protéolytique de cette protéine est limitée par HOCl qui est un produit spécifique de la myéloperoxydase également présente au niveau des granules azurophiles des neutrophiles. Ainsi, HOCl est responsable de l'oxydation de la Met110, localisée à l'intérieur du site actif de la cathepsine G. Ceci engendre un changement conformationnel au niveau du site actif qui entraîne la rupture des interactions de la triade catalytique et la formation d'un site de clivage protéolytique à l'intérieur de l'enzyme. L'enzyme va donc s'autoprotéolyser entraînant le relargage d'un peptide contenant l'Asp catalytique, la protéase est alors inactivée (Shao *et al.*, 2005).

Un autre exemple d'altération de la fonction concerne la protéine GroEL. GroEL est une protéine chaperone oligomérique d'*Escherichia coli* (*E. coli*) qui est impliquée dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées ainsi que dans le repliement des protéines dénaturées au cours d'un stress. C'est une protéine dont la fonction est cruciale et une délétion du gène codant la protéine GroEL est considérée comme potentiellement létale chez tous les organismes. GroEL est sensible à l'oxydation par les espèces réactives générées par les phagocytes comme ONOO<sup>-</sup> et HOCl. L'oxydation des Met de GroEL entraîne le passage de la protéine d'une forme oligomérique à une forme monomérique inactive. La structure tétradécamérique de GroEL montre que ces deux résidus Met sont localisés à l'interface entre les deux heptamères, c'est pourquoi leur oxydation entraîne une perte de la structure oligomérique (Khor *et al.*, 2004). C'est également le cas de la protéine Ffh de la particule SRP (Signal Recognition Particle) qui permet l'adressage des protéines chez les eucaryotes et les bactéries. Chez *E. coli*, la particule SRP est constituée de la protéine Ffh, de l'ARN 4,5S et du récepteur FtsY. La protéine Ffh possède un domaine riche en Met appelé M-domaine. Il a été montré que ce domaine possédait le site de fixation à l'ARN 4,5S et qu'il était nécessaire pour la fixation de la séquence signal des protéines au cours de la sécrétion. L'oxydation des Met du M-domaine de la protéine Ffh entraîne une incapacité à interagir avec l'ARN 4,5S pour former le complexe SRP actif (Ezraty *et al.*, 2004).

I.3.1.2 Modulation des canaux ioniques

L'oxydation des Met peut affecter la fonction des canaux à potassium voltage-dépendant qui jouent un rôle essentiel dans les activités de transduction du signal cellulaire. Les canaux à K<sup>+</sup> voltage-dépendant s'ouvrent en réponse à une dépolarisation et vont ensuite être soumis à une période d'inactivation. La vitesse d'inactivation des canaux à K<sup>+</sup> joue un rôle essentiel puisqu'elle détermine l'excitabilité cellulaire, et donc entre autre la fréquence du rythme cardiaque. L'inactivation des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendant est liée à la structuration des vingt premiers acides aminés de la protéine. Ces résidus vont former une structure globulaire qui va bloquer le pore du canal et ainsi entraîner l'inactivation du canal. Il a été montré que l'oxydation de la Met3 de ces protéines joue un rôle prépondérant dans la régulation du mécanisme d'inactivation. En effet, lorsque la Met est oxydée, la présence de l'oxygène polaire entraîne la destruction du domaine globulaire et permet au canal d'être rapidement de nouveau actif, le temps d'inactivation étant diminué (Ciorba *et al.*, 1997 ; Ciorba *et al.*, 1999).

Dans le cas des canaux à K<sup>+</sup> hERG, qui jouent un rôle prépondérant dans le potentiel d'action du cœur ainsi que dans la fonction neuronale, l'oxydation des Met entraîne un effet inverse. En effet, l'oxydation des Met des canaux hERG par la chloramine-T entraîne une altération de la fonction de ces canaux allant jusqu'à une inhibition quasi totale empêchant leur ouverture (Su *et al.*, 2007).

L'oxydation des Met module également la fonction de canaux à Ca<sup>2+</sup>. La calmoduline est une protéine de 148 acides aminés capable de lier le calcium. Elle est composée de deux domaines globulaires connectés par une chaîne flexible. La calmoduline possède 9 Met toutes oxydables en MetSO. Ces Met contribuent à la fixation de la calmoduline à ses cibles *via* des interactions hydrophobes. Une de ses cibles est RyR2 (ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channel) qui gouverne le relargage de Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique et qui permet au muscle cardiaque de se contracter. La fixation de la calmoduline à RyR2 entraîne son inactivation. L'oxydation des Met, et notamment de la Met124, de la calmoduline entraîne un changement conformationnel de la protéine responsable d'une diminution de la coopérativité de liaison du calcium et de la perte de l'association productive entre la calmoduline et RyR2 (Balog *et al.*, 2006).

Un phénomène identique est observé entre la calmoduline et des ATPases membranaires dépendantes de la concentration en Ca<sup>2+</sup> (Gao *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2001).

### I.3.2 Rôle dans la protection des protéines

A l'intérieur des protéines, certaines Met vont être plus sensibles à l'oxydation que d'autres. Ceci est à corrélérer avec l'exposition de ces résidus à la surface des protéines. Des études ont ainsi montré que les Met exposées à la surface sont plus sensibles à l'oxydation par la chloramine-T (Shechter *et al.*, 1975). Ces Met pourraient donc fonctionner comme un système de défense antioxydant pour les protéines en piégeant les FAO et empêchant ainsi l'oxydation de Met essentielles pour la structure ou la fonction des protéines.

L'oxydation de la glutamine synthétase par  $H_2O_2$  a été étudiée afin de mettre en évidence les Met les plus sensibles à l'oxydation, leur localisation au sein de la protéine et de corrélérer oxydation des Met et perte de l'activité catalytique de l'enzyme (Levine *et al.*, 1999). La glutamine synthétase possède au total 15 Met. Pour une concentration en  $H_2O_2$  de 160 mM, seules 8 des 15 Met présentes sont oxydées, et dans ces conditions, l'activité  $\gamma$ -glutamyl transférase reste quasiment inchangée, avec une diminution de seulement 15%. L'augmentation de la concentration en  $H_2O_2$  n'entraîne pas d'oxydation supplémentaire. Les Met non oxydées sont enfouies dans le cœur de l'enzyme alors que les Met oxydées sont toutes localisées en surface, entourant le site actif de l'enzyme.

Des études menées sur l'interféron  $\alpha 2$ -b (Gitlin *et al.*, 1996) et sur un recombinant de l'huSCF (human Stem Cell Factor) (Hsu *et al.*, 1996) ont également permis de montrer que les Met les plus sensibles à l'oxydation sont localisées à la surface des protéines.

### I.3.3 Maladies neurodégénératives

De nombreuses études ont montré qu'il existait une corrélation entre l'oxydation des Met et les maladies neurodégénératives comme celle d'Alzheimer ou de Parkinson.

Dans le cas de la maladie de Parkinson, on observe l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine dans les cellules dopaminergiques. En condition normale, l' $\alpha$ -synucléine fibrille. Cette fibrillation est inhibée suite à l'oxydation de résidus Met de l' $\alpha$ -synucléine, ce qui a pour conséquence de favoriser l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine. Ces agrégats d' $\alpha$ -synucléine sont cytotoxiques pour les cellules, en contribuant à la destruction des cellules dopaminergiques d'une zone du cerveau, la substance noire, qui participe au contrôle des mouvements (Glaser *et al.*, 2005). L'oxydation des Met du peptide  $\beta$ -amyloïde serait également, en cas d'oxydation non contrôlée, un facteur favorisant la destruction des cellules corticales, sur le même principe que pour l' $\alpha$ -synucléine.

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le dépôt de peptides  $\beta$ -amyloïdes ( $A\beta$ ) au niveau des plaques séniles est un élément important dans la pathologie de cette maladie. En conditions normales, les peptides  $A\beta$  fibrillent ce qui empêche leur aggrégation. L'oxydation d'une Met en position 35 ralentit cette fibrillation, et favorise l'aggrégation sous forme de plaques séniles structurées en feuillets- $\beta$  toxiques pour les cellules corticales.

### **I.3.4 Dégradation des protéines**

L'oxydation des protéines serait un marqueur de dégradation par le protéasome 20S. Dans ces conditions, la dégradation des protéines est ATP indépendante et ne nécessite pas d'ubiquitinylation. C'est le cas par exemple de la calmoduline sous forme oxydée (CaMox) qui est reconnue par le protéasome pour être dégradée. Cette dégradation entraîne le relargage de grands fragments polypeptidiques du côté N-terminal et de petits peptides du côté C-terminal qui sont fortement enrichis en MetSO. L'ampleur de la dégradation de CaMox est directement liée à la stoechiométrie d'oxydation des deux Met144 et Met145 situées dans le fragment C-terminal (Sacksteder *et al.*, 2006).

## **I.4 Rôle des Msr**

Les Msr catalysent la réduction des MetSO en Met et sont donc impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, le vieillissement cellulaire et la pathogénicité des bactéries. Ces différents rôles sont illustrés dans les paragraphes qui suivent.

### **I.4.1 Lutte contre le stress oxydant**

Les Msr vont jouer un rôle dans la lutte contre le stress oxydant soit *via* leur rôle de réparation permettant de restaurer la fonction des protéines oxydées (voir paragraphe suivant), soit *via* leur rôle dans la détoxification des FAO en réduisant les MetSO exposées à la surface des protéines (Levine *et al.*, 1996). Les premières preuves de l'implication des Msr dans la protection des cellules contre le stress oxydant ont été décrites chez *E. coli* où des souches déficientes en MsrA montrent une sensibilité accrue à  $H_2O_2$  (Moskovitz *et al.*, 1995). Des études similaires ont été menées chez *Staphylococcus aureus* où la délétion du gène *msrA* entraîne une augmentation de la sensibilité de la souche à  $H_2O_2$  (Singh *et al.*, 2001).



D'autres études menées chez les eucaryotes ont également permis de mettre en évidence l'implication des Msr dans la lutte contre le stress oxydant. En effet, des souris ne possédant plus le gène *msrA* sont plus sensibles au stress oxydant et présentent des problèmes neurologiques (Moskovitz *et al.*, 2001). D'autre part, la surexpression de MsrA rend la drosophile plus résistante au paraquat (Ruan *et al.*, 2002). Plus récemment, il a également été montré l'implication de MsrA (Kantorow *et al.*, 2004) et MsrB (Marchetti *et al.*, 2005) dans la protection des cellules épithéliales de la lentille humaine vis-à-vis du stress oxydant, entraînant la formation de cataracte. Il a également été montré que MsrA est essentielle dans ces cellules pour le maintien des fonctions mitochondriales (Marchetti *et al.*, 2006). Enfin, des cellules PC12 humaines surexprimant le gène *msrA* sont moins sensibles au stress oxydant généré au cours d'un phénomène d'hypoxie/réoxygénation (Yermolaieva *et al.*, 2004).

#### I.4.2 Régulation et réparation de protéines

La réduction des MetSO en Met peut moduler ou restaurer la fonction des protéines oxydées. L'oxydation des Met et leur réduction par les Msr pourrait constituer un mécanisme de régulation très important au niveau biologique au même titre que les mécanismes de régulation impliquant l'oxydation/réduction des Cys ou encore les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation.

##### I.4.2.1 La calmoduline

Comme décrit dans le paragraphe 1.3.1.2 page 8, la calmoduline intervient dans la régulation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant et des canaux hERG. La réduction des Met oxydées de la calmoduline par les MsrA et B a été très largement étudiée *in vitro*. La MsrA seule ne permet pas la réduction de la totalité des isomères *R* et *S* des MetSO de la calmoduline. Néanmoins, la réduction de la calmoduline par la MsrA lui permet de recouvrer sa capacité à se lier au domaine inhibiteur de la pompe Ca-ATPase (Sun *et al.*, 1999). De façon similaire, l'utilisation seule de la MsrB ne permet pas la réduction de toutes les MetSO au sein de la calmoduline. En revanche, l'utilisation combinée de ces deux enzymes permet la réduction de la totalité des MetSO de la calmoduline (Grimaud *et al.*, 2001).

Cet exemple illustre donc bien les mécanismes de régulation métabolique engendrés par le processus d'oxydation/réduction des Met au sein de protéines régulatrices.

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

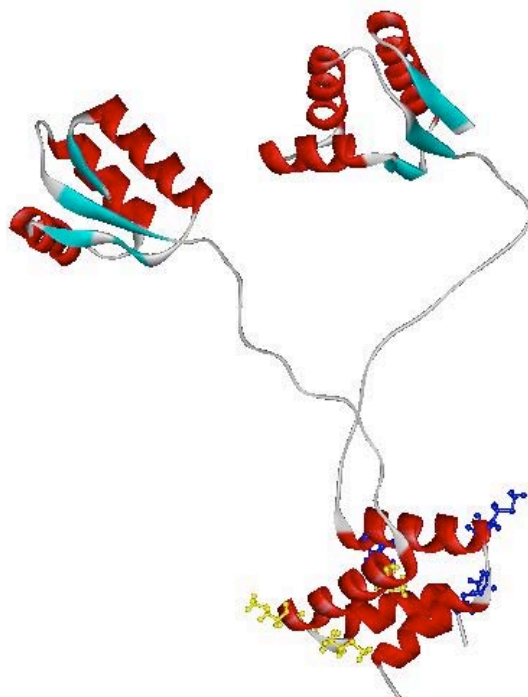
### **I.4.2.2 Ffh**

L'oxydation des Met du M-domaine de la protéine Ffh empêche son interaction avec l'ARN 4,5S et la formation du complexe SRP. La protéine Ffh oxydée au niveau de ses Met se révèle être un substrat de MsrA et MsrB et la réduction des MetSO permet à la protéine de recouvrer ses capacités à lier l'ARN 4,5S. D'autres expériences réalisées *in vivo* ont montré que dans des souches d'*E. coli*, les délétions des gènes *msrA* et *msrB* entraînaient l'accumulation de Ffh oxydée au niveau de ses Met (Ezraty *et al.*, 2004).

Ceci montre l'importance de MsrA et MsrB dans le processus de réparation de la protéine Ffh, permettant ainsi la formation d'une particule SRP fonctionnelle.

### **I.4.2.3 La protéine ribosomique L7/L12**

La protéine ribosomique L7/L12 est une protéine dimérique constituée de la protéine L7 et de la protéine L12, L7 correspondant à une forme N-acétylée au niveau N-terminal de L12. Cette protéine est essentielle pour l'efficacité de synthèse des protéines chez les bactéries. En effet, la sous-unité 50S du ribosome sans L7/L12 est incapable d'interagir de façon efficace avec les facteurs impliqués dans les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison de la synthèse protéique. La forme biologiquement active de la protéine L7/L12 capable de se fixer au ribosome est la forme dimérique. Les protéines L7 et L12 possèdent 3 Met aux positions 14, 17 et 26 (Figure 3).



**Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la protéine L7/L12 sous forme dimérique.**

Les Met de chaque protéine sont représentées en jaune ou en bleu (d'après Bocharov *et al.*, 2004). La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol (d'après le fichier PDB 1rqu).

L'oxydation de ces Met en MetSO entraîne une dissociation des protéines L7 et L12. Le complexe actif n'est donc plus formé et il n'y a plus de fixation au niveau du ribosome (Caldwell *et al.*, 1978). Des études ont montré que ces MetSO pouvaient être réduites par la MsrA, ce qui permet à la protéine de recouvrer son activité biologique (Brot *et al.*, 1980).

#### I.4.3 Implication dans le vieillissement cellulaire

Le vieillissement cellulaire est caractérisé par une augmentation du taux des protéines oxydées, due à une altération de l'homéostasie redox. La quantité de protéines oxydées résulte de la différence entre la vitesse d'oxydation des protéines et la vitesse de dégradation et de réparation de ces protéines. Le rôle des Msr dans le vieillissement cellulaire est particulièrement bien documenté. Il a ainsi été montré que chez des drosophiles transgéniques, la surexpression du gène *msrA* retarde l'apparition du vieillissement et rend les drosophiles plus résistantes au stress oxydant généré par le paraquat (Ruan *et al.*, 2002). Au contraire, des souris ne possédant plus le gène *msrA* sont plus sensibles au stress oxydant ; elles présentent une accumulation de protéines oxydées et voient leur durée de vie diminuée de 40% (Moskovitz *et al.*, 2001). Il a également été montré que dans des organes

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

particulièrement riches en Msr, comme le foie et les reins, l'activité Msr est significativement diminuée au cours du vieillissement. Cette diminution est directement liée à une diminution de l'expression des gènes codant les différentes Msr existantes (Petrooulos *et al.*, 2001).

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

### I.4.4 Pathogénicité des bactéries

Depuis quelques années, la MsrA est considérée comme un déterminant de la virulence chez de nombreux pathogènes. En effet, le rôle antioxydant des Msr permet aux bactéries de résister aux FAO générées par l'hôte lors d'une infection.

*Erwinia chrysanthemi* est un pathogène de plantes. La délétion du gène *msrA* empêche l'invasion des plantes par la bactérie en augmentant la sensibilité de celle-ci aux agents oxydants (El Hassouni *et al.*, 1999). Les plantes en réponse à l'invasion par *E. chrysanthemi* produisent une quantité accrue de FAO. Des délétions au niveau du gène *msrA* permettraient donc de diminuer la virulence d'*E. chrysanthemi* en réduisant le temps de survie de la bactérie dans les plantes.

*S. aureus* est une des principales causes d'infections nosocomiales et a acquis de nombreuses résistances aux antibiotiques. Chez ce microorganisme, *msrA* et *msrB* sont les deux premiers cistrons d'un opéron qui inclus un troisième cistron codant une PTS perméase et un quatrième cistron de fonction inconnue (Singh *et al.*, 2003). Cet opéron est induit par des antibiotiques permettant l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, ce qui suggère un lien entre l'activité MsrA/MsrB et la biochimie de la paroi bactérienne. La délétion des cistrons *msrA* et *msrB* est responsable d'une augmentation de la sensibilité de la bactérie vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont des bactéries pathogènes obligatoires de l'homme responsables respectivement de la méningite et de la blennorragie. Ces deux pathogènes sont exposés à de fortes concentrations de FAO au cours de l'infection, produites par les cellules immunitaires de l'hôte. La protéine PilB est décrite jouer un rôle dans la pathogénicité de ces bactéries en permettant une meilleure résistance vis-à-vis d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elle est constituée de trois domaines fonctionnels : le domaine central et le domaine C-terminal portant respectivement l'activité MsrA et MsrB et le domaine N-terminal portant une activité

disulfure oxydoréductase de type DsbE (Olry *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2005 ; Ranaivoson *et al.*, 2006). A partir du gène *pilB*, deux formes protéiques sont produites suite à la présence d'un site interne de réinitiation de la traduction : une forme périplasmique contenant les trois domaines cités précédemment et une seconde forme cytoplasmique ne contenant que les domaines MsrA et MsrB (Skaar *et al.*, 2002). La protéine PilB a été décrite comme étant ancrée dans la membrane externe de la bactérie. Des études *in vivo* ont permis de démontrer que l'absence de la forme périplasmique de cette protéine entraînait une diminution de la résistance des bactéries à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Skaar *et al.*, 2002).

Les cellules du système immunitaire et notamment les macrophages produisent de grandes quantités de FAO et de Formes Activées de l'Azote en réponse à une invasion par un microorganisme. Une souche délétée du gène *msrA* de *Mycobacterium smegmatis* est plus sensible à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparaison avec la souche sauvage. Ceci suggère donc un rôle important de la MsrA dans la survie intracellulaire de *M. smegmatis* à l'intérieur des macrophages. De ce point de vue, MsrA peut être considérée comme un facteur de virulence important dans la survie des microorganismes à l'intérieur des macrophages (Douglas *et al.*, 2004).

## **I.5 Propriétés des Msr**

L'oxydation des Met en MetSO par les FAO engendre la formation de deux stéréoisomères de configuration *R* ou *S* sur la fonction sulfoxyde. Les Msr catalysent la réduction stéréospécifique des MetSO libres ou incluses dans un polypeptide. Les MsrA catalysent spécifiquement la réduction de l'isomère *S* de la MetSO alors que les MsrB réduisent spécifiquement l'isomère *R* de la MetSO.

### **I.5.1 Distribution tissulaire et localisation subcellulaire**

#### **I.5.1.1 MsrA**

Chez les mammifères, un seul gène code la MsrA. Cette protéine est retrouvée dans le cytosol, dans les mitochondries et dans le noyau (Kim et Gladishev, 2005). La MsrA est fortement produite dans les reins, le foie, le cerveau et le cœur (Kuschel *et al.*, 1999).

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

### **I.5.1.2 MsrB**

Les mammifères possèdent 3 gènes *msrB* qui codent les protéines MsrB1, MsrB2 et MsrB3. MsrB1 est localisée au niveau du cytosol et du noyau, MsrB2 est localisée au niveau des mitochondries et MsrB3 est présente sous deux formes protéiques, MsrB3A et MsrB3B qui proviennent de l'épissage alternatif au niveau du premier exon du gène correspondant. MsrB3A est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et MsrB3B au niveau des mitochondries.

La protéine MsrB1 est principalement retrouvée dans le foie et le pancréas (Lescure *et al.*, 1999), la MsrB2 dans le cœur, les muscles squelettiques, le foie et les reins (Jung *et al.*, 2002), et la MsrB3 dans les muscles lisses, le cœur, l'aorte et les muscles squelettiques (Hansel *et al.*, 2003).

### **I.5.2 Organisation génomique**

Les gènes *msrA* et *msrB* possèdent des homologues dans la quasi-totalité des génomes séquencés disponibles à ce jour. En effet, ces deux gènes sont présents à la fois chez les bactéries, les archae et les eucaryotes ce qui suggère des propriétés essentielles de ces deux gènes ou de leur protéine correspondante. Seuls quelques organismes ne possèdent pas ces deux gènes : certaines archae, des bactéries hyperthermophiles et certaines bactéries pathogènes obligatoires (Kryukov *et al.*, 2002).

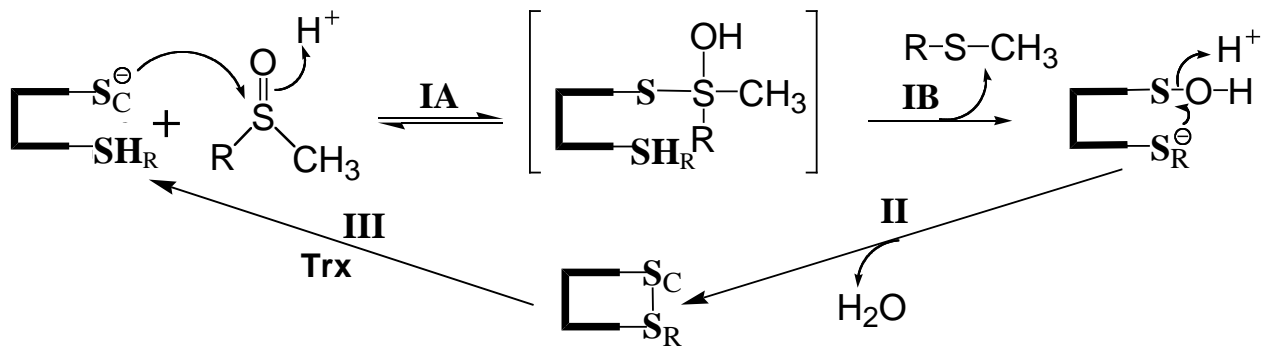
Ces deux gènes vont pouvoir être organisés de différentes manières au sein des génomes bactériens. Chez de nombreuses bactéries incluant *E. coli*, les gènes *msrA* et *msrB* constituent deux unités transcriptionnelles distinctes et éloignées l'une de l'autre dans le chromosome. Ces deux gènes vont pouvoir être organisés en opéron comme par exemple chez *Bacillus subtilis* et *S. aureus*, et dans certains cas, comme chez les bactéries du genre *Neisseria*, *msrA* et *msrB* sont fusionnés pour conduire à la synthèse d'un seul polypeptide, appelé PilB, contenant trois domaines, deux portant les activités MsrA et MsrB et un domaine N-terminal supplémentaire possédant un repliement de type DsbE .

Le nombre de copies des gènes *msrA* et *msrB* varie en fonction des organismes. Par exemple, *E. coli* ne possède qu'une seule copie de *msrA* et *msrB* alors que *S. aureus* possède trois copies de *msrA* et une copie de *msrB* (Pour revue, Ezraty *et al.*, 2005).

I.5.3 Mécanisme catalytique des Msr

Les MsrA et B caractérisées jusqu'ici sont des enzymes à Cys essentielles et qui présentent toutes le même mécanisme catalytique faisant intervenir la chimie de l'acide sulfénique (Figure 4) (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002 et pour revue voir Boschi-Muller *et al.*, 2005). La première étape de ce mécanisme, également appelée étape réductase, consiste en la formation d'un complexe michaelien entre la Msr et la MetSO et à l'attaque nucléophile de la Cys catalytique ( $S_C$ ) de la Msr sur la fonction sulfoxyde. Ceci entraîne la formation d'un état de transition appelé sulfurane. Cet état de transition va ensuite se réarranger pour permettre la libération d'une mole de Met par mole d'enzyme ainsi que la formation d'un intermédiaire acide sulfénique.

Au cours de la deuxième étape, la Cys de régénération ( $S_R$ ) attaque l'intermédiaire acide sulfénique entraînant la libération d'une mole d'eau par mole d'enzyme ainsi que la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Enfin, la troisième étape permet la régénération de la Msr grâce à la réduction du pont disulfure intramoléculaire par la Trx *in vivo*. Ceci aboutit au relargage d'une Msr sous forme réduite ainsi que d'une Trx sous forme oxydée, la Trx étant elle-même réduite par la Thiorédoxine réductase (TrxR) NADPH-dépendante.



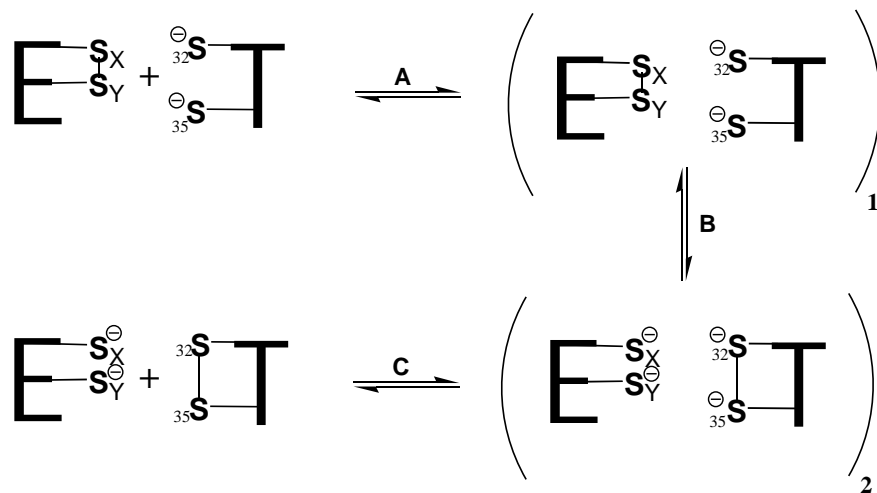
**Figure 4 : Mécanisme catalytique des Msr à deux Cys.**

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

La vitesse de la première étape de ce mécanisme catalytique est rapide ( $790\ s^{-1}$  pour la MsrA de *N. meningitidis* et  $85\ s^{-1}$  pour la MsrB de *N. meningitidis*). La vitesse de la seconde

**Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases**

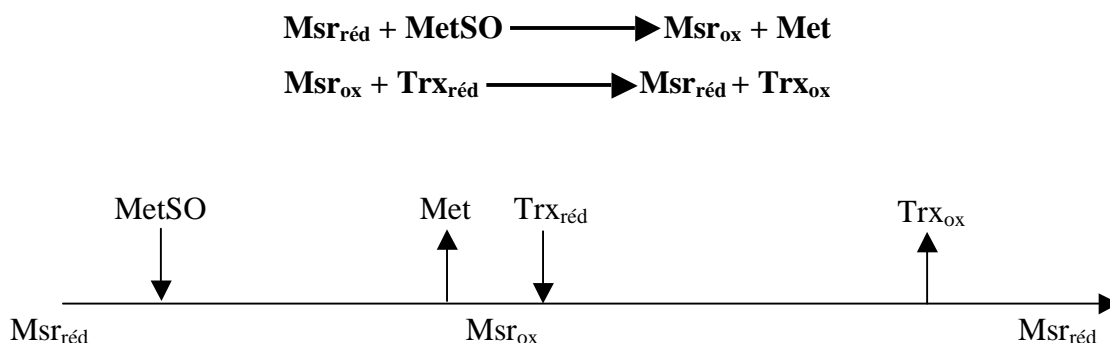
étape est limitée par celle de la première étape. Enfin, la troisième étape de réduction du pont disulfure par la Trx est l'étape cinétiquement limitante du mécanisme. Plus précisément, c'est l'étape de dissociation entre la Msr réduite et la Trx oxydée qui constitue le processus limitant (Figure 5) (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005).



**Figure 5 : Mécanisme de réduction du pont disulfure intramoléculaire des Msr par la Trx.**

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

Le mécanisme cinétique des Msr est de type ping-pong (Figure 6), en présence de réducteur comme la Trx ou le DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2001 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005). Ce mécanisme peut en effet être décrit par deux demi-réactions.



**Figure 6 : Schéma du mécanisme cinétique de type ping-pong des Msr.**



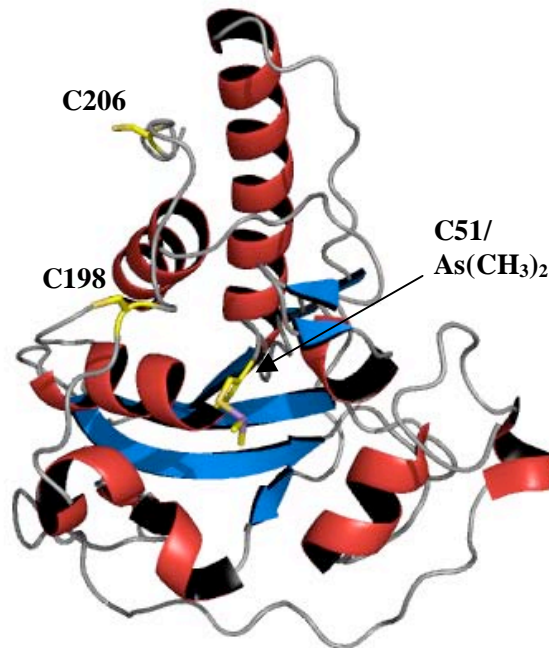
#### I.5.4 Structures tridimensionnelles

Les MsrA et les MsrB présentent un mécanisme catalytique identique. Pourtant ces deux protéines ne présentent aucune identité de séquence. Leurs structures tridimensionnelles s'avèrent être également différentes. Les Msr sont toutes deux des protéines monomériques de 170 à 211 résidus pour les MsrA et d'environ 146 résidus pour les MsrB.

##### I.5.4.1 Structure tridimensionnelle des MsrA

Actuellement, les structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, de *Bos taurus* de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Populus trichocarpa* et de *N. meningitidis* ont été résolues par diffraction aux rayons X et la structure de la MsrA d'*E. coli* a été résolue par RMN (Tête-Favier *et al.*, 2000 ; Lowther *et al.*, 2000 ; Taylor *et al.*, 2003 ; Rouhier *et al.*, 2007 ; Ranaivoson *et al.*, 2008 ; Coudeville *et al.*, 2006 ). Toutes ces MsrA présentent la même structure globale (Figure 7) :

- une partie centrale appelée corenzyme qui contient 4 hélices  $\alpha$ , 8 brins  $\beta$  ainsi que des coudes  $\beta$ . C'est dans cette partie que se situe le site actif contenant la Cys51 qui se trouve positionnée à l'extrémité N-terminale de l'hélice  $\alpha$ 1. Cette partie corenzyme est suffisante pour catalyser la réduction de la MetSO en présence de DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2001).
- une extrémité N-terminale ne possédant pas de structure secondaire particulière de type hélice  $\alpha$  ou feuillet  $\beta$  et qui est stabilisée par un grand nombre de liaisons hydrogène et de contacts de van der Waals avec le corenzyme. Cette extrémité peut être de longueur variable allant d'une quarantaine de résidus chez la MsrA d'*E. coli* à moins de cinq chez la MsrA de *B. subtilis* et *N. meningitidis*
- une extrémité C-terminale non structurée dans laquelle se trouvent de nombreux résidus Glycine ainsi que les Cys198 et Cys206.



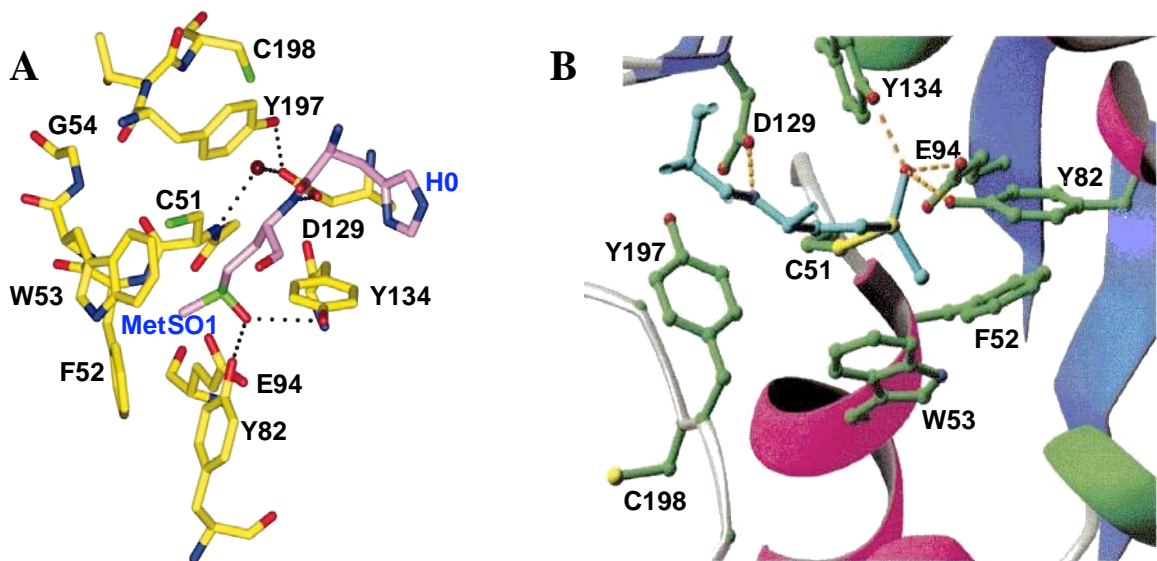
**Figure 7 :** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du monomère de la MsrA d'*E. coli*

Les structures secondaires en hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge, et les brins  $\beta$  en bleu. Les 3 Cys impliquées dans le mécanisme catalytique sont représentées en jaune. La Cys51 catalytique est liée covalamment à une molécule de diméthyl arsenate. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol (d'après le fichier PDB 1FF3).

Le site actif des MsrA est très évasé et est localisé à la surface de la protéine. Dans toutes les structures tridimensionnelles obtenues à ce jour, excepté celle de la MsrA de *N. meningitidis*, une molécule est présente au sein du site actif, pouvant mimer un complexe michaelien enzyme/substrat ou un état de transition. Ainsi, on observe la présence d'un adduit diméthyl arsenate sur la Cys51 catalytique dans le cas de la MsrA d'*E. coli*, d'un adduit avec le DTT pour la MsrA de *B. taurus*, d'une Met provenant d'un monomère adjacent dans le cas de la MsrA de *M. tuberculosis* et d'une molécule de  $\beta$ -mercaptoéthanol pour la MsrA de peuplier (Figure 8).

L'ensemble de ces structures montre que le site actif est centré autour de la Cys51 localisée à l'extrémité N-terminale de l'hélice  $\alpha 1$ . L'examen des alignements de séquence ainsi que des structures tridimensionnelles montre la présence dans le site actif de résidus fortement conservés et a permis de définir trois sous-sites à l'intérieur du site actif : 1) une poche hydrophile composée des résidus Tyr82, Tyr134 et Glu94, qui sont bien positionnés pour interagir avec l'atome d'oxygène de la MetSO *via* des interactions de type liaisons H ; 2) une poche hydrophobe constituée des résidus Phe52 et Trp53, dans laquelle sont localisés les groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène du substrat sulfoxyde. Le Trp53 est positionné de façon adéquate d'une part *via* une interaction de type « stacking »  $\pi$ - $\pi$  entre son noyau indole

et le noyau phényle de la Tyr189 et d'autre part *via* une liaison H entre le groupement NH de son noyau indole et le N $\delta$  de l'His186 ; 3) un sous-site pouvant interagir avec la chaîne principale du substrat constitué des résidus Asp129 et Tyr197. Le groupement carboxylate de l'Asp129 est impliqué dans trois liaisons H : une entre l'un de ces oxygènes et le groupement NH du squelette du substrat MetSO et les deux autres entre son deuxième oxygène et d'une part le groupement hydroxyle de la Tyr197 et d'autre part une molécule d'eau qui elle-même interagit avec le groupement NH de la chaîne principale de la Cys51. Le noyau phényle de la Tyr197 formerait une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec la liaison peptidique existante entre le groupement NH de MetSO et le groupement CO du résidu précédent.



**Figure 8 :** Représentation de la structure des sites actifs des MsrA de *M. tuberculosis* et de *B. taurus*.

A) Site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* dans lequel une MetSO a été modélisée à partir d'une Met initialement présente provenant d'un monomère de MsrA adjacent. Le dipeptide His-MetSO est représenté en violet, les acides aminés du site actif en jaune. La molécule d'H<sub>2</sub>O est représentée en rouge foncé. Les traits pointillés représentent les liaisons H potentielles. B) Site actif de la MsrA de *B. taurus* dans lequel un substrat sulfoxyde est modélisé (représenté en bleu) à la place d'une molécule de DTT initialement présente et qui pontait les Cys51 et Cys198 du même monomère. Les chaînes latérales des acides aminés sont représentées en vert, les traits pointillés représentent les liaisons H.

Récemment, quatre structures de la MsrA de *N. meningitidis* ont été résolues, correspondant aux quatre intermédiaires générés au cours du cycle catalytique de l'enzyme : une structure sous forme réduite avec pour la première fois un site actif non occupé, une structure du variant C51S de la MsrA en complexe avec un substrat AcMetSONHMe, représentatif du complexe michaelien, une structure du variant C198S de la MsrA avec

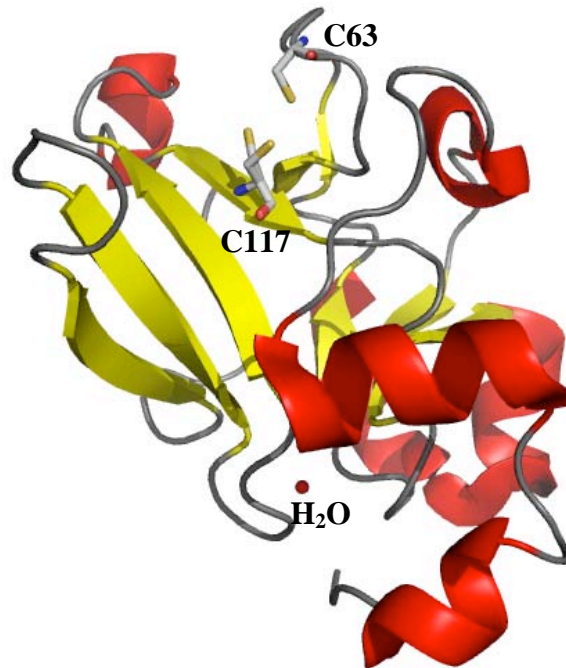
## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

l'intermédiaire acide sulfénique sur la Cys51 et enfin, une structure de l'enzyme sous forme oxydée (pont disulfure C51-C198) (Ranaivoson *et al.*, 2008).

Globalement, le repliement de l'enzyme reste inchangé dans toutes les structures tridimensionnelles décrites ainsi que dans les structures de la MsrA d'*E. coli* obtenue par RMN (Coudevylle *et al.*, 2006). Les structures des formes oxydées pont disulfure de la MsrA de *N. meningitidis*, obtenue par cristallographie, et de la MsrA d'*E. coli* obtenue par RMN, présentent par contre des changements de conformations importants en comparaison avec les autres structures. Ceci était prévisible étant donné que dans les structures précédentes, la distance mesurée entre les atomes de soufre des Cys51 et Cys198 est d'au moins 8 Å et donc incompatible avec la formation d'un pont disulfure. Dans ce cas, un mouvement global restructure complètement la région Thr121-Thr132 contenant les deux petits brins  $\beta 3'$  et  $\beta 3''$ . Le résidu Asp129 est ainsi déplacé de plus de 10 Å, ce mouvement semblant majoritairement lié à des rotations au niveau des chaînes principales des résidus Thr121 et Thr132. Ces rotations entraînent un basculement vers le solvant de la chaîne polypeptidique 123/132 et ont pour conséquence d'exposer la surface à caractère hydrophobe du site actif (Ranaivoson *et al.*, 2008 ; Coudevylle *et al.*, 2006).

### I.5.4.2 Structures tridimensionnelles des MsrB

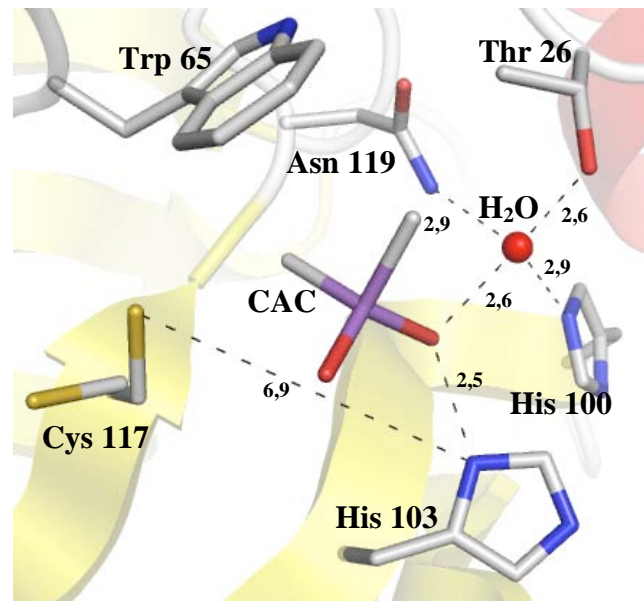
Actuellement, seule la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. gonorrhoeae* a été décrite (Lowther *et al.*, 2002). Les MsrB sont des protéines monomériques d'environ 146 acides aminés. Le cœur de l'enzyme est composé de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles twistés, composés respectivement de trois et cinq brins  $\beta$  dont le brin  $\beta 8$  qui contient la Cys117 catalytique, ainsi que de trois hélices  $\alpha$  et de cinq hélices  $3_{10}$  (Figure 9). La Cys63 impliquée dans le processus de régénération de l'enzyme est localisée à l'intérieur d'une boucle et est positionnée à une distance de 3,2 Å de la Cys117, ce qui est tout à fait compatible avec la formation d'un pont disulfure.



**Figure 9 :** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du monomère de la MsrB de *N. gonorrhoeae*.

Les deux conformations de la Cys117 catalytique, et la Cys63 de recyclage sont représentées. Les structures secondaires en hélice  $\alpha$  sont représentées en rouge, celles des brins  $\beta$  en jaune. La molécule d'eau qui mime la position du Zn dans le cas des MsrB à métal est représentée. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol (d'après le fichier PDB 1L1D).

Comme pour les MsrA, le site actif des MsrB est localisé à la surface de l'enzyme. Le site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* à l'intérieur duquel une molécule de cacodylate non liée covalamment est présente représente un bon modèle de complexe Michaelien entre l'enzyme et son substrat MetSO. L'examen du site actif de cette structure de MsrB permet de définir deux sous-sites : 1) une poche hydrophile constituée des résidus His103, His100, Thr26 et Asn119, qui sont bien positionnés pour interagir avec l'atome d'oxygène de la MetSO *via* des interactions de type liaisons H. En effet, un des oxygène du cacodylate forme une liaison H avec le N $\delta$  de l'His103. Cette interaction pourrait mimer une interaction entre l'oxygène du sulfoxyde de la MetSO et l'His103. L'azote  $\epsilon$  de l'His100, l'oxygène de la Thr26 et l'azote de l'Asn119 établissent une liaison H avec une molécule d'eau elle même établissant une liaison H avec l'oxygène du cacodylate qui pourrait mimer l'oxygène de la fonction sulfoxyde ; 2) une poche hydrophobe constituée essentiellement de la chaîne latérale du résidu Trp65, dans laquelle est localisé un des deux méthyles du cacodylate. Ce méthyle pourrait mimer le méthyle  $\epsilon$  de la MetSO (Figure 10).



**Figure 10 : Représentation du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae*.**

Les chaînes latérales des résidus conservés Thr26, Trp65, His100, His103, Cys117 (deux conformations) et Asn119 sont représentées. La molécule de cacodylate est nommée CAC sur le schéma. Les différentes distances sont indiquées en Å. Les structures secondaires en hélice  $\alpha$  sont représentées en rouge et les brins  $\beta$  en jaune. Cette figure a été réalisée à l'aide du logiciel PyMol (d'après le fichier PDB 1L1D).

L'inspection des structures tridimensionnelles révèle également l'existence d'une région présentant des homologies structurales avec le site de fixation du  $Zn^{2+}$  des enzymes de type Mss4 (impliquées dans la régulation de la protéine Rab qui est un facteur d'échange GTP/GDP) (Yu et Schreiber, 1995; Zhu *et al.*, 2001). Cette région de la MsrB correspond à la région qui contient le site de fixation du  $Zn^{2+}$  pour les métalloMsrB (Kryukov *et al.*, 2002; Olry *et al.*, 2005).

### I.5.5 Les différentes sous-classes de Msr

#### I.5.5.1 Les différentes sous-classes de MsrA

Au sein des MsrA, il existe différentes sous-classes qui diffèrent au niveau du nombre et de la localisation des Cys impliquées dans le mécanisme de régénération (Figure 11). En effet, si la Cys51 catalytique (en se basant sur la numérotation de la MsrA d'*E. coli*) est conservée dans toutes les MsrA, le nombre et la localisation des Cys impliquées dans la formation du pont disulfure intramoléculaire varient. Ainsi, quatre sous-classes peuvent être définies.

## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

La première sous-classe est représentée par la MsrA d'*E. coli* ; dans ce cas, deux Cys sont impliquées dans le processus de recyclage de l'enzyme : la Cys198 et la Cys206. Il y a alors formation de deux ponts disulfures successifs au niveau du mécanisme catalytique : le pont C51-C198 puis le pont C198-C206, ce dernier étant celui qui est réduit par la Trx (Boschi-Muller *et al.*, 2000).

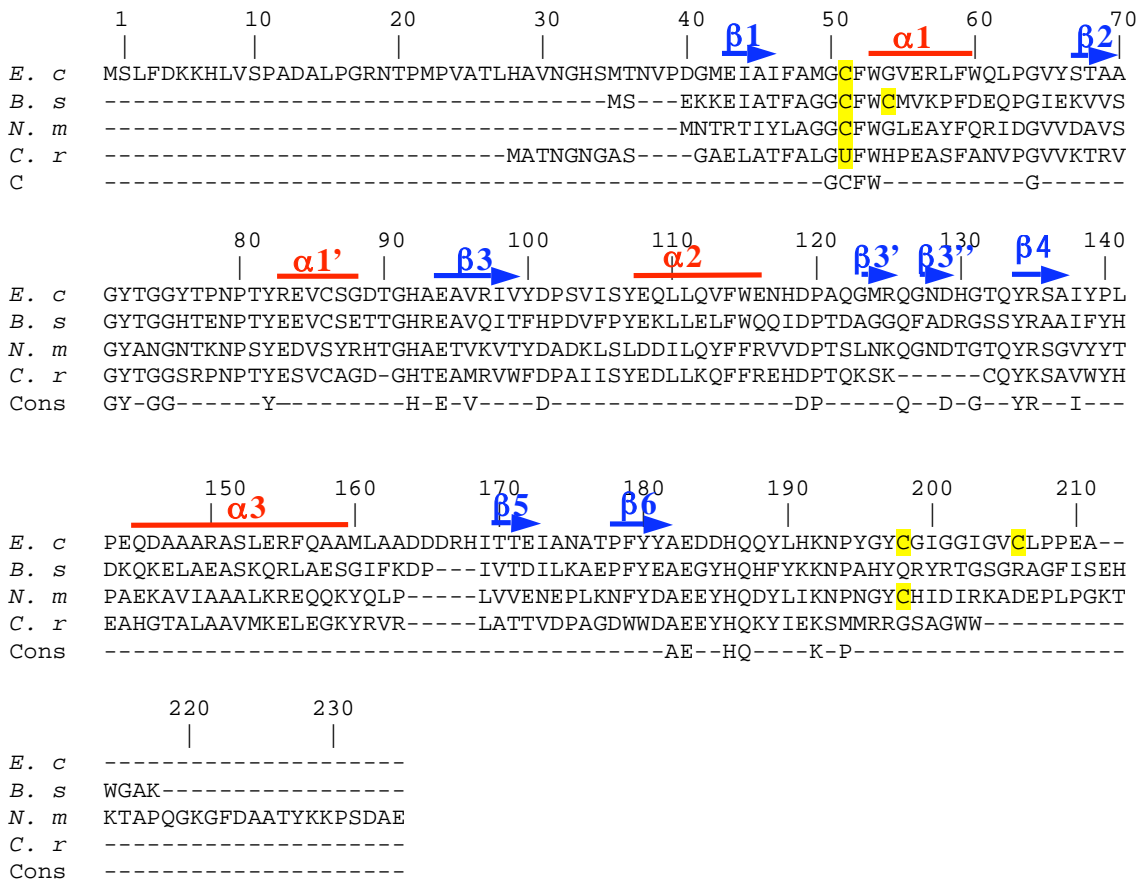
La deuxième sous-classe est représentée par l'enzyme de *N. meningitidis*, qui fait intervenir une seule Cys dans son mécanisme de régénération : la Cys198, dans ce cas il y a uniquement formation du pont disulfure C51-C198 (Olry *et al.*, 2002) qui est réduit par la Trx.

La troisième sous-classe est représentée par la MsrA de *B. subtilis* qui ne possède qu'une seule Cys de régénération en position 54. Dans ce cas, c'est le pont disulfure C51-C54 qui est formé (Boschi-Muller *et al.*, 2005) et réduit par la Trx.

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

Quelques cas de MsrA où la Cys51 catalytique est remplacée par une sélénocystéine ont également été rapportés (Kim *et al.*, 2006).

## Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases



**Figure 11:** Alignement des séquences des MsrA d'*E. coli* (*E. c*), de *B. subtilis* (*B. s*), de *N. meningitidis* (*N. m*) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. r*).

Chacune de ces enzymes est représentative d'une des quatre sous-classes de MsrA, qui diffèrent par la position des résidus Cys de recyclage impliqués dans le mécanisme de régénération (*E. coli* : C51/C198/C206 ; *B. subtilis* : C51/C54 ; *N. meningitidis* : C51/C198). La protéine de *C. reinhardtii* est un cas particulier de MsrA où la Cys essentielle est remplacée par un résidu sélénocystéine (U). 14 protéines présentant cette particularité ont été identifiées dans les banques de données. La numérotation utilisée est basée sur celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme d'*E. coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000) : les hélices  $\alpha$  sont indiquées par des traits rouges, les brins  $\beta$  par des flèches bleues. Les résidus Cys sont indiqués sur fond jaune. La séquence consensus (cons) présente les résidus conservés à plus de 90 % dans les séquences de MsrA putatives extraites des banques génomiques (génomés entièrement séquencés).

### I.5.5.2 Les différentes sous-classes de MsrB

Plusieurs sous-classes de MsrB peuvent être définies en se basant sur la différence de localisation existant au niveau de la Cys impliquée dans le mécanisme de régénération. Dans le cas des MsrB, la Cys catalytique est en position 117 et est conservée dans l'ensemble des MsrB. Quatre sous-classes de MsrB peuvent alors être définies (Figure 12).



## ***Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases***

La première sous-classe est représentée par la MsrB de *N. meningitidis* (60% des MsrB). Dans ce cas, la Cys de régénération se situe en position 63 et le pont disulfure formé est le pont C117-C63, réductible par la Trx (Olry *et al.*, 2002).

La seconde sous-classe est représentée par la MsrB de *Xanthomonas campestris* qui possède une Cys de régénération en position 31 (5% des MsrB). Il y a formation d'un pont disulfure C117-C31, réductible par la Trx (Neiers *et al.*, 2004).

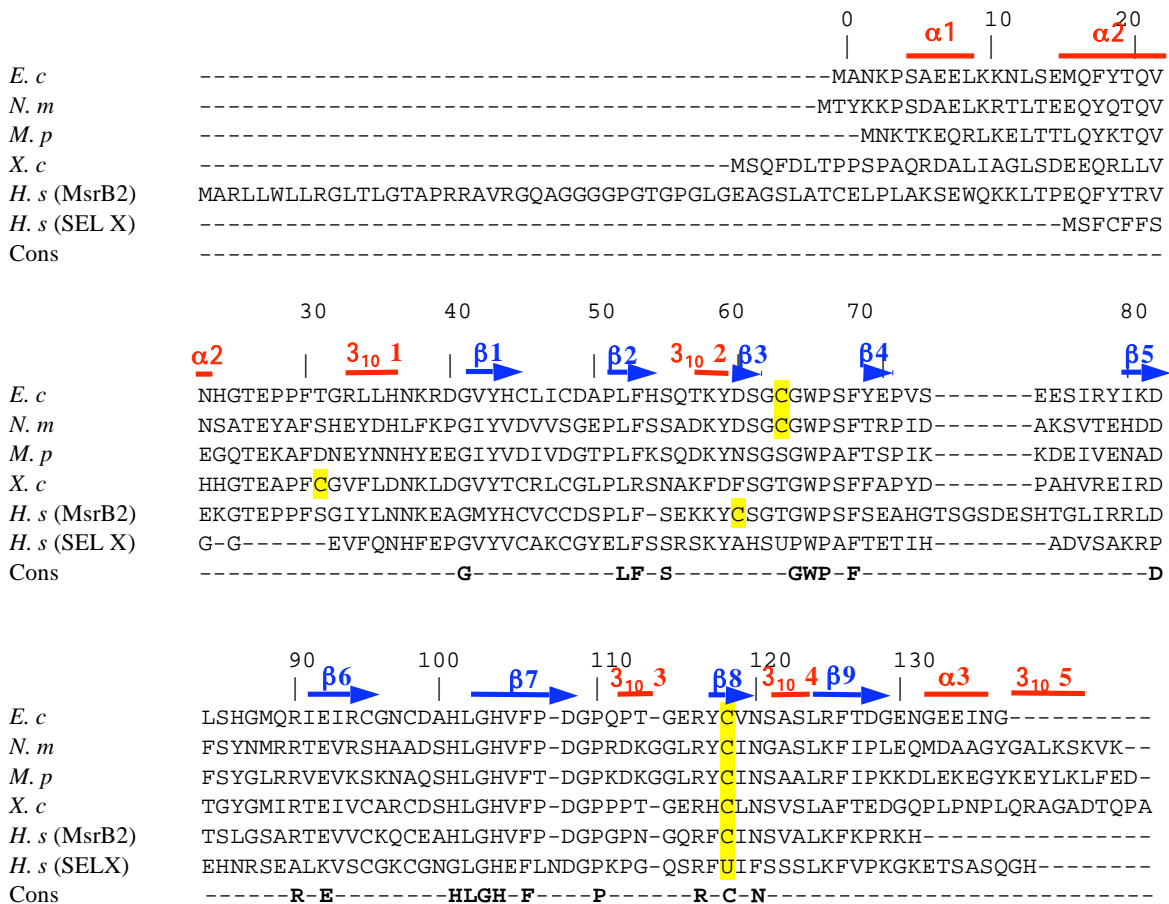
La troisième sous-classe est représentée par la MsrB de *Mycoplasma pulmonis*, qui ne possède que la Cys117 catalytique (31% des MsrB). Tout comme pour la MsrA de *R. capsulatus*, se pose alors la question de la nature du réducteur de l'intermédiaire acide sulfénique.

Enfin la quatrième sous-classe est représentée par l'enzyme humaine MsrB2 (aussi appelée hCBS1), qui possède une Cys de régénération en position 60 (1% des MsrB). Ceci suggère que le mécanisme de régénération de l'enzyme pourrait passer par la formation d'un pont disulfure C117-C60.

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

En plus de ces différentes sous-classes, il est à noter qu'environ 50% des MsrB, et notamment les MsrB d'*E. coli*, de *R. capsulatus* et de *X. campestris* possèdent deux motifs supplémentaires CXXC permettant la fixation d'un atome de  $Zn^{2+}$  (Olry *et al.*, 2005).

## Introduction : Les Méthionine Sulfoxyde Réductases



**Figure 12 :** Alignement des séquences des MsrB de d'*E. coli* (*E. c*), *N. meningitidis* (*N. m*), de *M. pulmonis* (*M. p*), de *X. campestris* (*X. c*), de la MsrB2 et de SelX d'*H. sapiens* (*H. s*).

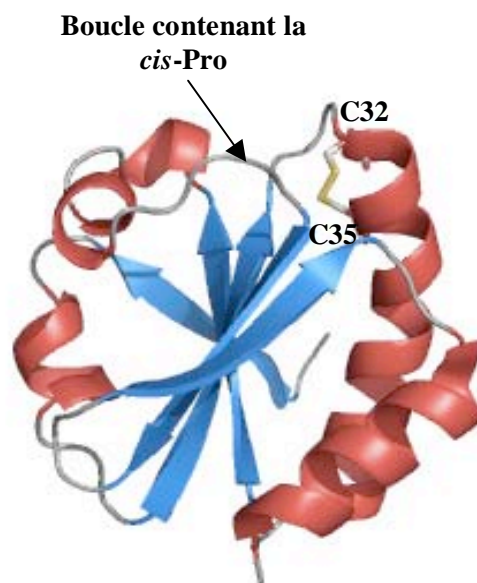
Les MsrB peuvent être divisées en quatre sous-classes selon le nombre et la position des Cys impliquées dans le mécanisme de recyclage : deux Cys (cas de *N. meningitidis* et *E. coli* avec la Cys de recyclage en position 63) ou une seule Cys (cas de *M. pulmonis*). La MsrB de *X. campestris* ne possède pas de Cys en position 63 mais possède une Cys en position 31. Elle forme une troisième sous-classe, la quatrième étant représentée par la MsrB2 (hCBS1) humaine ne possédant pas de Cys en position 63 mais une Cys en position 60. Parmi les MsrB, certaines possèdent quatre Cys supplémentaires, impliquées dans la fixation d'un métal (cas de *E. coli*, de *X. campestris*, d'*H. sapiens* MsrB2 et SelX). La numérotation utilisée est celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.*, 2002) : les hélices  $\alpha$  sont indiquées par des traits rouges, les brins  $\beta$  par des flèches bleues. Les résidus Cys impliqués dans la chélation d'un ion métallique sont indiqués sur fond bleu, les autres Cys sont indiqués sur fond jaune. La protéine humaine SelX est un cas particulier de MsrB où la Cys essentielle en position 117 est remplacée par un résidu sélénocystéine (U). La séquence consensus (cons) présente les résidus conservés à plus de 90% dans les séquences de MsrB putatives extraites des banques génomiques (génomomes entièrement séquencés).

### I.5.6 Stéréosélectivité et spécificité de substrat

Les MsrA et les MsrB présentent des stéréosélectivités différentes. En effet, la MsrA est spécifique de la réduction de l'isomère *S* de la MetSO alors que la MsrB réduit spécifiquement l'isomère *R* de la MetSO. Ceci a été montré par l'utilisation des deux stéréoisomères de la MetSO (Moskovitz *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002), et à l'aide de la calmoduline oxydée (Grimaud *et al.*, 2001). La géométrie des sites actifs de la MsrA et de la MsrB sont symétriques l'un par rapport à l'autre, ce qui permet d'expliquer au niveau structural cette stéréosélectivité de substrat (Lowther *et al.*, 2002). Des études enzymatiques réalisées à l'état stationnaire sur les MsrA et MsrB de *N. meningitidis*, en utilisant des analogues de la MetSO, ont permis de suggérer que 1) les Msr présentent une meilleure affinité pour les substrats sulfoxydes inclus dans une chaîne polypeptidique. Ainsi la protection des groupements NH<sub>2</sub> et COOH sous forme amide permet d'augmenter l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat, 2) la présence de la fonction sulfoxyde est essentielle pour la fixation de la MetSO, 3) la stéréochimie du C $\alpha$  n'a aucune influence sur la reconnaissance du substrat, 4) la présence d'au moins deux CH<sub>2</sub> entre le C $\alpha$  et l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde est nécessaire, 5) la poche hydrophobe permettant la reconnaissance du groupement méthyle du substrat n'est pas adaptée pour fixer efficacement des substrats avec des groupements plus encombrants tels que le groupement éthyle (Olry *et al.*, 2002).

## Partie II : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

Le maintien de l'équilibre redox au sein des cellules est primordial puisqu'il va permettre de réguler de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme, la signalisation ou encore la transcription. Cette régulation redox passe entre autre par des processus d'oxydation/réduction de résidus Cys. Dans ce cadre, les protéines disulfure oxydoréductases de la famille des Trx jouent un rôle essentiel. Ces protéines partagent le même type de repliement, retrouvé chez les Trx (cinq brins  $\beta$ , qui forment un cœur hydrophobe, entourés d'hélices  $\alpha$ ), mais ne présentent qu'un faible taux d'identité de séquence (Figure 13).



**Figure 13 :** Structure tridimensionnelle de la Trx1 d'*E. coli*

Les structures secondaires en hélice  $\alpha$  sont représentées en rouge, les brins  $\beta$  en bleu. Les Cys catalytiques Cys32 et Cys35 formant un pont disulfure intramoléculaire sont représentées sur la structure. Cette figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 2FCH.

Ces protéines possèdent également une séquence signature commune, CXXC, au sein de leur site actif, la Cys N-terminale de cette signature étant la Cys catalytique. Cette région fortement conservée est toujours localisée au début d'une hélice  $\alpha$ . La nature des acides aminés présents entre les deux Cys varie en fonction des enzymes et a comme conséquence une influence sur leur potentiel redox. Une autre particularité de ces protéines est la présence d'une boucle conservée contenant un résidu *cis*-Pro en position 76.

Il existe une très grande variabilité du potentiel redox chez les « Trx-like » allant de -270 mV pour la Trx1 d'*E. coli* à -124 mV pour la DsbA (Aslund *et al.*, 1997). Ces protéines « Trx-like » vont donc avoir des rôles différents : soit un rôle de réducteur permettant la réduction de ponts disulfures (Trx et Glutarédoxines (Grx)), soit un rôle d'oxydant permettant

## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

la formation de ponts disulfures (DsbA et PDI), soit un rôle à la fois de réducteur et d'oxydant dans le cas de l'isomérisation des ponts disulfures non natifs (PDI et DsbC). Dans tous les cas, le mécanisme catalytique des protéines contenant un centre redox de type Trx est basé sur l'échange de ponts disulfures. Les Cys du site catalytique vont jouer le rôle soit d'accepteur d'électrons lorsqu'elles sont sous forme oxydée, soit de donneur d'électrons lorsqu'elles sont sous forme réduite. Des études par mutagenèse dirigée ont montré qu'en faisant varier la nature des résidus présents entre les deux Cys du site actif, il est possible de rendre les variants de ces protéines plus oxydants ou plus réducteurs. Par exemple, un variant Trx<sub>PDI</sub> dans lequel les résidus du site actif de la Trx ont été remplacés par ceux de la PDI présente un potentiel redox augmenté de 35 mV (Krause *et al.*, 1991).

### **II.1 Les disulfure oxydoréductases cytoplasmiques**

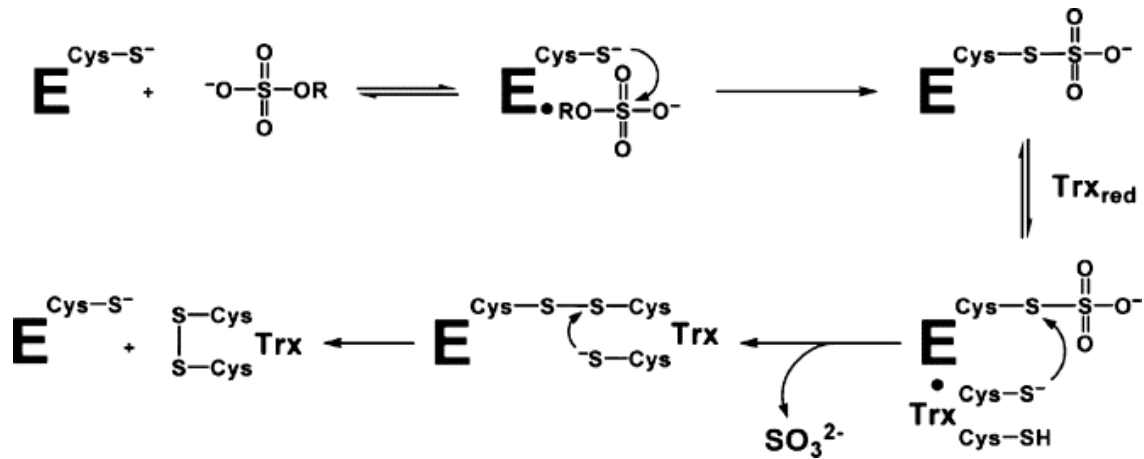
#### II.1.1 Les Trx

Les Trx sont des protéines présentes chez tous les êtres vivants. Elles présentent un potentiel redox à pH 7,0 de -0,270 V (Laurent *et al.*, 1964) et vont donc avoir un rôle de réducteur au niveau du cytoplasme. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques explicités de façon non exhaustive dans le paragraphe suivant.

##### II.1.1.1 Rôle des Trx

La première fonction décrite pour la Trx1 d'*E. coli* est sa fonction de donneur d'électrons à la ribonucléotide réductase (RNR), enzyme essentielle à la synthèse de l'ADN, qui catalyse la réduction des quatre ribonucléotides en leur désoxyribonucléotide correspondant (Laurent *et al.*, 1964). La Trx1 permet également la réduction de sulfonucléotide réductases (APS réductase et PAPS réductase), enzymes qui catalysent la réduction d'adénylate sulfate en sulfite. Ainsi, l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) est réduite par l'APS réductase et la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) est réduite par la PAPS réductase. Le mécanisme catalytique proposé pour ces deux Sulfonucléotide réductases fait intervenir la Trx (Carroll *et al.*, 2005) (Figure 14).

**Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**



**Figure 14 :** Mécanisme de réduction de l'APS ou de la PAPS par une Sulfonucléotide réductase, APS réductase ou PAPS réductase (d'après Chartron *et al.*, 2007).

La Trx1 humaine joue le rôle de facteur de croissance pour de nombreuses cellules, notamment les lymphocytes (Wakasugi *et al.*, 1990) et les fibroblastes (Oblong *et al.*, 1994).

La Trx1 est également impliquée directement dans la résistance au stress oxydant en tant que peroxydase en réduisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nakamura *et al.*, 1994).

Elle est également donneur d'électrons pour de nombreuses cibles : les Msr (Gonzalez Porque *et al.*, 1970), la glutathion peroxydase (Bjornstedt *et al.*, 1994), les peroxyrédoxines à 1 Cys (Pedrajas *et al.*, 2000), les peroxyrédoxines à 2-Cys typiques (Netto *et al.*, 1996) et atypiques (Seo *et al.*, 2000).

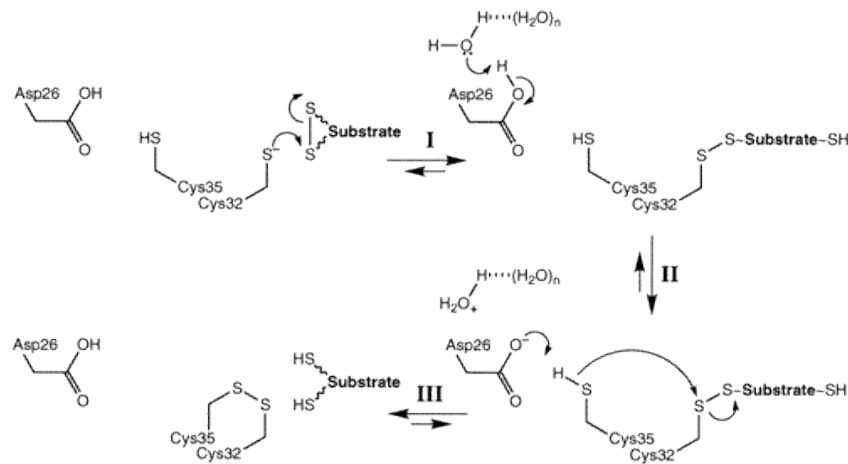
La Trx1 joue aussi un rôle dans la transduction du signal intracellulaire, en régulant l'activité de protéines qui se fixent sur l'ADN, comme par exemple les protéines Jun/Fos et le facteur nucléaires NFκB. La Trx est un facteur important dans la régulation de l'activité de fixation à l'ADN de p53, soit de façon directe soit *via* la protéine Ref-1 (Ueno *et al.*, 1999).

### II.1.1.2 Mécanisme catalytique

Les Trx vont catalyser la réduction de pont disulfures au sein de protéines oxydées. Les Trx sont des enzymes possédant deux Cys catalytiques, la Cys32 et la Cys35, au sein d'une signature WCGPC. La chaîne latérale de la Cys32 est accessible au solvant et possède un pKa de 7,5 (Chivers *et al.*, 1997b). Ceci lui permet de se retrouver à pH 7,0 en partie sous forme thiolate et de pouvoir jouer le rôle de nucléophile. Au contraire, la Cys35 présente une valeur de pKa de l'ordre de 9, ce qui la rend très peu réactive. Le caractère nucléophile de la Cys35 pourrait être augmenté par une catalyse basique. Le mécanisme proposé pour la réduction de protéines oxydées sous forme pont disulfure par la Trx peut se décomposer en

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

trois étapes. La première étape consiste en l'attaque nucléophile de la Cys32 sous forme thiolate au niveau des Cys de la protéine cible impliquée dans le pont disulfure intramoléculaire. Il y a alors formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la Trx et sa cible. Au sein de cet intermédiaire intermoléculaire, le pKa de l'Asp26 est abaissé (de 9,2 à 7,6), ce qui lui permet d'être en partie sous forme déprotonée à pH 7,0. Ainsi, dans la seconde étape, l'Asp26 va pouvoir accepter le proton de la Cys35. La Cys35 ainsi déprotonée va pouvoir, dans une ultime étape attaquer la Cys32, ce qui entraîne la libération de la protéine cible sous forme réduite et de la Trx sous forme oxydée avec un pont disulfure C32-C35 (Figure 15). La Trx, pour être de nouveau active, devra être réduite à son tour.



**Figure 15 :** Mécanisme de réduction d'une cible oxydée sous forme pont disulfure par la Trx. (d'après Chivers et Raines, 1997)

### II.1.1.3 Spécificité de substrat

Les Trx sont des protéines ubiquitaires capables de réduire de nombreuses cibles protéiques possédant des fonctions très diverses. L'examen des séquences de ces différentes cibles ne semble pas indiquer l'existence d'une séquence signature permettant une reconnaissance spécifique par la Trx. Quels sont donc alors les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre la Trx et ses cibles ?

Les premières structures décrites entre la Trx et ses cibles sont deux structures de complexes covalents par pont disulfure entre la Trx1 humaine, très similaire à la Trx1 d'*E. coli*, et des peptides correspondant à des fragments de protéines cibles (NFκB et Ref-1) (Qin *et al.*, 1995 ; Qin *et al.*, 1996) et la structure d'un complexe covalent par pont disulfure entre la Trx réductase et la Trx1 d'*E. coli* (Lennon *et al.*, 2000). Ces trois structures montrent une

## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

reconnaissance localisée entre la Trx et ses cibles *via* l'implication d'interactions hydrophobes.

Récemment, la structure tridimensionnelle de la Trx1 d'*E. coli* liée covalamment par un pont disulfure intermoléculaire entre sa Cys catalytique et une des Cys de la PAPS réductase a été résolue (Chartron *et al.*, 2007). Dans cette structure, la Trx interagit avec les 10 derniers résidus de la PAPS réductase. La reconnaissance de ce segment consiste essentiellement en des contacts hydrophobes, des liaisons H entre chaînes principales et un réseau de ponts salins. Une conséquence de ces nombreux contacts est que la Cys32 de la Trx1 est positionnée de façon optimale pour réaliser une attaque nucléophile sur la PAPS réductase. La Cys35 serait alors également bien positionnée pour attaquer le pont disulfure intermoléculaire. De plus, la modélisation de l'intermédiaire sulfocystéine de la PAPS réductase dans la structure du complexe suggère l'existence d'une poche putative de liaison du sulfite au niveau de l'interface protéine-protéine constituée de nombreux résidus fortement conservés et notamment le Trp31, la Gly33, et la Pro34 de la Trx. Ce site pourrait permettre de positionner correctement la Cys32 de la Trx pour l'attaque nucléophile de l'intermédiaire sulfocystéine de la PAPS réductase.

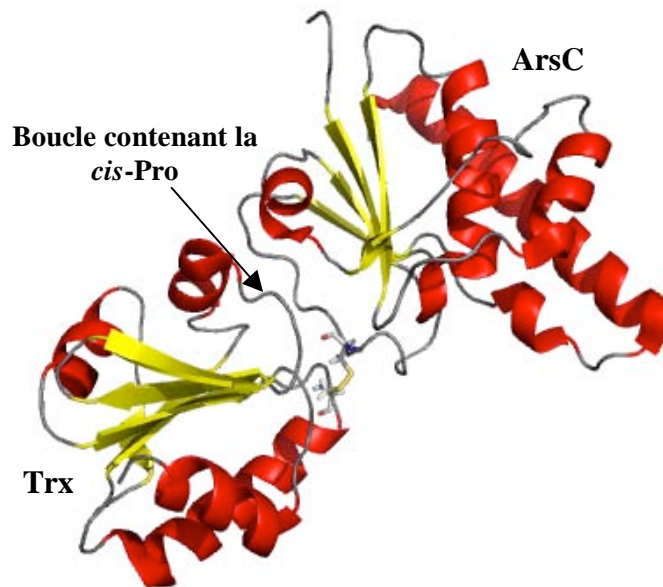
Très récemment, la première structure d'un complexe covalent entre la Trx et une de ses cibles protéiques a été obtenue par RMN. Il s'agit d'un complexe entre la Trx et l'arsenate réductase (ArsC) (Li *et al.*, 2007). ArsC est une enzyme impliquée dans la détoxification de l'arsenate. Elle catalyse la réduction de l'arsenate ( $As^V$ ) en arsenite ( $As^{III}$ ). Son mécanisme catalytique fait appel à trois résidus Cys : la Cys10 est responsable de la première attaque nucléophile sur l'arsenate et conduit à la formation d'un intermédiaire covalent ArsC- $As^V$  ; l'attaque de la Cys82 conduit dans un deuxième temps à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire C10-C82 et au relargage de l'arsenite ; et finalement l'attaque de la troisième Cys, la Cys89, conduit à la libération de la Cys10 et à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire C82-C89 exposé en surface. Ce pont disulfure sera ensuite réduit par la Trx (pour revue, voir Messens et Silver, 2006). Le complexe qui a été étudié par RMN entre ArsC et la Trx de *B. subtilis* est un complexe artificiel intermoléculaire entre les Cys32 (équivalent *E. coli*) de la Trx et Cys89 d'ArsC, à partir de variants protéiques ne possédant plus les autres Cys (voir Figure 16).

Globalement, les structures de la Trx réduite, oxydée et en complexe ne présentent pas de différences majeures. Des ajustements structuraux locaux sont observés au niveau d'un résidu Val en position C-terminale du cinquième brin  $\beta$ , et au niveau d'une hélice  $\alpha$ . Au niveau d'ArsC, la boucle qui contient les Cys82 et Cys89 adopte une conformation



## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

intermédiaire de celle des formes réduites et oxydées. En effet, cette boucle adopte une structuration en hélice  $\alpha$  dans la forme réduite, alors que dans la forme complexée cette hélice n'est pas complètement formée. Les interactions impliquées au sein de ce complexe sont essentiellement des interactions de type hydrophobe.



**Figure 16 :** Représentation schématique de la structure du complexe entre la Trx de *B. subtilis* et ArsC de *B. subtilis*.

Les résidus Cys32 de la Trx (nomenclature d'*E. coli*) et Cys89 d'ArsC sont représentés. Les hélices  $\alpha$  et brin  $\beta$  sont représentés respectivement en rouge et jaune. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 2ipa.

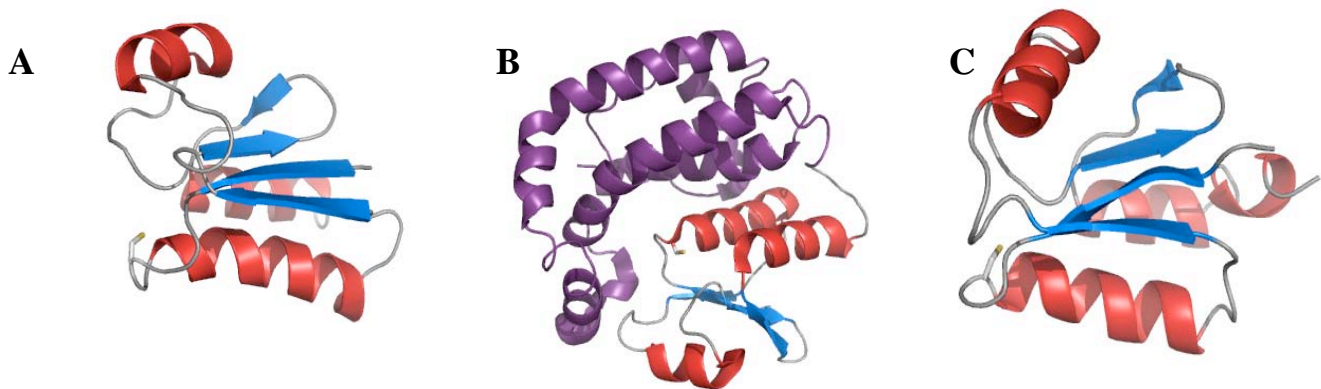
Il est à noter que toutes les protéines Trx-like possèdent un résidu *cis*-Proline qui semble être important pour la reconnaissance entre la Trx et ses cibles puisqu'il permettrait de positionner correctement la chaîne latérale du résidu Ala adjacent impliqué dans les interactions hydrophobes avec ses partenaires.

### II.1.2 Les Glutarédoxines

Le système Grx, tout comme le système Trx, joue un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre redox de la cellule en permettant la réduction des protéines oxydées sous forme pont disulfure (pour revue, Ritz et Beckwith, 2001). La première Grx isolée à partir du foie de cochon a été découverte par E. Racker en 1955 et nommée thioltransférase (Racker, 1955). Plus tard, en 1976, le système Grx a été identifié comme donneur d'électrons pour la ribonucléotide réductase dans une souche d'*E. coli* mutante n'exprimant plus la Trx1 (Holmgren, 1976). Dans ce système Grx, les électrons sont transférés du NADPH à la

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

glutathion réductase, puis au GSSG et finalement à l'une des trois Grx nommées Grx 1, Grx 2 et Grx 3 (Figure 17). En terme de structure tridimensionnelle et de mécanisme catalytique, trois classes de Grx ont pu être définies. La première classe est représentée par les Grx 1 et 3 d'*E. coli*, de poids moléculaire 10 kDa avec un motif CXXC (en général CPYC) au sein de leur site actif, et adoptant un repliement Trx contenant quatre brins  $\beta$  antiparallèles entourés de trois hélices  $\alpha$ . Ces enzymes possèdent 33% d'identité entre elles et sont capables de réduire la ribonucléotide réductase, tout comme la Trx. La seconde classe de Grx, représentée par la Grx 2 d'*E. coli*, est reliée d'un point de vue structural aux glutathion S-transférases (GST) possédant une activité glutarédoxine oxydoréductase. La Grx 2 d'*E. coli* possède un motif CPYC au sein de son site actif et est composée de deux domaines : un domaine N-terminal avec un repliement de type Grx 1 et un domaine C-terminal composé exclusivement d'hélices  $\alpha$ . La troisième catégorie correspond aux Grx possédant un site actif monothiol (CGFS). Ces Grx ont été identifiées chez la levure (yGrx3, yGrx4 et yGrx5) et chez l'homme.



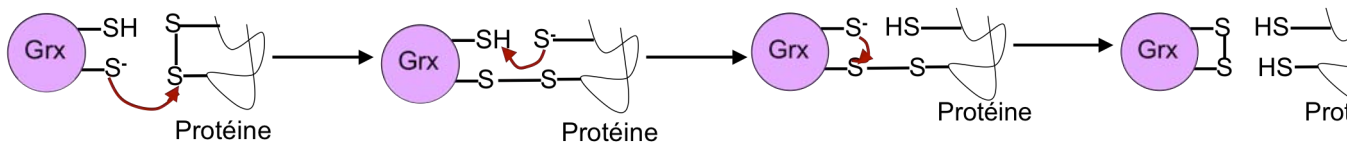
**Figure 17 :** Représentation des structures tridimensionnelles des A) Grx1, B) Grx2, C) Grx3 d'*E. coli*.

Les structures secondaires en hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge, les brins  $\beta$  en bleu. Pour chaque structure, la Cys N-terminale du motif CXXC est représentée. Le domaine C-terminal de la Grx 2 est représenté en violet. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir des fichiers PDB 1ego, 1g7o et 3Grx.

Les trois Grx d'*E. coli* catalysent la réduction des ponts disulfures de différentes cibles. Dans un premier temps, la Cys N-terminale exposée au solvant du motif CPYC réalise une attaque nucléophile sur une des Cys du pont disulfure de la cible, entraînant la formation d'un intermédiaire pont disulfure intramoléculaire entre la Grx et sa cible. Ensuite, la seconde Cys du site actif sous forme thiolate attaque la Cys N-terminale de la Grx permettant ainsi le relargage de la cible sous forme réduite et de la Grx sous forme oxydée. Dans ce mécanisme, la deuxième Cys de la Grx serait activée au cours de la formation du complexe intermoléculaire, contrairement aux Trx où l'activation se ferait grâce à un résidu Asp. La Grx

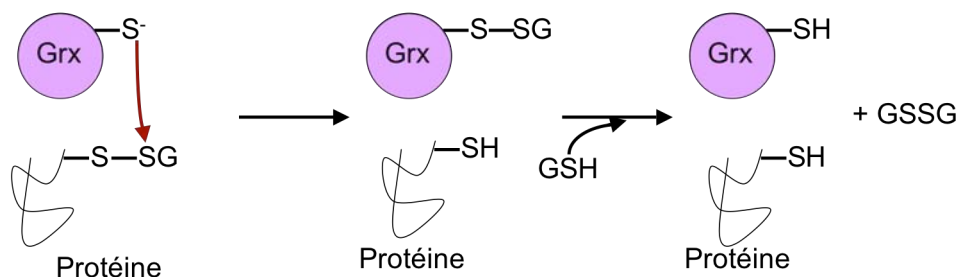
## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

sera ensuite réduite *via* l'attaque d'une molécule de GSH sur la Cys N-terminale du motif CPYC. L'intermédiaire dithiol avec le GSH va être régénéré par l'attaque d'une deuxième molécule de GSH, ce qui va permettre le relargage de GSSG et de la Grx sous forme réduite (Figure 18).



**Figure 18 :** Mécanisme dithiol de réduction des ponts disulfures entre les Grx et leurs cibles.

Les Grx peuvent également catalyser la réduction des protéines glutathionylées, formant un pont disulfure mixte avec un GSH (Figure 19). Dans ce mécanisme, les Grx utilisent uniquement la Cys N-terminale du motif CPYC. Dans une première étape, l'attaque nucléophile de la Cys N-terminale de la Grx sur la Cys de la partie GSH de la protéine glutathionylée permet la formation d'un intermédiaire GrxSSG, la protéine cible se retrouvant sous forme réduite. Dans une deuxième étape, l'attaque d'une seconde molécule de GSH permet le retour de la Grx sous forme réduite et le relargage de GSSG.



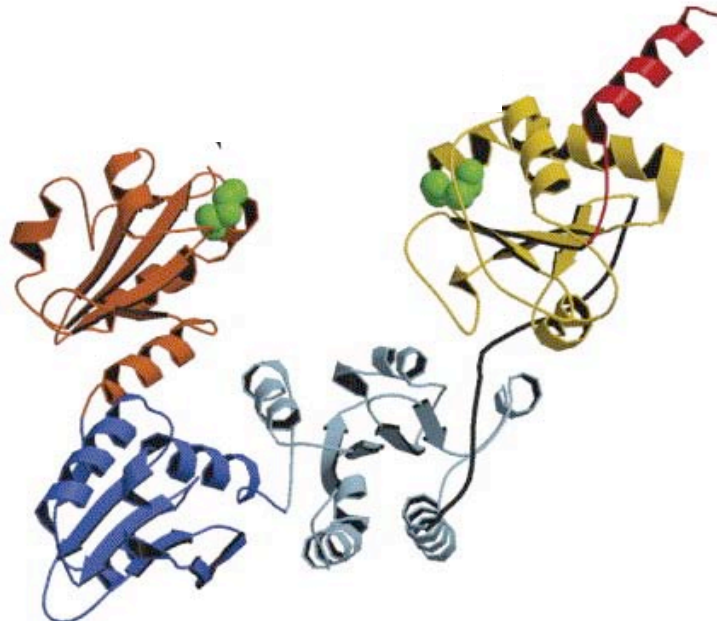
**Figure 19 :** Mécanisme monothiol de réduction de cibles S-glutathionylées par les Grx.

### II.1.3 Les protéines disulfure isomérase (PDI)

Les PDI sont des enzymes impliquées dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées en jouant d'une part le rôle de chaperone et d'autre part en catalysant la formation ainsi que le réarrangement des ponts disulfures intramoléculeux au niveau du lumen et du réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes. Plus d'une douzaine de protéines appartenant à la famille des PDI ont pu être identifiées chez l'homme. Les PDI contiennent

## **Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**

quatre domaines présentant un repliement de type Trx (a, b, b' et a'), un « linker » (x) et un domaine C-terminal (c) organisés selon un motif abb'xa'c. Seulement deux des quatre domaines « Trx-like » (a et a') contiennent le motif catalytique caractéristique des Trx CXXC (Figure 20). Les protéines « PDI-like » diffèrent entre elles par le nombre de domaines « Trx-like » ainsi que par l'arrangement relatif des domaines les uns par rapport aux autres.



**Figure 20 : Structure tridimensionnelle d'une PDI (d'après Gruber *et al.*, 2006).**

Les domaines a (en orange) et a' (jaune) sont homologues aux Trx et contiennent le motif catalytique CXXC (en vert). Les domaines b (bleu foncé) et b' (bleu clair) possèdent également un repliement de type Trx. Le "linker" flexible (noir) est situé entre les domaines b et a'. L'extension C-terminale (rouge) possède un signal de rétention au réticulum endoplasmique (K/H)DEL.

## **II.2 Les disulfure oxydoréductases périplasmiques**

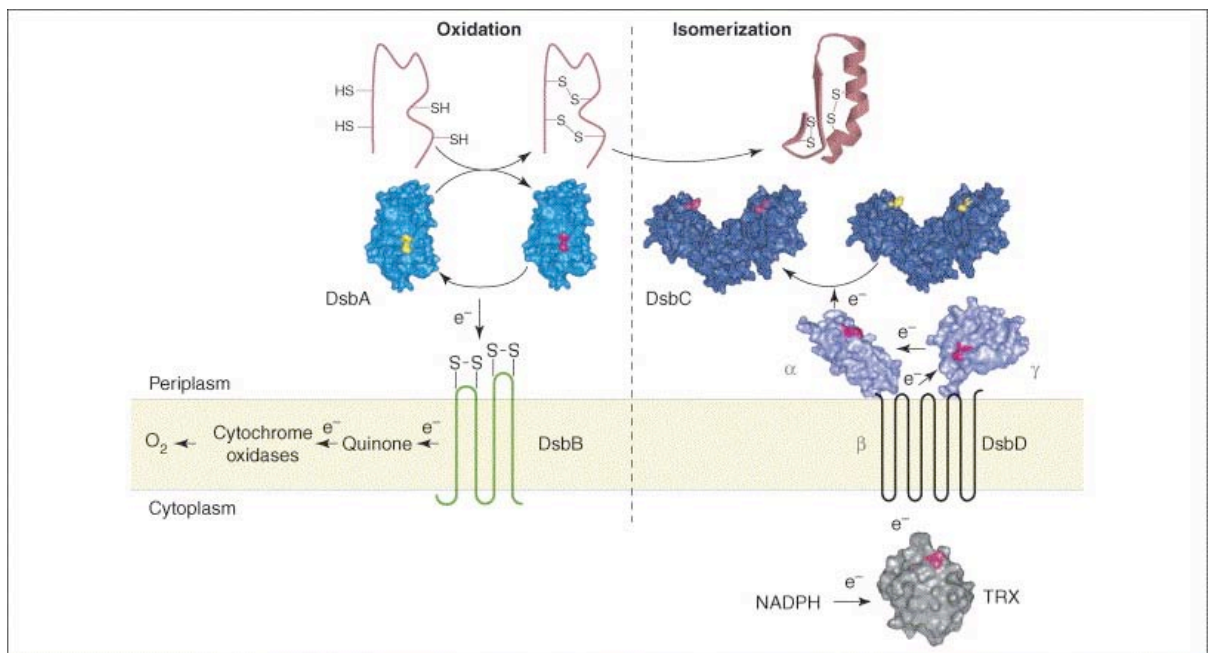
### **II.2.1 Les Dsb (DsbA/DsbC/DsbG/cDsbD/DsbE)**

Les Dsb (Disulfide bond protein) appartiennent à la famille des oxydoréductases. Elles catalysent la formation des ponts disulfures au niveau du périplasma des bactéries par deux mécanismes distincts : l'oxydation des Cys des protéines nouvellement sécrétées et l'isomérisation des ponts disulfures non-natifs de ces mêmes protéines (pour revue, voir Messens et Collet, 2006) (Figure 21).

La DsbA est une protéine monomérique dont la forme oxydée sous forme pont disulfure catalyse la formation de ponts disulfures au niveau des protéines nouvellement sécrétées dans le périplasma. La DsbA se retrouve alors sous forme réduite et sera réoxydée par la protéine transmembranaire DsbB, qui va transférer ses électrons aux quinones sous

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

forme oxydées. La DsbB constitue la seule protéine appartenant au système Dsb ne possédant pas un repliement de type Trx. La cytochrome oxydase terminale réoxyde à son tour les quinones sous forme réduites et transfère ses électrons à l'oxygène moléculaire. Dans les protéines contenant plus d'une paire de Cys, la DsbA peut introduire des ponts disulfures non natifs bloquant les protéines dans des conformations non natives. Les DsbC et DsbG catalysent l'isomérisation des ponts disulfures non présents dans la structure native des protéines, ces deux enzymes étant conservées sous forme réduite grâce à la protéine DsbD. Cette protéine transmembranaire à trois domaines permet le transfert des électrons de la Trx cytoplasmique vers le périplasma.



**Figure 21** : Schéma du système bactérien Dsb impliqué dans le repliement des protéines par formation de ponts disulfures (d'après Gruber *et al.*, 2006)

La DsbA est représentée en bleu et son site actif apparaît en jaune dans la forme oxydée de la protéine et en violet dans la forme réduite ; la DsbB est représentée en vert. La protéine DsbC est représentée en bleu foncé et son site actif apparaît respectivement dans sa forme oxydée et réduite en jaune et en rose. La DsbC est régénérée par la protéine transmembranaire DsbD à trois domaines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (représentée en violet avec les sites actifs de ses 2 domaines  $\alpha$  et  $\gamma$  en rose). Cette protéine permet le transfert des électrons du cytoplasme provenant du NADPH *via* la Trx (représentée en gris avec son site actif en rose) vers le périplasma.

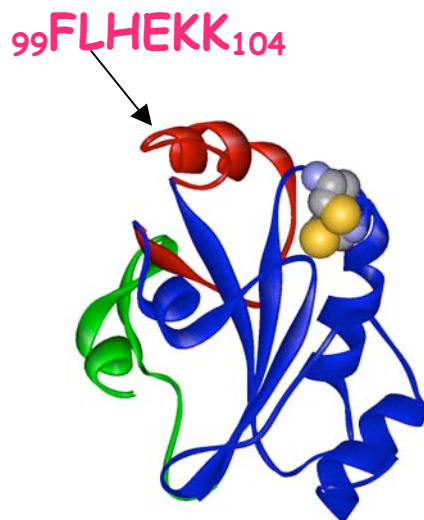
Ce système Dsb contient une protéine supplémentaire appelée DsbE qui n'est pas impliquée dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées mais dans la voie de maturation des cytochromes *c*. Cette enzyme, également réduite par la protéine DsbD fait l'objet du paragraphe II.3.2.3.2 page 57.

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

### II.2.2 Le domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*

La protéine périplasmique PilB de *N. meningitidis* est constituée de trois domaines fonctionnels : le domaine central et le domaine C-terminal qui portent respectivement des activités MsrA et MsrB (Olry *et al.*, 2002), ainsi qu'un domaine N-terminal (domaine N-ter) qui possède une séquence d'ancrage à la membrane. Cette protéine est décrite jouer un rôle dans la pathogénicité et la résistance au peroxyde d'hydrogène (Skaar *et al.*, 2002).

Le domaine N-ter de la protéine PilB possède un centre redox WCPLC correspondant à un centre disulfure redox de type Trx avec un potentiel redox de -0,230 V. Il a été montré que ce domaine N-ter est capable de recycler l'activité réductase des domaines Msr isolés de PilB (Wu *et al.*, 2005), avec cependant une meilleure efficacité pour le domaine MsrB. La structure du domaine N-ter a été résolue par diffraction des rayons X et a montré un repliement de type Trx et plus particulièrement de type DsbE avec une boucle additionnelle FLHE (voir paragraphe II.3.2.2 page 51) (Ranaivoson *et al.*, 2006) (Figure 22).



**Figure 22 :** Structure tridimensionnelle du domaine N-ter de la protéine PilB de *N. meningitidis*. Le repliement de type Trx est représenté en bleu ; les extensions représentées en rouge et en vert sont spécifiques du repliement DsbE. La boucle FLHE supplémentaire du domaine N-ter est indiquée par une flèche. La figure a été réalisée à l'aide du logiciel PyMol à partir du fichier PDB 2FY6.

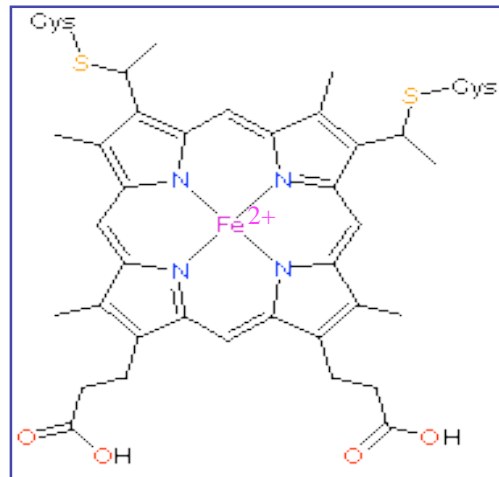
Des études récentes *in vitro* ont montré que le domaine N-ter de la protéine PilB de *N. gonorrhoeae* était réduit par le domaine N-terminal de la protéine DsbD d'*E. coli* (Brot *et al.*, 2006).

## II.3 Les DsbE

### II.3.1 Les cytochromes *c* bactériens et leurs systèmes de maturation

#### II.3.1.1 Les cytochromes *c* bactériens

Les cytochromes *c* sont des protéines de 8 à 14 kDa impliquées dans le transfert d'électrons et localisées du côté périplasmique de la membrane. Dans ces cytochromes, le cofacteur hémique est lié covalentement *via* deux liaisons thioéthers entre les deux groupements vinyles de l'hème et les deux Cys de l'apocytochrome *c* au niveau d'un motif de liaison CXXCH (Figure 23). L'His, présente au niveau de ce motif, sert de ligand axial au  $Fe^{2+}$  de l'hème.



**Figure 23 : Représentation schématique d'un hème de type *c*.**

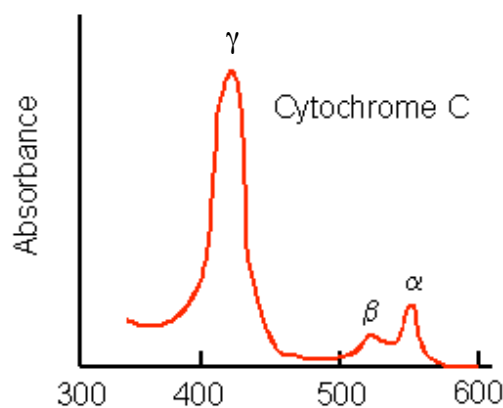
L'hème est relié aux deux Cys de l'apocytochrome *c* *via* deux liaisons thioéthers impliquant les groupements vinyliques de l'hème. L'atome de  $Fe^{2+}$  est coordonné par quatre noyaux pyrroles et par une His de l'apocytochrome *c* appartenant à la signature CXXCH (non montré sur le schéma).

Chez les bactéries, la fixation covalente de l'hème à l'apocytochrome a normalement lieu dans le périplasme. Jusqu'ici, trois systèmes de maturation des cytochromes *c* ont été mis en évidence, deux retrouvés chez les bactéries et un spécifique des organismes eucaryotes. Ces trois systèmes sont décrits dans le paragraphe II.3.1.4 page 47. Dans le cas particulier du cytochrome *c*552 d'*Hydrogenobacter thermophilus* produit dans le cytoplasme d'*E. coli*, l'hème peut être fixé covalentement à l'apocytochrome dans le cytoplasme (Daltrop *et al.*, 2002). D'un point de vue chimique, la formation de liaisons thioéther ne se fait pas facilement, le mécanisme restant à déterminer. Des études *in vitro* ont permis de montrer que

## **Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**

la fixation de l'hème de façon covalente à l'apocytochrome *c* était possible en présence de réducteur (DTT), ce qui implique que le pont disulfure de l'apocytochrome *c* doit être réduit pour l'obtention de cytochromes *c* matures. De nombreuses études ont également montré que l'hème est essentiel à la structuration des cytochromes *c*. En effet, des études de dichroïsme circulaire ont montré qu'en absence de l'hème, le cytochrome *c* est complètement déstructuré comparé à la forme ayant fixé l'hème (Fischer *et al.*, 1972).

Les cytochromes *c* ne possèdent pas de repliement caractéristique. En effet, il existe une très grande variabilité au niveau des structures tridimensionnelles de ces protéines et elles peuvent également adopter plusieurs niveaux d'oligomérisation. Les cytochromes *c* sont caractérisés par un spectre d'absorption particulier avec trois pics d'absorbance dans le visible : les bandes  $\gamma$  (415 nm) (ou de Soret),  $\beta$  (520 nm) et  $\alpha$  (550 nm) (Figure 24). Lorsque les cytochromes *c* sont sous forme apo, ces trois bandes disparaissent.



**Figure 24 :** Spectre d'absorption d'un cytochrome *c* dans la région visible

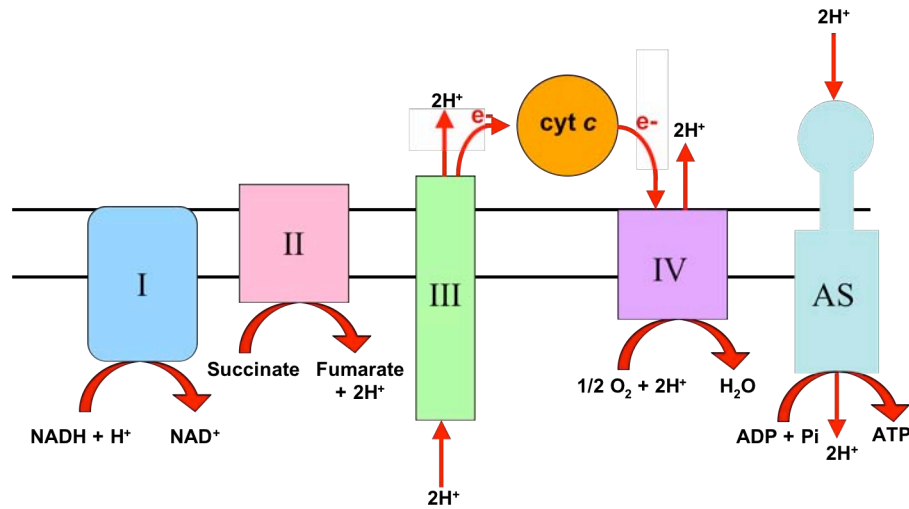
### II.3.1.2 Rôle des cytochromes *c*

Les cytochromes *c* sont impliqués principalement dans le transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire. Chez les bactéries, cette chaîne respiratoire est localisée dans la membrane plasmique et elle est composée de quatre complexes protéiques : le complexe I ou NADH déshydrogénase I, le complexe II ou succinate déshydrogénase, le complexe III ou complexe *bc1* et enfin le complexe IV ou oxydases terminales (Figure 25). Les cytochromes *c* permettent le transfert des électrons entre le complexe III et le complexe IV. Ces différents complexes permettent le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire *via* une succession de réactions d'oxydoréduction jusqu'à un accepteur final exogène. Dans le cas de la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est l' $O_2$ . Ces multiples réactions



**Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**

d'oxydoréduction permettent la création d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane ce qui permet à l'ATP synthase de produire de l'ATP.

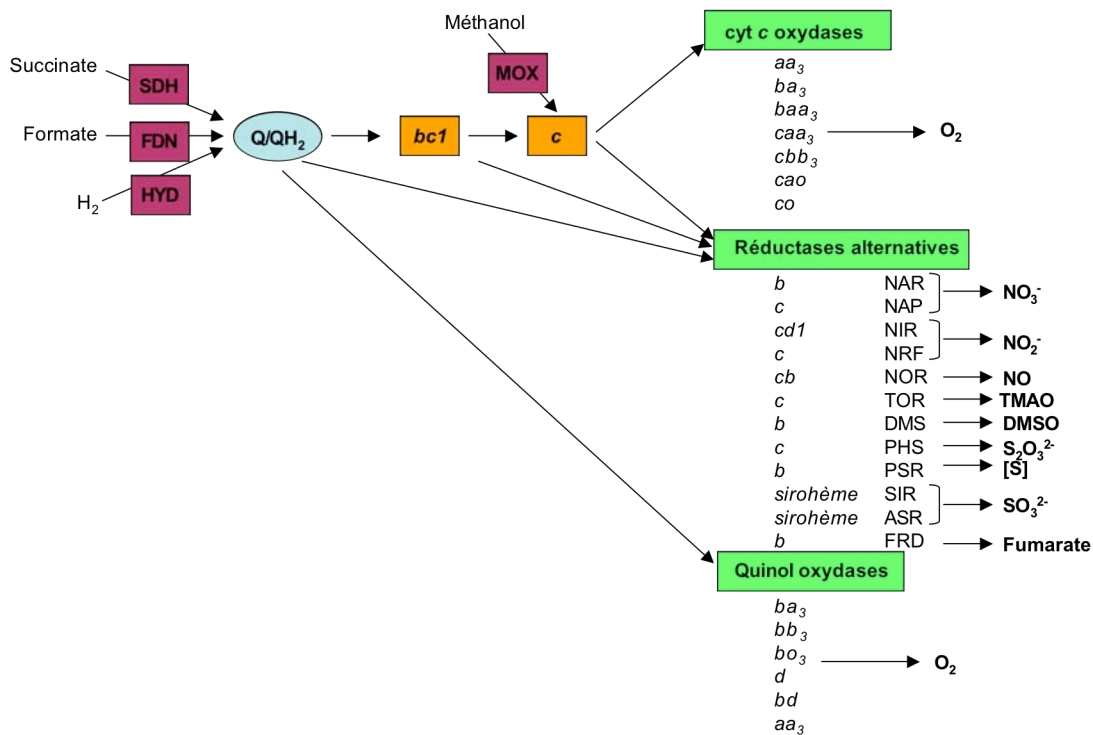


**Figure 25 :** Représentation schématique de la chaîne respiratoire des bactéries en conditions aérobies.

I : Complexe I ou NADH déshydrogénase I ; II : Complexe II ou succinate déshydrogénase ; III : Complexe III ou complexe *bcl* ; *cyt c* : cytochromes *c* ; IV : complexe IV ou oxydases terminales ; AS : ATP synthase.

La particularité des chaînes respiratoires bactériennes par rapport aux chaînes respiratoires mitochondriales est leur faculté d'adaptation. Ainsi, elles sont capables d'accepter différents substrats et non pas exclusivement du succinate pour réduire les quinones, et d'accepter différents accepteurs finaux et non pas uniquement de l' $O_2$ . Ainsi, en absence d'oxygène, des accepteurs finaux alternatifs vont pouvoir être utilisés tels que les nitrates, les nitrites ou encore le fumarate (Figure 26).

**Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**



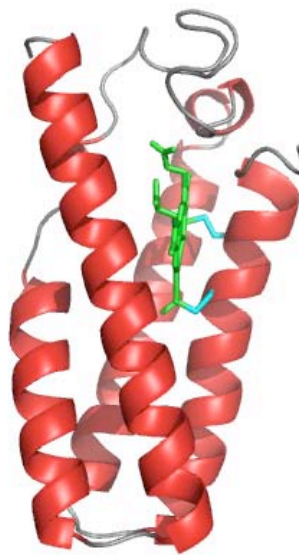
**Figure 26 : Représentation schématique des cytochromes intervenant dans la chaîne respiratoire bactérienne (d'après Thöny-Meyer, 1997).**

La chaîne respiratoire faisant intervenir différents accepteurs finaux d'électrons est représentée. Les oxydoréductases terminales sont encadrées en vert et le type de cytochrome associé est indiqué en dessous. SDH, FDN et HYD contiennent un cytochrome de type *b* et MOX un cytochrome de type *c*. SDH : Succinate déshydrogénase, FDN : Formate déshydrogénase, HYD : Hydrogénase, Q/QH<sub>2</sub> : quinone/quinol présentes dans la membrane, *bc1* : complexe *bc1*, *c* : cytochromes *c*, MOX : Méthanol oxydase.

Les cytochromes *c* ne sont pas impliqués uniquement dans le transfert des électrons du complexe *bc1* vers les oxydases terminales. En effet, dans le cas des bactéries méthylophiles Gram négatives, le méthanol est oxydé en formaldéhyde par une méthanol déshydrogénase périplasmique (MOX) et les électrons passent alors de cette MOX *via* un cytochrome *c* vers une oxydase terminale (Anthony, 1992). Dans le cas des bactéries sulfatoréductrices, le cytochrome *c3* tétrahémique joue le rôle de transporteur d'électrons entre une hydrogénase et la thiosulfate réductase (Barret et Clark, 1987).

## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

Il est à noter qu'il existe des protéines contenant un hème de type *c* qui n'interviennent pas au niveau de la chaîne respiratoire bactérienne mais qui vont avoir un rôle catalytique ou de détoxication. Par exemple les cytochromes *c'* jouent un rôle dans la détoxication du NO. Les cytochromes *c'* appartiennent à la famille des cytochromes *c* puisqu'ils possèdent une signature CXXCH et que l'hème est également lié *via* deux liaisons thioéthers entre les groupements vinyles de l'hème et les groupements thiols de deux Cys. Ils présentent un spectre d'absorbance similaire à celui observé pour les cytochromes *c* avec les trois bandes caractéristiques :  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\alpha$ . Ces cytochromes *c'* présentent cependant un repliement très caractéristique composé de quatre hélices  $\alpha$  et peuvent être retrouvés sous forme monomérique, dimérique (le plus souvent) ou encore tétramérique (Figure 27).



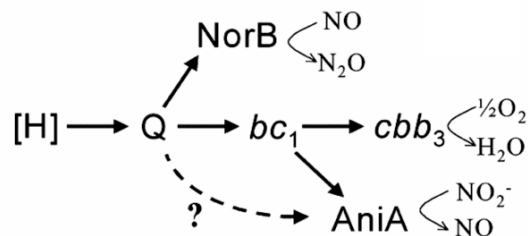
**Figure 27 :** Représentation de la structure tridimensionnelle du cytochrome *c'* de *R. capsulatus*. Les structures secondaires en hélices  $\alpha$  sont représentées en rouge. L'hème est représenté en vert et les deux Cys impliquées dans la fixation de l'hème sont représentées en bleu. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 1CPR.

Les cytochromes *c'* sont des protéines périplasmiques retrouvées généralement chez les organismes photosynthétiques ou dénitrifiants méthylophes et dont le rôle est de réduire le soufre. Cependant, l'analyse des génomes de nombreux pathogènes tels que *N. meningitidis*, *B. pertusis* et *Pseudomonas aeruginosa* a montré l'existence de gènes codant des cytochromes *c'* (Cross *et al.*, 2000). L'hème des cytochromes *c'* se lie préférentiellement à de petites molécules non chargées telles que l'oxyde nitrique (NO) ou le monoxyde de carbone (CO). Il a été décrit que l'expression de ce cytochrome *c'* permettait d'augmenter la résistance de *R. capsulatus* au NO (Cross *et al.*, 2000). Ces cytochromes agissent non seulement par séquestration du NO mais permettraient également de transformer le NO en entités non toxiques pour la cellule telles que du N<sub>2</sub>O (Cross *et al.*, 2001).

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

### II.3.1.3 Les cytochromes de *N. meningitidis*

La bactérie pathogène de l'homme *N. meningitidis* est capable d'utiliser des accepteurs finaux d'électrons différents de l' $O_2$  au cours de la respiration, en alternative à la respiration aérobie (Rock *et al.*, 2005). L'analyse du génome de *N. meningitidis* a mis en évidence l'existence de trois accepteurs terminaux d'électrons putatifs : une oxydase de type cytochrome *cbb3*, une nitrite réductase (AniA) et une nitrique oxyde réductase (NorB). Les cytochromes *cbb3* présents chez les autres organismes ont la particularité de posséder une très forte affinité pour l' $O_2$  et sont souvent associés à une croissance dans des conditions où l' $O_2$  est limité. Ceci explique que *N. meningitidis* soit adaptée à une croissance en conditions microaérobies. Le génome révèle également la présence d'homologues des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire, ce qui suggère que les électrons entrent dans la chaîne respiratoire *via* une NADH déshydrogénase ou une succinate déshydrogénase, puis que ces électrons sont transférés au complexe *bc1*, ou aux 2 autres accepteurs terminaux d'électrons AniA et NorB, *via* des ubiquinones (il est à noter que les méningocoques sont capables de synthétiser de l'ubiquinone mais pas de la ménaquinone). Des études menées par Deedom *et al.*, ont conduit à proposer une organisation de la chaîne respiratoire de *N. meningitidis* (Deedom *et al.*, 2006) (Figure 28).



**Figure 28 :** Représentation schématique de la chaîne respiratoire de *N. meningitidis* (d'après Deedom *et al.*, 2005).

[H] : NADH déshydrogénase ou succinate déshydrogénase, Q : ubiquinone, AniA : nitrite réductase, NorB : oxyde nitrique réductase, *bc1* : complexe *bc1*, *cbb3* : cytochrome oxydase *cbb3*. Le chemin emprunté par les électrons est représenté par des flèches. Le chemin permettant le transfert des électrons des ubiquinones vers AniA reste à déterminer et est donc représenté en traits pointillés.

*N. meningitidis* possède également un cytochrome *c'*, qui a été purifié et caractérisé *in vitro* (Huston *et al.*, 2005). Tout comme chez *R. capsulatus*, ce cytochrome *c'* permettrait d'augmenter la résistance des bactéries vis-à-vis du NO (Stevanin *et al.*, 2005).

II.3.1.4 Les différents systèmes de maturation des cytochromes *c* et les systèmes modèles

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

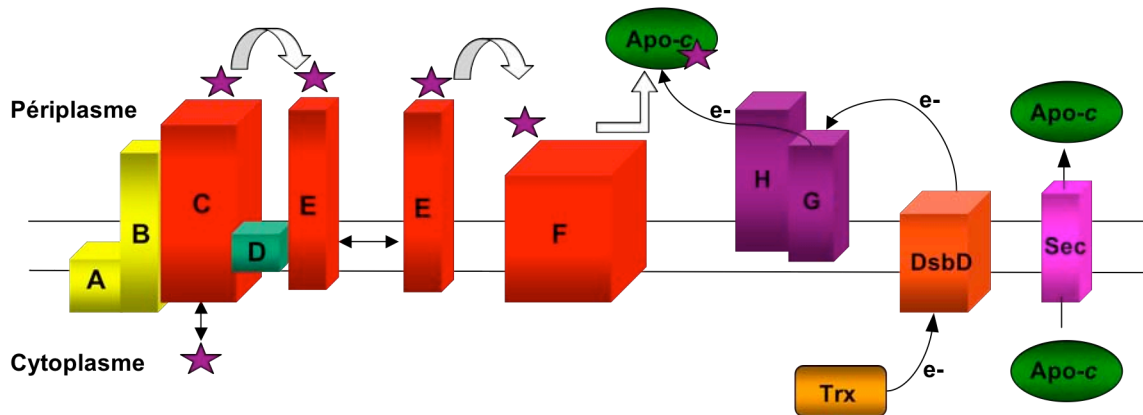
II.3.1.4.1 Système I

Le système I de maturation des cytochromes *c* a été étudié essentiellement chez *E. coli* et est composé de neuf protéines membranaires dont la protéine DsbD, les huit autres étant codées par les gènes *ccmABCDEFGH* (Thöny-Meyer *et al.*, 1995) (Figure 29). Toutes ces protéines sont essentielles pour la formation de cytochromes *c* matures. Les gènes *ccmA*, *ccmB*, *ccmC* ainsi que leurs homologues retrouvés chez les bactéries Gram négatives, codent les protéines CcmA, CcmB et CcmC qui constituent les différentes sous-unités d'un transporteur ABC (ATP-binding cassette). L'organisation de ce transporteur fait intervenir deux protéines CcmA pour une protéine CcmB et une protéine CcmC (Page *et al.*, 1997), et peut-être également la protéine CcmD (Goldman *et al.*, 1997). Au départ, ce transporteur était supposé permettre l'export de l'hème du cytoplasme vers le périplasma. Néanmoins, aucune preuve expérimentale n'a pu être apportée pour corréler cette hypothèse. Par contre, le fait que les mutants délétés des gènes *ccmABC* soient capables de produire des cytochromes *b* périplasmiques (qui diffèrent des cytochromes *c* uniquement par une fixation non covalente

## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

de l'hème, mais dans les deux cas c'est le même hème qui est utilisé) et que la production de cytochromes *c* ne peut pas être restaurée par l'apport d'hémine exogène semble indiquer que ce transporteur n'est pas impliqué dans le transport de l'hème (Page *et al.*, 1997, Goldman *et al.*, 1996). A l'heure actuelle, il existe une controverse concernant l'appartenance de CcmC et CcmD au transporteur. Il a été montré que CcmC fonctionne de façon tout à fait indépendante et est impliqué dans la catalyse du transfert de l'hème à la protéine CcmE (Schulz *et al.*, 1999) et que CcmD pourrait assister l'interaction entre CcmC et CcmE (Ahuja et Thöny-Meyer, 2005). L'hème serait ensuite transféré à la protéine CcmF puis à l'apocytochrome *c* réduit. CcmC et CcmF possèdent un domaine riche en Trp (appelée domaine WWD) orienté vers le périplasme et impliqué dans la fixation de l'hème. En ce qui concerne la réduction des Cys de l'apocytochrome, deux protéines sont supposées être impliquées : CcmG (DsbE) et CcmH. La protéine CcmG reçoit les électrons de la protéine DsbD (voir paragraphe II.3.2.3.2 page 57) et les transférerait à l'apocytochrome *via* la protéine CcmH (Reid *et al.*, 2001 ; Fabianek *et al.*, 2000).

Les mitochondries de plantes possèdent un système de maturation des cytochromes *c* de type I, mais l'analyse des génomes des mitochondries de plante a montré que les mitochondries ne possèdent pas toutes les séquences orthologues correspondant aux gènes *ccm* du système I (pour revue, voir Giegé *et al.*, 2007). Des orthologues de *ccmB*, *ccmC* et *ccmF* ont été identifiés dans tous les génomes mitochondriaux étudiés jusqu'ici. Chez *A. thaliana*, trois gènes codent des protéines similaires aux différents domaines de CcmF (Unsold *et al.*, 1997) et l'analyse du génome d'*A. thaliana* a permis d'identifier des composants du système Ccm : AtCcmE, AtCcmA et AtCcmH (Meyer *et al.*, 2005).



**Figure 29 :** Représentation schématique du système postulé de maturation des cytochromes *c* de type I.

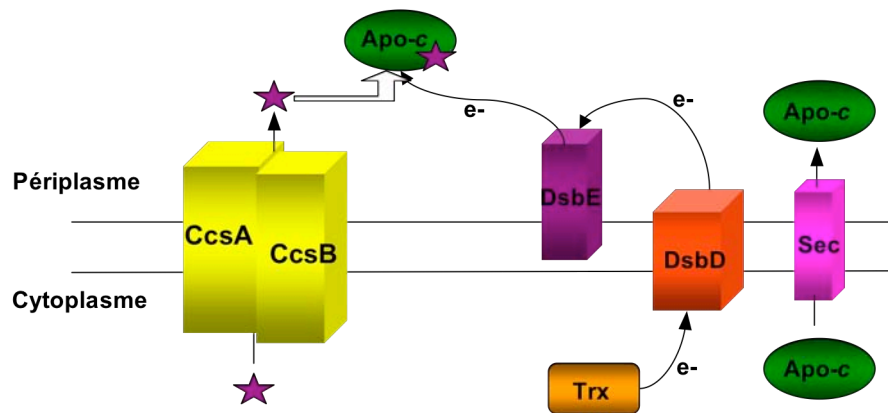
A, B, C, D, E, F, G et H représentent les 8 protéines codées respectivement par les gènes *ccmABCDEFGH*. L'hème est représenté par une étoile violette. L'hème est exporté du cytoplasme vers le périplasma par un mécanisme qui reste encore inconnu et est transféré *via* CcmC, E et F jusqu'à l'apocytochrome *c*. L'apocytochrome *c* est exporté du cytoplasme vers le périplasma *via* un système Sec. Il est réduit par des  $e^-$  provenant de la Trx cytoplasmique qui sont ensuite transférés à la DsbD puis à CcmG, CcmH pour finalement aboutir à l'apocytochrome *c*.

#### II.3.1.4.2 Système II

Le système II de maturation des cytochromes *c* est beaucoup plus simple que le système I puisqu'il est constitué seulement de quatre protéines codées par les gènes *ccsA*, *ccsB*, *ccsX* et *dsbD* chez *Bordetella pertussis* (Beckett *et al.*, 2000) (Figure 30). *B. pertussis* s'avère être un modèle de choix pour l'étude de ce système puisqu'elle possède trois cytochrome oxydases et une seule est prédite être une cytochrome *c* oxydase (Kranz *et al.*, 2002). De ce fait, les mutations au niveau des gènes *ccsA*, *B*, *X* et *dsbD* codant des protéines essentielles pour la maturation des cytochromes *c* ne sont pas létales, à l'inverse de ce qui est observé chez *B. subtilis* où des mutations dans les gènes *ccsA* et *ccsB* sont létales (Sun *et al.*, 1996 ; Le Brun *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui est retrouvé dans le système I, aucune protéine de type ABC transporteur ni aucune protéine chaperone de l'hème n'est impliquée dans l'assemblage des cytochromes *c* dans le système II. Dans le cas du système II, l'export de l'hème du cytoplasme vers le périplasma ainsi que la ligation de l'hème à l'apocytochrome sont postulés impliquer les protéines CcsA, qui possèdent un domaine périplasmique WWD (Goldman *et al.*, 1998), et CcsB. La protéine CcsX (DsbE) doit permettre la réduction des Cys de l'apocytochrome et la DsbD, tout comme dans le système I, permet la réduction de CcsX. Une différence des plus importantes existant entre le système I et le système II est que dans le

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

cas du système II, CcsX transférerait directement ses électrons à l'apocytochrome *c* sans passer par un intermédiaire (CcmH chez *E. coli*).



**Figure 30 :** Représentation schématique du système postulé de maturation des cytochromes *c* de type II.

L'hème est représenté par une étoile violette. L'hème est exporté du cytoplasme vers le périplasma probablement *via* CcsA et CcsB puis transféré à l'apocytochrome *c*. L'apocytochrome *c* est exporté du cytoplasme vers le périplasma *via* un système Sec et est réduit par des  $e^-$  provenant de la Trx cytoplasmique qui sont ensuite transférés à la DsbD puis à la DsbE (CcsX) pour finalement aboutir à l'apocytochrome *c*.

### II.3.1.4.3 Système III

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

### II.3.2 Les DsbE

Les DsbE sont des disulfures oxydoréductases périplasmiques. Deux types de DsbE, celles possédant un caractère réducteur et celles, comme dans le cas particulier de la bactérie Gram positive *M. tuberculosis*, qui possèdent un caractère oxydant ont été décrites jusqu'à présent (Goulding *et al.*, 2004). Des études *in vivo*, réalisées chez *E. coli* et *B. pertussis*, ont permis de montrer que les DsbE réductrices étaient impliquées dans la maturation des cytochromes *c*. Ainsi une délétion du gène *ccmG* chez *E. coli* ou du gène *ccsX* chez *B. pertussis* ne permet plus d'obtenir des cytochromes matures ayant fixé l'hème (Beckett *et al.*, 2000 ; Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Ces protéines sont postulées permettre la réduction de



## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

l'apocytochrome *c*, soit directement dans le cas des systèmes de maturation des cytochromes *c* de type II, soit *via* la protéine CcmH dans le cas des systèmes de maturation des cytochromes *c* de type I. Après réduction de l'apocytochrome *c*, les DsbE se retrouvent oxydées sous forme pont disulfure et doivent donc être régénérées pour être de nouveau actives. Le partenaire protéique permettant la régénération des DsbE sous forme réduite est la DsbD.

### II.3.2.1 Propriétés biochimiques

Les DsbE possédant un caractère réducteur ont un potentiel redox compris entre -0,217 et -0,175 V. Par contre, la DsbE de *M. tuberculosis* présente un potentiel redox de -0,128 V proche de celui observé pour les DsbA (-0,124 V) en accord avec son caractère oxydant. De plus, si ces deux classes de DsbE possèdent deux Cys essentielles avec la Cys catalytique exposée au solvant, les pKa de ces deux résidus diffèrent suivant le type de DsbE. En effet, le pKa de la Cys catalytique de la DsbE de *M. tuberculosis* est de 5, ce qui est particulièrement bas comparé à ce qui peut être observé pour les Trx (7,5) ou encore pour la CcmG d'*E. coli* (6,8). Le pKa de la Cys de régénération n'a pas été déterminé pour la DsbE de *M. tuberculosis*. Pour les DsbE réductrices, le pKa de la Cys de régénération est élevé, de l'ordre de 9.

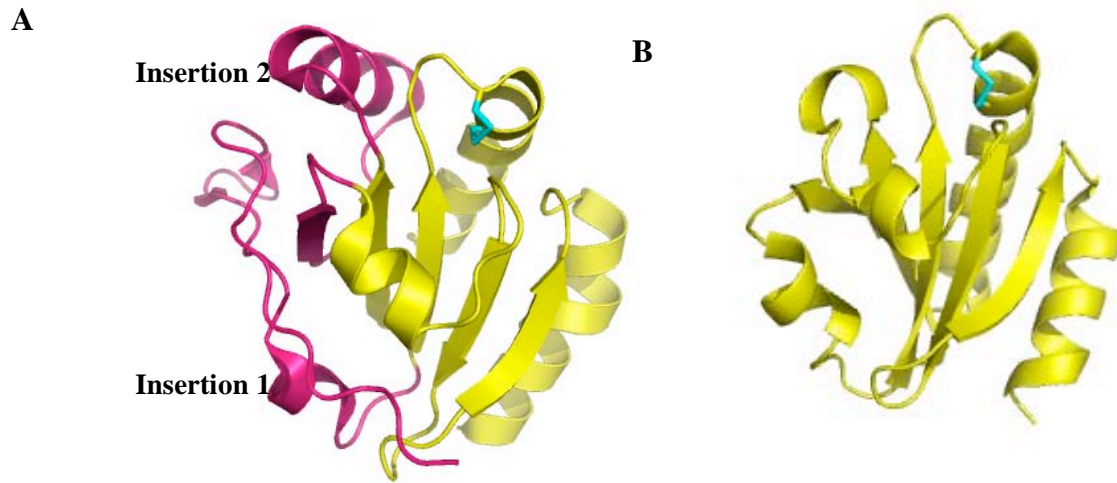
### II.3.2.2 Caractéristiques structurales

A ce jour, plusieurs structures tridimensionnelles de DsbE ont été résolues : CcmG d'*E. coli*, CcmG de *Bradirhizobium japonicum*, ResA de *B. subtilis*, ainsi que la structure d'une DsbE particulière de la bactérie Gram positive de *M. tuberculosis* (Ouyang *et al.*, 2006 ; Edeling *et al.*, 2002 ; Colbert *et al.*, 2006 ; Goulding *et al.*, 2004). La DsbE de *M. tuberculosis* présente une activité plutôt oxydante et cette différence de fonction par rapport aux autres DsbE se retrouve également au niveau de sa séquence et de sa structure.

Les DsbE sont des protéines monomériques constituées d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  qui contiennent un domaine avec un repliement de type Trx avec deux insertions supplémentaires (Figure 31). Le domaine Trx est caractérisé par la présence d'un motif  $\beta\alpha\beta$  lié *via* une hélice  $\alpha$  à un autre motif  $\beta\beta\alpha$  formant ainsi un feuillet  $\beta$  mixte composé de quatre brins  $\beta$  entouré de trois hélices  $\alpha$ . La première insertion est située à l'extrémité N-terminale de la protéine et présente une structure en épingle à cheveux contenant deux brins  $\beta$ . La

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

seconde insertion, également appelée insertion centrale, est localisée après le motif  $\beta\alpha\beta$  et est composée d'une hélice  $\alpha$  ainsi que d'un brin  $\beta$ .

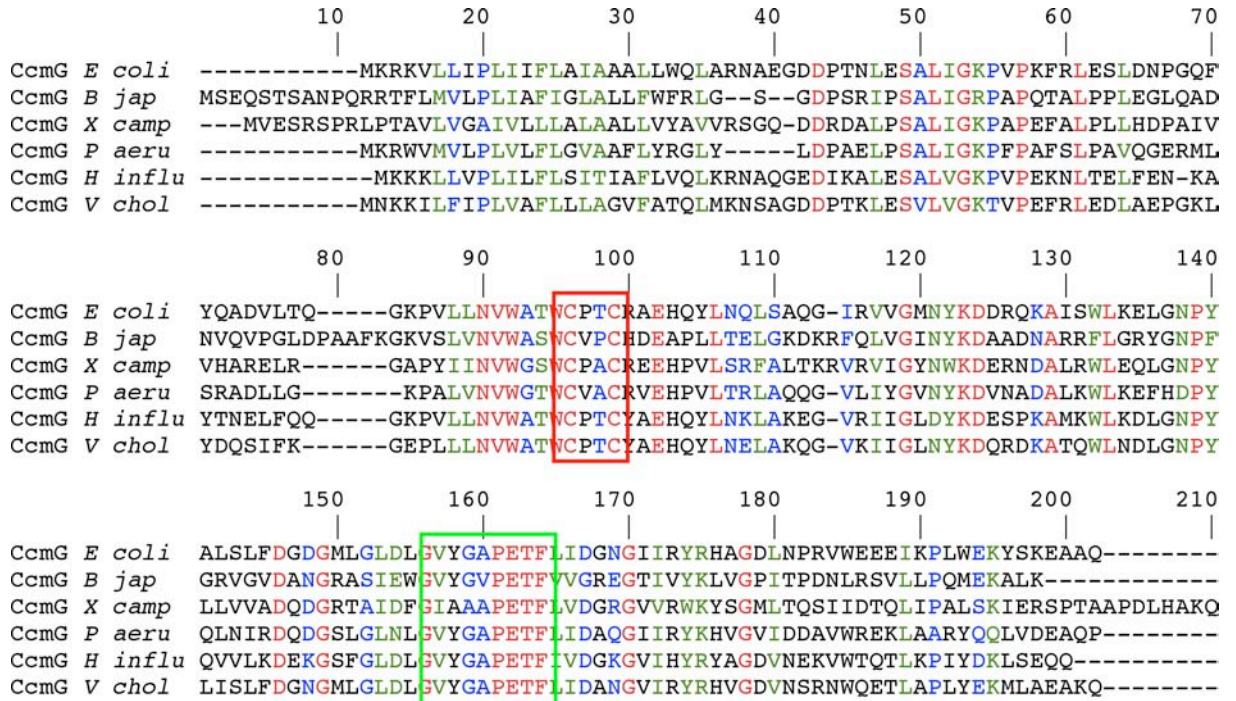


**Figure 31 :** Comparaison des structures tridimensionnelles de la A) CcmG de *B. japonicum* et B) Trx1 d'*E. coli* (d'après Edeling *et al.*, 2002).

Le domaine Trx est coloré en jaune, les insertions dans le domaine Trx sont représentées en rose et les Cys catalytiques sous forme pont disulfure sont représentées en bleu clair. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir des fichiers PDB 1KNG et 2FCH.

Ces insertions sont conservées chez tous les homologues DsbE. Une délétion de l'insertion centrale empêche la formation de cytochromes *c* matures, sans toutefois changer la stabilité de la protéine (Edeling *et al.*, 2002). Cette insertion centrale pourrait donc avoir un rôle dans l'interaction entre la DsbE et ses deux partenaires protéiques : l'apocytochrome *c* ou la DsbD. Au contraire, une étude cristallographique a montré que l'insertion située en N-terminal et contenant deux brins  $\beta$  était essentielle pour le maintien de la structure globale de la protéine ainsi que pour le maintien de la structure du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). Une délétion de cette partie N-terminale empêche la formation de cytochromes *c* matures. Des alignements de séquences d'homologues CcmG ont permis de mettre en évidence l'existence d'une région strictement conservée GVGXGPETF appelée région « Fingerprint » (Figure 32).

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

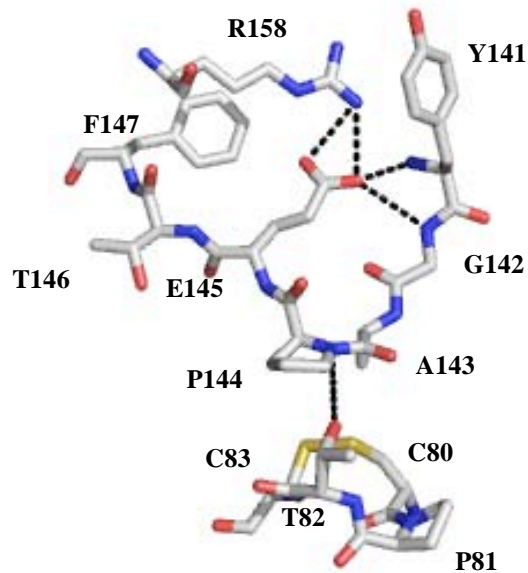


**Figure 32 : Alignement de séquence de CcmG de différents organismes.**

La séquence strictement conservée du site actif est encadrée en rouge et la région Fingerprint est encadrée en vert. Sont représentées les séquences des CcmG d'*E. coli*, *B. japonicum* (*B jap*), *X. campestris* (*X camp*), *P. aeruginosa* (*P aeru*), *Haemophilus influenzae* (*H influ*), *Vibrio cholerae* (*V chol*).

La structure de CcmG montre que cette région forme une boucle proche du site actif. A l'intérieur de ce motif se trouve la Pro de conformation *cis* qui est retrouvée chez toutes les protéines « Trx-like ». La structure de la CcmG d'*E. coli* révèle que le résidu *cis*-Pro de cette région « Fingerprint » aide à stabiliser la structure du site actif grâce à des interactions de van der Waals avec le pont disulfure du site actif et en formant une liaison H avec une des Thr du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). De plus, cette Pro en conformation *cis* permettrait de positionner correctement le résidu Ala adjacent pour permettre une interaction avec le partenaire DsbD. Le résidu Glu de cette région « Fingerprint » forme un pont salin avec le résidu Arg158 (parfois remplacé par une Lys dans les différentes séquences de CcmG) ainsi qu'un réseau de liaisons H avec les chaînes principales des résidus présents à l'extrémité N-terminale de la région « Fingerprint » permettant de conserver la *cis*-Pro dans une position appropriée et donc de stabiliser le site actif (Figure 33).

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx



**Figure 33 :** Représentation du site actif de la CcmG d'*E. coli*.

Les chaînes latérales du résidu Arg158 et des résidus de la région fingerprint Tyr141, Gly142, Ala143, Pro144, Glu145, Thr146 et Phe147 ainsi que les résidus du site actif Cys80, Pro81, Thr82 et Cys83 sont représentés. Les deux Cys catalytiques sont sous forme pont disulfure, et les liaisons H sont représentées par des traits pointillés. La figure a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol (d'après le fichier PDB 2B1K).

Le site actif des DsbE, comme toutes les « Trx-like », possède une signature CXXC. Néanmoins, une des particularités du site actif est qu'il est localisé dans un environnement constitué de nombreux résidus à caractère acide. Ceci est dû à la présence de deux Glu strictement conservés chez toutes les DsbE et d'un Asp qui n'est pas strictement conservé.

La DsbE de *M. tuberculosis* possède une structure tridimensionnelle quelque peu différente de celle décrite ci-dessus. Des alignements de séquence et des superpositions de structures 3D ont permis de mettre en évidence que deux régions strictement conservées dans les DsbE ne sont pas retrouvées dans la DsbE *M. tuberculosis*. En effet, la région N-terminale structurée en épingle à cheveux est beaucoup plus petite dans la DsbE *M. tuberculosis*, ce qui ne lui permet pas d'adopter une structuration similaire, et la région « Fingerprint » n'est pas conservée.

### II.3.2.3 Rôle des DsbE dans la maturation des cytochromes *c*

#### II.3.2.3.1 Rôle dans la réduction d'un apocytochrome *c*

Dans le système de maturation des cytochromes *c* de type I, la protéine CcmG est suggérée être impliquée dans la réduction de l'apocytochrome, indirectement en transférant ses électrons à la protéine CcmH. Cependant, aucune information n'est disponible ni au

## ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

niveau biochimique ni au niveau structural qui permettrait de confirmer cette hypothèse. Par contre, des études récentes ont permis de montrer que la protéine CcmH était capable d'interagir avec un peptide mimant un apocytochrome *c*. Ainsi, des études d'interactions ont été réalisées entre un mime peptidique d'un apocytochrome *c* de *P. aeruginosa* et la CcmH de *P. aeruginosa* par une technique de FRET (Di Matteo *et al.*, 2007). Cette technique a permis d'obtenir les constantes cinétiques suivantes :  $k_{on} = 0,05 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 0,5 \text{ s}^{-1}$ , d'où un  $K_D$  de 10  $\mu\text{M}$ , ce qui reflète une faible affinité de CcmH pour l'apocytochrome, en accord avec le rôle de CcmH comme intermédiaire de la chaîne de maturation des cytochromes *c*.

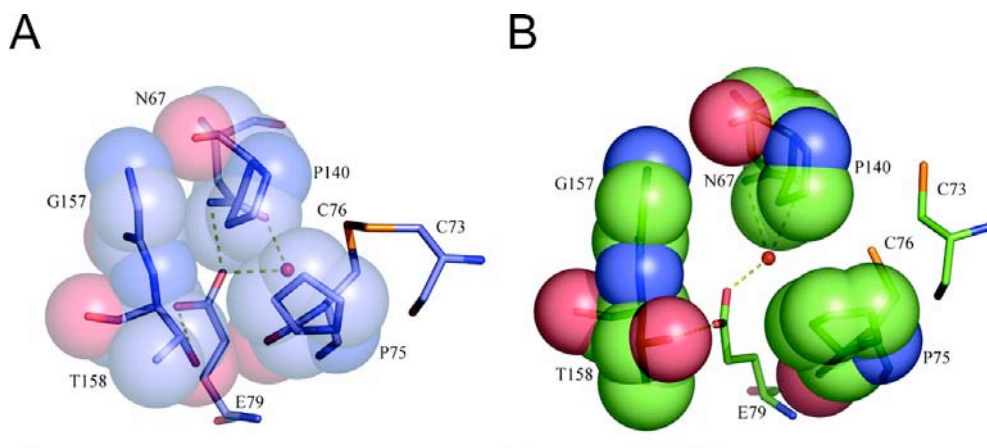
Récemment, des études utilisant le système double hybride de levure ont montré que la protéine CcmH d'*A. thaliana* (AtCcmH) était capable d'interagir avec un apocytochrome *c* provenant du même organisme (Meyer *et al.*, 2005). Des tests *in vitro* ont également permis de montrer que le domaine 1 d'AtCcmH, contenant les deux Cys catalytiques, était capable de réduire un peptide mimant un apocytochrome *c*.

En ce qui concerne les systèmes de maturation de type II, aucune donnée biochimique et structurale n'est disponible concernant la réduction d'un apocytochrome *c* entier par les DsbE. Les seules études réalisées ont été faites avec des peptides mimant un apocytochrome *c*.

A ce jour, aucune structure cristallographique d'un complexe entre une DsbE et un apocytochrome *c* n'a pu être obtenue. Néanmoins, des études de cristallographies ainsi que de RMN menées sur la protéine ResA sous forme oxydée et réduite ont permis d'émettre des hypothèses quant aux facteurs impliqués dans la reconnaissance entre ResA et l'apocytochrome *c*. Tout d'abord des structures cristallographiques des formes oxydées et réduites de ResA ont été obtenues (Crow *et al.*, 2004). Ces deux structures ne présentent que très peu de différences au niveau du repliement global de la protéine. La seule grande différence se retrouve au niveau des deux Cys catalytiques. En effet, dans la forme oxydée de l'enzyme, les deux Cys sont reliées par un pont disulfure et leurs groupements thiols se trouvent à une distance de 2,16 Å. Au contraire, dans la forme réduite, l'atome de soufre de la Cys catalytique subit une rotation de 228° ce qui entraîne une augmentation de la distance entre les deux atomes de soufre qui passe alors à 4,5 Å. La Cys catalytique partiellement exposée au solvant se retrouve alors dans une région fortement hydrophobe et semble bien positionnée pour jouer son rôle de nucléophile pour aller réduire le pont disulfure de son partenaire oxydé. Ces observations sont tout à fait en accord avec le mécanisme des protéines Trx-like : dans un premier temps les protéines « Trx-like » interagissent avec leur cible par interactions hydrophobes, et dans un deuxième temps leur Cys N-terminale du site actif,

## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

activée sous forme thiolate, réalise une attaque nucléophile sur le pont disulfure intramoléculaire de leur cible. Ceci ne constitue pas la seule différence existant entre la forme réduite et la forme oxydée de ResA. En effet, la comparaison des deux structures cristallographiques a permis de mettre en évidence l'existence d'une cavité dans la forme réduite de l'enzyme qui n'existe pas dans la forme oxydée (Figure 34). Cette cavité est constituée de résidus hydrophobes ainsi que de quelques résidus polaires et est localisée à proximité de la Cys catalytique. Le fait que cette cavité soit exclusivement présente dans la forme réduite de ResA suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la reconnaissance de l'apocytochrome *c*. Le volume de cette cavité n'est pas assez grand pour pouvoir accepter une chaîne polypeptidique même courte mais est suffisant pour accepter la chaîne latérale d'un acide aminé. Un tel acide aminé devrait avoir les caractéristiques suivantes : posséder à la fois une partie hydrophobe et polaire pour s'adapter parfaitement dans la cavité, être proche de la signature CXXC et être conservé dans les apocytochromes *c*. L'His du motif CXXCH de l'apocytochrome semble un bon candidat pour remplir ce rôle. Lorsque l'His est modélisée à l'intérieur de la cavité, elle semble être bien positionnée et stabilisée par les résidus de cette cavité et notamment par le résidu Glu79 qui se trouve au fond de la cavité et qui forme des liaisons H avec l'His.



**Figure 34 : Représentation de la conformation ouverte et fermée de la cavité du site actif dans les structures des formes oxydées (A) et réduites (B) de ResA (d'après Crow *et al.*, 2004).**

(A) Conformation fermée dans ResA sous forme oxydée. (B) Conformation ouverte dans ResA sous forme réduite. Les résidus constituant la cavité sont représentés en sticks. Les résidus qui bordent la cavité sont représentés par des sphères semi-transparentes.

D'autres études ont permis de montrer que l'élément important pour la fixation de l'hème à l'apocytochrome *c* est le motif CXXCH. Ainsi, le petit peptide AACLACHAIG, qui contient ce motif CXXCH, peut fixer l'hème (Braun *et al.*, 2005). De plus, des souches

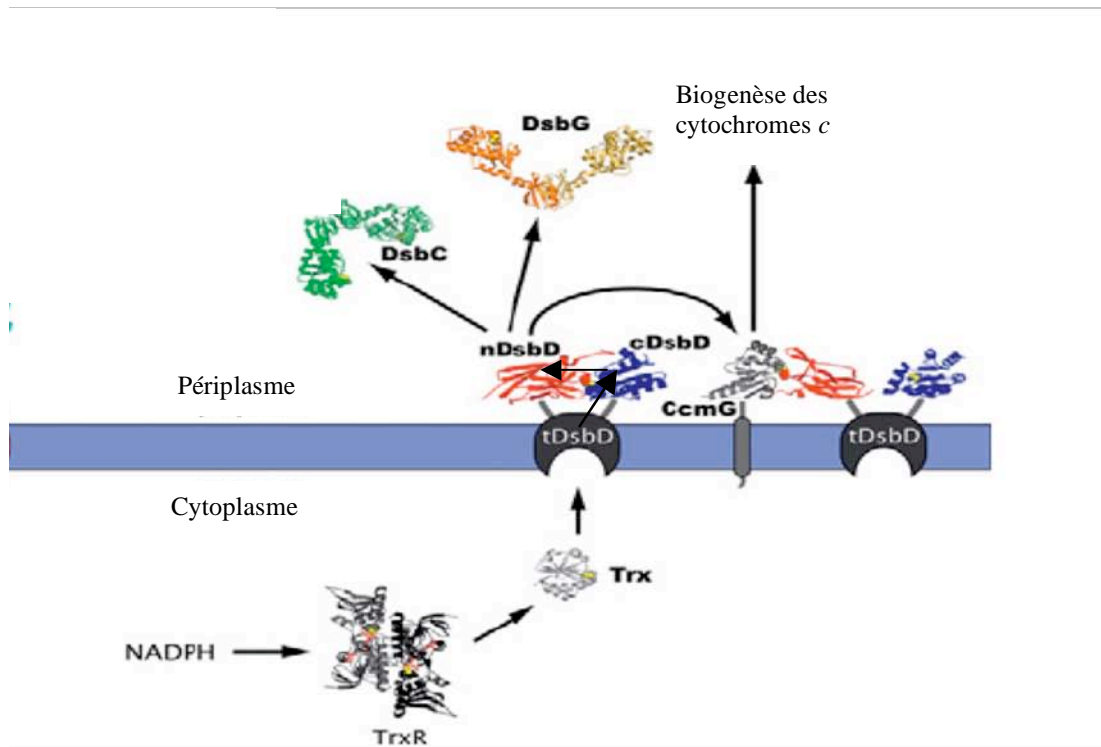
### ***Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx***

mutées au niveau de la séquence codant l'His de cette signature caractéristique dans le gène *dsbE* sont incapable de maturer les cytochromes *c* (Allen *et al.*, 2005). Ce résidu semble donc essentiel pour la fixation de l'hème comme suggéré par les études cristallographiques décrites ci-dessus.

Tous ces résultats ont été confortés par une étude RMN des interactions existant entre la protéine ResA de *B. subtilis* et un peptide mimant un apocytochrome *c* (Colbert *et al.*, 2006). Il est cependant intéressant de noter que ces études ont été faites avec ResA et le peptide mimant l'apocytochrome tous deux soit sous forme oxydée, soit sous forme réduite, étant donné que les conditions utilisées en RMN ne permettent pas de maintenir les deux partenaires sous des formes redox différentes.

#### **II.3.2.3.2 Rôle vis-à-vis de leur partenaire réducteur**

La réduction des ponts disulfures de nombreuses protéines « Trx-like » périplasmiques se fait par l'intermédiaire de la protéine transmembranaire DsbD. Ainsi les électrons provenant du NADPH cytoplasmique sont transférés à la TrxR puis à la Trx et enfin au périplasma *via* la DsbD (Kadokura *et al.*, 2003). La protéine DsbD est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal de type immunoglobuline (nDsbD), un domaine central transmembranaire (TMD), et un domaine C-terminal qui possède un repliement de type Trx (cDsbD) (Gordon *et al.*, 2000 ; Goulding *et al.*, 2002 ; Stirnimann *et al.*, 2006). Chacun de ces domaines possède une paire de Cys qui est essentielle au transport des électrons (Stewart *et al.*, 1999). Les électrons sont transportés à travers la membrane cytoplasmique grâce à des échanges de ponts disulfures intramoléculaires entre les trois domaines de la DsbD. Dans un premier temps, les électrons sont transférés de la Trx au TMD, ils passent ensuite au domaine cDsbD et enfin aboutissent au domaine nDsbD (Katzen et Beckwith, 2000). Les électrons vont alors pouvoir être transférés du domaine nDsbD vers ses différentes cibles périplasmiques (Figure 35).



**Figure 35 :** Représentation schématique du mode de fonctionnement de la protéine DsbD (d'après Stirnimann *et al.*, 2006).

Le transfert des électrons est représenté par des flèches noires.

La réduction de la CcmG d'*E. coli* par la nDsbD a été étudiée par suivi en cinétique rapide (stopped-flow) de la variation d'émission de fluorescence de la CcmG (Stirnimann *et al.*, 2005). Cette étape de réduction est très efficace avec une constante de vitesse de deuxième ordre d'environ  $3.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

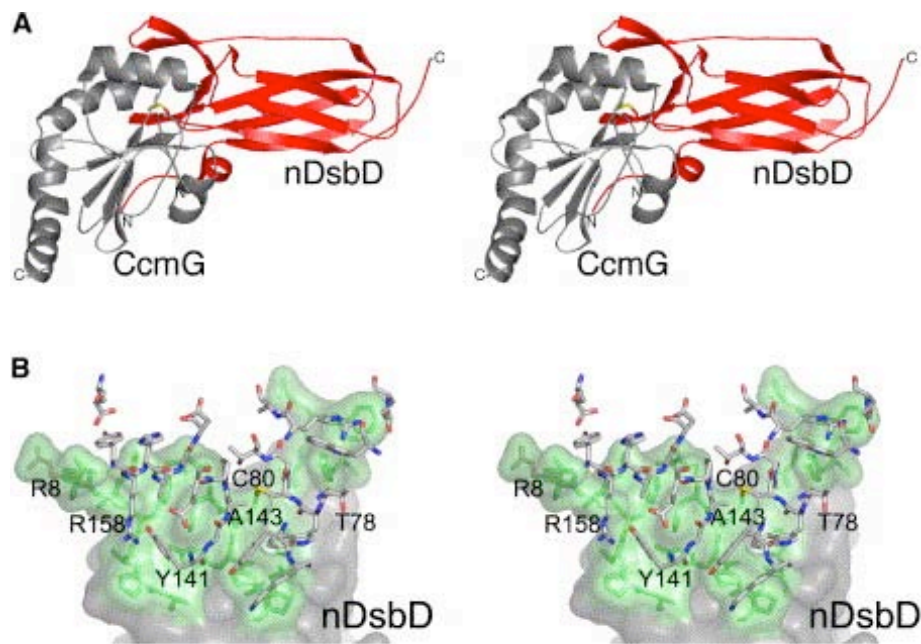
Les protéines DsbC, DsbG et CcmG (ou DsbE) sont connues comme étant des substrats de la protéine DsbD. Plusieurs structures cristallographiques de nDsbD en complexe avec un de ces partenaires ont pu être obtenues, plus particulièrement des complexes covalents *via* un pont disulfure intermoléculaire entre nDsbD et DsbC (Haebel *et al.*, 2002) ou encore nDsbD et CcmG (Stirnimann *et al.*, 2005). Un autre complexe covalent entre nDsbD et cDsbD a également été cristallisé (Rozhkova *et al.*, 2004).

Au sein du complexe covalent nDsbD-CcmG, la protéine nDsbD présente la même orientation que dans le complexe avec cDsbD (Goulding *et al.*, 2002) (Figure 36). Deux régions sont impliquées dans l'interface : la région N-terminale et une région nommée cap-loop (résidus 68 à 72). En plus du pont disulfure intermoléculaire, cinq liaisons H ainsi que des liaisons hydrophobes sont impliquées au niveau de l'interface et notamment une liaison H avec la chaîne principale du résidu Ala adjacent au résidu *cis*-Pro conservé chez toutes les



## Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx

protéines « Trx-like ». Trois autres résidus de CcmG sont impliqués dans l'interface : deux résidus Glu très conservés et un résidu Asp moins conservé au sein de ces DsbE. Le rôle de ces trois résidus a déjà été discuté dans un paragraphe précédent comme étant impliqués dans l'environnement constitué de nombreux résidus à caractère acide du site actif des DsbE. L'étude de différents variants Ala de la DsbE au niveau de ces trois résidus a montré qu'ils sont indispensables à la maturation des cytochromes *c*.

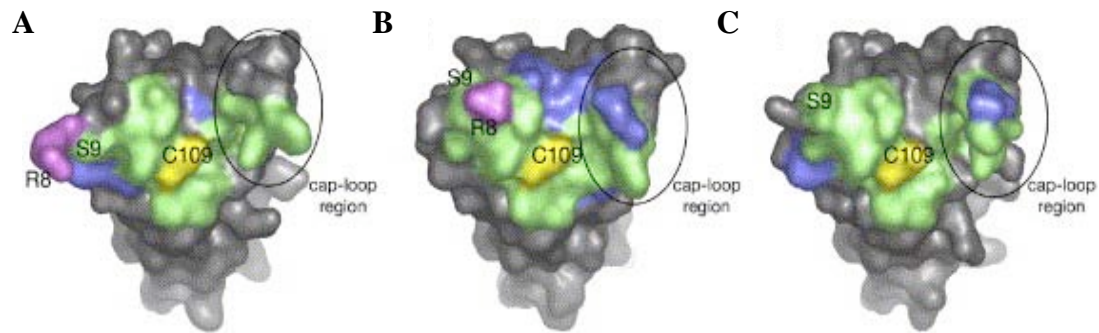


**Figure 36 : Représentation du complexe covalent nDsbD-SS-CcmG (A) et de son interface (B) (d'après Stirnimann *et al.*, 2005).**

(A) La CcmG d'*E. coli* est représentée en gris, nDsbD en rouge et le pont disulfure est coloré en jaune. (B) Interface entre nDsbD et CcmG. Les résidus appartenant à la nDsbD et impliqués dans l'interface sont montrés en vert, les résidus de la CcmG intervenant au niveau de l'interface sont représentés en gris avec leur atome colorés. Les liaisons H apparaissent en pointillés jaunes. Le résidu R8 adopte deux conformations différentes.

La surface d'interaction entre nDsbD et ses différents partenaires est quasiment similaire, que ce soit au sein du complexe avec cDsbD, CcmC ou CcmG. La majorité des résidus impliqués dans la liaison de nDsbD à un de ses substrats Trx-like sont communs. Seulement quelques résidus forment des contacts spécifiques entre nDsbD et un substrat spécifique. Comme dit précédemment, deux régions flexibles sont impliquées dans la reconnaissance de ces substrats « Trx-like » : la région cap-loop et le segment N-ter. Ce dernier segment présente une très grande adaptabilité au sein des différents complexes, et notamment les résidus Arg8 et Ser9 qui peuvent adopter plusieurs conformations suivant les complexes (Figure 37).

**Introduction : Les disulfure oxydoréductases de la famille des Trx**



**Figure 37 : Représentation schématique de la surface de nDsbD impliquée dans l'interaction avec différents partenaires (d'après Stirnimann *et al.*, 2005).**

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

## Objectifs

Les travaux réalisés sur les Msr par notre équipe avant que je ne débute mon projet de thèse avaient permis de mettre en évidence un mécanisme catalytique original, à trois étapes, de réduction d'une fonction sulfoxyde par des thiols commun aux MsrA et aux MsrB. La vitesse de la première étape de ce mécanisme, appelée l'étape réductase, est très rapide. L'étape réductase aboutit à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys catalytique ainsi qu'à la libération d'une mole de Met par mole d'enzyme. Au cours de la deuxième étape, un pont disulfure intramoléculaire est formé entre la Cys catalytique et la Cys de régénération avec la libération d'une molécule d'eau. La dernière étape conduit à la régénération des Msr sous forme réduite *via* l'intervention de la Trx. Le fait que les MsrA et MsrB soient structurellement différentes alors que leur mécanisme catalytique est semblable posait la question de la nature des résidus impliqués dans la catalyse des trois étapes et dans la spécificité structurale vis-à-vis du substrat sulfoxyde et du partenaire réducteur.

Les études menées sur le mécanisme, la catalyse et la spécificité structurale des Msr ont été réalisées sur les domaines MsrA et MsrB isolés de la protéine PilB de *N. meningitidis*, protéine périplasmique à trois domaines structuraux. Le domaine N-terminal porte une activité disulfure oxydoréductase de type Trx, recyclant les activités réductases des domaines Msr de PilB. Ce domaine N-terminal a plus précisément un repliement structural de type DsbE. Ces DsbE sont connues pour être des disulfure oxydoréductases périplasmiques impliquées dans la maturation des cytochromes *c*.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif principal la caractérisation des résidus du site actif de la MsrA de *N. meningitidis* impliqués d'une part dans la catalyse de l'étape réductase et d'autre part dans la spécificité structurale vis-à-vis du substrat sulfoxyde et de la Trx. Le fait que le domaine N-terminal de la protéine PilB possède un repliement de type DsbE m'a conduit à initier un projet consacré à la caractérisation des disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*, dans le but d'identifier les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la reconnaissance sélective de leurs différents partenaires : apocytochrome *c* et domaines Msr.

## **Objectifs**

Les résultats sont présentés en deux parties :

La première partie, sous forme de deux publications complétées par des résultats non publiés, est consacrée à la caractérisation des acides aminés de la MsrA de *N. meningitidis* impliqués dans la catalyse de l'étape réductase ainsi que dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde.

La deuxième partie est consacrée à la caractérisation des trois disulfure oxydoréductases périplasmiques putatives de *N. meningitidis*, dans le but d'identifier la DsbE de *N. meningitidis* et de comparer ses propriétés à celles du domaine N-terminal de PilB. L'état d'avancement du projet est présenté.

Une autre publication et un article de revue sont joints en annexe. La publication est issue de notre collaboration avec l'équipe du Dr. M. Ruiz Lòpez, sur l'étude d'une réaction modèle de l'étape réductase des Msr par une approche de chimie théorique : la réaction de réduction du diméthylsulfoxyde (DMSO) par du méthanethiol. L'article de revue, qui est sous presse, fait l'état actuel des connaissances sur les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la catalyse et la spécificité structurale des Msr.

L'ensemble des résultats est discuté dans la partie Discussion/Perspectives.

# Résultats



## **Partie I : Caractérisation des acides aminés de la MsrA de *N. meningitidis* impliqués dans la catalyse de l'étape réductase et dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde**

Comme cela est décrit dans l'Introduction (paragraphe I.5.4.1, page 19), l'examen des alignements de séquence ainsi que des structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, *B. taurus*, *M. tuberculosis* et *N. meningitidis* montrait la présence dans le site actif de résidus conservés donc potentiellement impliqués dans la catalyse et/ou la reconnaissance du substrat sulfoxyde (figure 1, publication 2). Ainsi trois sous-sites ont pu être définis :

- le premier sous-site hydrophile est composé des résidus invariants Tyr82, Glu94 et Tyr134 qui sont bien positionnés pour que leurs chaînes latérales interagissent, *via* des liaisons H, avec l'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat dans le complexe Michaelien et ainsi stabiliser la forme polarisée de la fonction sulfoxyde. Dans ce contexte, le résidu Glu94 pouvait également jouer le rôle de catalyseur acide/base général.

- le second sous-site est constitué des résidus invariants Phe52 et Trp53, qui forment une poche hydrophobe dans laquelle peuvent se fixer les groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène du substrat. De plus, les résidus invariants His186 et Tyr189 en formant respectivement une liaison H et une interaction de type « stacking » avec le noyau indole du Trp53, conduisent à un positionnement défini du noyau indole. Ces quatre résidus étaient donc de bons candidats pour fixer efficacement le substrat, directement pour les résidus Phe52 et Trp53, et indirectement pour les résidus His186 et Tyr189.

- le dernier sous-site est constitué de deux autres résidus invariants, Asp129 et Tyr197, qui sont positionnés dans la structure de la MsrA de *M. tuberculosis* pour interagir avec le NH de la chaîne principale de la Met-1 qui occupe le site actif. Ces résidus pourraient être impliqués dans la reconnaissance de la chaîne principale du substrat.

Afin de valider ou non ces hypothèses, nous avons réalisé une étude sur la MsrA de *N. meningitidis* en utilisant une approche d'ingénierie protéique par mutagenèse dirigée couplée à la caractérisation des paramètres cinétiques des différents variants générés. Les pKa apparents des résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase ont également été déterminés. L'enzyme sauvage ainsi que les variants du résidu Glu94 ont été caractérisés essentiellement par le Dr. Mathias Antoine. Quant à moi, j'ai plus particulièrement caractérisé les variants des résidus Phe52, Trp53, Tyr82, Asp129, Tyr134, His186, Tyr189 et Tyr197.

## **Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat**

Les résultats obtenus ont montré que le premier sous-site, dans lequel se trouve l'oxygène de la fonction sulfoxyde, joue un rôle essentiel dans la catalyse de l'étape réductase (publication 1), alors que les deux autres sous-sites sont impliqués dans la fixation du substrat (publication 2).

Les résultats sont présentés en deux parties correspondant aux deux publications, suivies d'une troisième partie consacrée à l'étude de la spécificité de la MsrA vis-à-vis d'un substrat protéique, la protéine L7/L12 d'*E. coli*.

### **I.1 Résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase**

#### **I.1.1 Résumé des résultats**

Afin de mettre en évidence le rôle des résidus Tyr82 et Tyr134, les variants Y82F, Y134F et Y82F/Y134F de la MsrA ont été générés. Pour tous ces variants, aucune modification significative de l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat AcMetSONHMe, déterminée pour la première étape et exprimée par la valeur de la constante  $K_S$ , n'a été observée. En revanche, si la substitution d'un seul résidu Tyr en Phe n'entraîne qu'une faible diminution de la constante de vitesse maximale de l'étape réductase ( $k_{max}$ ) (facteur 16 et 3 respectivement pour les variants Y82F et Y134F), la substitution simultanée des deux résidus engendre une diminution importante, d'un facteur  $2.10^4$ , de la constante  $k_{max}$ . Ces résultats montrent que ces deux résidus sont impliqués dans la catalyse de l'étape réductase et non pas dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde. Les résultats obtenus sur les variants du Glu94 montrent que ce résidu joue un rôle essentiel dans la catalyse de l'étape réductase, compatible avec un rôle de catalyseur acide.

Dans l'enzyme sauvage, la vitesse de l'étape réductase dépend de la déprotonation d'un seul groupement ionisable, le groupement thiol de la Cys51 catalytique. C'est également le cas pour tous les variants de MsrA générés. Le pKa apparent de ce groupement ionisable est de 9,3 dans l'enzyme sauvage libre et de 5,7 dans le complexe MsrA sauvage/AcMetSONHMe. Pour les différents variants générés, le pKa apparent dans le complexe MsrA/AcMetSONHMe est compris entre 7,5 et 9,5, ce qui montre que les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 sont impliqués, directement ou indirectement, dans l'abaissement du pKa apparent de la Cys catalytique lors de la formation du complexe Michaelien.



***Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat***

I.1.2 Publication 1

Mathias ANTOINE, Adeline GAND, Sandrine BOSCHI-MULLER et Guy BRANLANT (2007) Characterization of the amino acids from *N. meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step. *J. Biol. Chem.*, 281, 39062-70.

Pages 66 à 74

## Characterization of the Amino Acids from *Neisseria meningitidis* MsrA Involved in the Chemical Catalysis of the Methionine Sulfoxide Reduction Step\*

Received for publication, September 13, 2006, and in revised form, October 18, 2006. Published, JBC Papers in Press, October 24, 2006, DOI 10.1074/jbc.M608844200

Mathias Antoine<sup>1</sup>, Adeline Gand<sup>1</sup>, Sandrine Boschi-Muller, and Guy Branlant<sup>2</sup>

From the Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Unite Mixte de Recherche, CNRS-UHP 7567, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Methionine sulfoxide reductases (Msrs) are ubiquitous enzymes that reduce protein-bound methionine sulfoxide back to Met in the presence of thioredoxin. *In vivo*, the role of the Msrs is described as essential in protecting cells against oxidative damages and as playing a role in infection of cells by pathogenic bacteria. There exist two structurally unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB, specific for the *S* and the *R* epimer of the sulfoxide function of methionine sulfoxide, respectively. Both Msrs present a similar catalytic mechanism, which implies, as a first step, a reductase step that leads to the formation of a sulfenic acid on the catalytic cysteine and a concomitant release of a mole of Met. The reductase step has been previously shown to be efficient and not rate-limiting. In the present study, the amino acids involved in the catalysis of the reductase step of the *Neisseria meningitidis* MsrA have been characterized. The invariant Glu-94 and to a lesser extent Tyr-82 and Tyr-134 are shown to play a major role in the stabilization of the sulfurane transition state and indirectly in the decrease of the  $pK_{app}$  of the catalytic Cys-51. A scenario of the reductase step is proposed in which the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized via interactions with Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 and participates via the positive or partially positive charge borne by the sulfur of the sulfoxide in the stabilization of the catalytic Cys.

Methionine sulfoxide reductases (Msr)<sup>3</sup> are enzymes that catalyze the reduction of free and protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) back to Met. Two structurally unrelated classes of Msrs have been described so far. MsrAs are stereo specific toward the *S* isomer on the sulfur of the sulfoxide function, whereas MsrBs are specific toward the *R* isomer. Both classes share a similar three-step catalytic mechanism (Scheme

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

The three-dimensional structures of the MsrA from *Escherichia coli*, *Bos taurus*, and *Mycobacterium tuberculosis* have been recently solved by x-ray crystallography (3–5). The active site can be represented as an opened basin readily accessible to the MetSO substrate in which the catalytic Cys-51 is located at the entrance of the  $\alpha$  1 helix. In all the structures, the active site is occupied by a molecule that is covalently or non-covalently bound to the catalytic cysteine. In the case of *E. coli* MsrA, a dimethyl arsenate molecule is covalently bound, whereas it is a dithiothreitol molecule in *B. taurus* enzyme. In the case of *M. tuberculosis* MsrA, a methionine residue from a neighboring monomer occupies the active site. In all three structures, a water molecule is present, the position of which can mimic the oxygen atom of the sulfoxide function of MetSO. This water molecule is tightly H-bonded to three invariant amino acid residues, *i.e.* Tyr-82, Glu-94, and Tyr-134. All the three structures also support the involvement of invariant Phe-52 and Trp-53 in the substrate recognition via the formation of a hydrophobic pocket in which the  $\epsilon$  methyl group of MetSO can bind.

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

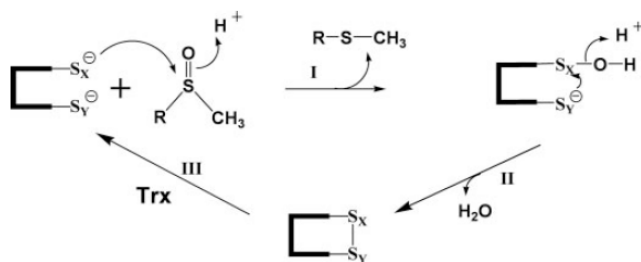
In the present study, the role of Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 residues and how the catalytic Cys-51 is stabilized in the reductase step of the MsrA from *N. meningitidis* have been investi-

\* This research was supported by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Federatif de Recherche 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 5436), and the French Ministry of Research (ACI BCMS047). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Supported by the French Ministry of Research.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-83-68-43-04; Fax: 33-3-83-68-43-07; E-mail: Guy.Branlant@maem.uhp-nancy.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: Msr, methionine sulfoxide reductase; 2PDS, 2,2'-dipyridyl disulfide; AcMetSONHMe, Ac-L-Met-*R,S*-SO-NHMe; AcMet-NHMe, Ac-L-Met-NHMe; Me<sub>2</sub>SO, dimethyl sulfoxide; MetSO, methionine sulfoxide;  $pK_{app}$ , apparent  $pK_a$ ; Trx, thioredoxin.



**SCHEME 1. Schematic representation of the catalytic mechanism of MsrA and MsrB from *N. meningitidis*.** The mechanism consists of three steps. In step I, called the reductase step, a sulfenic acid intermediate is formed on the catalytic Cys-X with a concomitant release of one mol of Met/mol of enzyme. In step II, a disulfide bond is formed between the Cys-X and the recycling Cys-Y with a release of a water molecule. In step III, return of the active site to a fully reduced state proceeds via reduction of the Msr disulfide bond by reduced Trx. *RSOCH<sub>3</sub>* and *RSCH<sub>3</sub>* represent MetSO and Met, respectively. For *N. meningitidis* MsrA, Cys-X = Cys-51 and Cys-Y = Cys-198.

gated. For that, the kinetic parameters and the pH dependence of the rate constant of the reductase step of mutated MsrAs at positions 82, 94, and 134 were determined and compared with those of the wild type. The  $pK_{app}$  of Cys-51 in the free enzyme was also determined. The results show that Cys-51 is activated upon substrate binding to the active site with a shift of its  $pK_a$  from 9.5 to 5.7. Substitutions at positions 82, 94, and 134 do not modify the apparent affinity for the substrate in the reductase step. In contrast, drastic decrease of the reductase step rate is observed for the E94A and Y82F/Y134F MsrAs, whereas E94Q MsrA displays only a small decrease. Moreover, each mutated MsrA is characterized by a shift of the  $pK_{app}$  of its Cys-51 to higher values compared with wild type. Taking into account all the results, a scenario for the catalysis of the sulfoxide reductase step is proposed in which Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 stabilize the sulfurane transition state formed. In this scenario, the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized via interactions with the side chains of Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 and plays a major role in stabilizing Cys-51 via the positive, or partially positive, charge borne by the sulfur of the sulfoxide function.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Site-directed Mutagenesis, Production, and Purification of Wild-type and Mutated *N. meningitidis* MsrAs**—The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* MsrA productions was BE002 (MG1655 *msrA::specΩ*, *msrB::α 3kana*), transformed with the plasmidic construction pSKPILBMsrA containing only the coding sequence of *msrA* from *pilB*, under the *lac* promoter (7). The BE002 strain was kindly provided by Dr. F. Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli* and thus avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* MsrA by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications were realized as previously described (1). Wild-type and mutated MsrAs were pure, as checked by electrophoresis on 12.5% SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses. Storage of the enzymes was done as previously described. The molecular concentration was deter-

mined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of  $26,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  for wild-type and mutated MsrAs. In this report, *N. meningitidis* MsrA amino acid numbering is based on *E. coli* MsrA sequence.

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

**pH Dependence of MsrA Thiol Reaction Rates with 2,2'-Dipyridyl Disulfide (2PDS)**—Because of the high reactivity of Cys-51 and Cys-198 in MsrA, fast kinetic measurements were carried out on an Applied PhotoPhysics SX18MV-R stopped-flow apparatus. MsrA reactions with 2PDS were performed at 25 °C under pseudo-first-order conditions in 30 mM acetic acid, 30 mM imidazole, 120 mM Tris/HCl buffer at constant ionic strength of 0.15 M over a pH range of 6 to 10 (polybuffer B). MsrA and 2PDS concentrations after mixing were 6.2 and 310  $\mu\text{M}$ , respectively. The pseudo-first-order rate constant  $k_{obs}$  was determined at each pH by fitting the absorbance (*A*) at 343 nm versus time (*t*) to mono-exponential Equation 1, where *a* is the burst amplitude and *c* is the end point. The second-order rate constants  $k_2$  were calculated by dividing  $k_{obs}$  by 2PDS concentration and then fitted to Equation 2, in which  $k_{2max}$  represents the second rate constant for the thiolate form.

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

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

**Measurement of the Thiol Ionization by Ultraviolet Absorbance**—Absorbance spectra were measured for all enzymes in 1.0-cm path length quartz cuvettes in a SAFAS UV-visible absorbance spectrophotometer. The protein samples were diluted to 23  $\mu\text{M}$  in polybuffer B. Spectra were recorded at 25 °C in 0.5-nm steps from 300 to 200 nm over a pH range of 7 to 10. The buffer solution was scanned relative to air, followed by a protein solution in the same cuvette versus air. The two spectra were then subtracted and the difference converted to molar absorption coefficients at 240 nm ( $\epsilon_{240 \text{ nm}}$ ). Data were fitted to a model derived from the Henderson-Hasselbach equation as shown in Equation 3 for one apparent  $pK_a$ .

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

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

## Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat

Trx reductase were prepared following experimental procedures already published (7).

**Preparation of MsrA under Oxidized Disulfide State**—MsrA oxidation was achieved by mixing 100  $\mu\text{M}$  MsrA with 100 mM MetSO in buffer A. The MetSO used was DL-Met-R,S-SO of which only the S isomer is a substrate for MsrA. After 10 min of incubation at room temperature, oxidized proteins were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A. Oxidation of MsrA in the disulfide state was checked by titration with 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzoate.

**Fluorescence Properties of Wild-type and Mutated MsrAs**—The fluorescence excitation and emission spectra of wild-type and mutated MsrAs in their reduced and Cys-51/Cys-198 disulfide state were recorded on a flx spectrofluorometer (SAFAS) thermostated at 25 °C in buffer A with 10  $\mu\text{M}$  of each protein as previously described (1).

**Determination of the Rate of Met Formation and of Thiol Loss by Single Turnover Quenched Flow Experiments**—Quenched flow measurements were carried out at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for double mixing and adapted to recover the quenched samples as previously described (1). The apparatus worked in a pulsed mode. Under the conditions used, a minimum aging time of ~25–40 ms was determined. Equal volumes (57.5  $\mu\text{l}$ ) of a solution containing 550  $\mu\text{M}$  Glu-94-mutated MsrA in buffer A and a solution containing AcMetSONHMe in buffer A were mixed in the aging loop. The mixture was then allowed to react for the desired time before being mixed with 115  $\mu\text{l}$  of a quenched aqueous solution containing 2% of trifluoroacetic acid. Quenched samples were then collected in a 200- $\mu\text{l}$  loop. For each aging time, four shots were done and the four corresponding quenched samples were pooled in a volume of 700  $\mu\text{l}$  and then analyzed.

After protein precipitation and centrifugation, Ac-L-Met-NHMe (AcMetNHMe) quantification in the resulting supernatant was carried out by reverse phase chromatography as previously described (2): 100  $\mu\text{l}$  were injected onto a 4.6  $\times$  250-mm Atlantis dC18 reverse phase column (Waters) on an AKTA explorer system (Amersham Biosciences) equilibrated with H<sub>2</sub>O/0.1% trifluoroacetic acid. AcMetNHMe was eluted after AcMetSONHMe with a linear gradient of acetonitrile.

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

Data were plotted as mole of AcMetNHMe formed/ mole of MsrA and as free remaining thiols/mole of MsrA, both as a function of time. The rate of Met formation was determined by fitting the curve to the monoexponential Equation 4 in which  $a$  represents the fraction of Met formed/mole of MsrA and  $k_{\text{Met}}$  represents the rate constant.

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

The rate of loss in free thiols was determined by fitting the curve to the monoexponential Equation 5 in which  $y_0$  represents the number of free remaining thiols,  $a$  the number of oxidized thiols, and  $k_{\text{SS}}$  the rate constant.

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

**Kinetics of the Formation of the Cys-51/Cys-198 MsrA Disulfide Bond in the Absence of Reductant by Single Turnover Stopped-flow Experiment at pH 8**—Kinetics of the Trp-53 fluorescence variation associated with the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond were measured for E94Q, Y82F, and Y134F MsrAs at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for fluorescence measurements as described previously (1). The excitation wavelength was set at 284 nm, and the emitted light was collected using a 320-nm cutoff filter. One syringe contained MsrA in buffer A (10  $\mu\text{M}$  final concentration after mixing), and the other one contained AcMetSONHMe at various concentrations in buffer A. An average of at least six runs was recorded for each AcMetSONHMe concentration. Rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential Equation 6 in which  $c$  represents the end point,  $a$  the amplitude of the fluorescence increase (<0), and  $k_{\text{obs}}$  the rate constant.

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

Data were fitted to Equation 7 using least square analysis to determine  $k_{\text{max}}$  and  $K_{\text{S}}$  for AcMetSONHMe.  $S$  represents the AcMetSONHMe concentration and  $K_{\text{S}}$  the apparent affinity constant.

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

Kinetics of the Trp-53 fluorescence variation associated with the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond were measured for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs at 25 °C on a flx spectrofluorometer (SAFAS). The excitation wavelength was set at 284 nm, and the fluorescence emission at 340 nm was recorded *versus* time after enzyme addition. Data were then treated as described above to obtain  $k_{\text{obs}}$ ,  $k_{\text{max}}$ , and  $K_{\text{S}}$  values.

**pH Dependence of the Reductase Step Rate Constant**—Determination of  $k_{\text{max}}$  and  $K_{\text{S}}$  as a function of pH was carried out for wild-type MsrA by single turnover pre-steady-state fluorescence stopped-flow spectroscopy, using the same procedure as described in the previous section but replacing buffer A with polybuffer B.  $k_{\text{obs}}$  values for E94Q, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F, and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs were determined at saturating concentration of AcMetSONHMe as a function of pH. Kinetics of Trp-53 fluorescence variation were recorded either with the stopped-flow apparatus or the spectrofluorometer depending on the mutated MsrA, as described in the previous section. The pH dependence of the reductase step rate constant for E94A and E94D MsrAs was determined under steady-state conditions using the Trx recycling system.  $k_{\text{max}}$  (or  $k_{\text{obs}}$ ) values were plotted against pH and fitted to Equation 8, deriving from a

one- $pK_a$  model, where  $k_{\max \text{ opt}}$  represents the maximum pH-independent rate constant.

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

## RESULTS

### Determination of $pK_{\text{app}}$ of the Cys Residues

The  $pK_{\text{app}}$  of both Cys-51 and Cys-198 were determined in the reduced free enzyme by two methods. The first one involved determining the second-order rate constant of the reaction with the Cys-specific reactivity probe 2-PDS as a function of pH. The second one took advantage of the variation of the thiolate UV absorbance as a function of pH.

**Kinetics of Reaction of Reduced Wild-type, C51S, and C198S MsrAs with 2PDS**—Reaction of 2PDS with wild-type MsrA obeyed pseudo-first-order kinetics, with formation of 2 mol of pyridine-2-thione/mol of MsrA as determined from the absorbance change at 343 nm. This result was expected as two Cys are present in *N. meningitidis* MsrA at positions 51 and 198. For all pH used, stopped-flow traces fitted to monoexponential Equation 1, with amplitude corresponding to the release of 2 mol of pyridine-2-thione. pH- $k_2$  profile fitted to monosigmoidal Equation 2 with a  $pK_{\text{app}}$  value of 9.7 and  $k_{2\max}$  value of  $(2.4 \pm 0.3) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 1A). The product of 2PDS reaction with wild-type MsrA is the disulfide-oxidized enzyme and not the thiopyridine adducts. Indeed, no release of pyridine-2-thione was observed when 10 mM dithiothreitol was added to the purified product (data not shown).

C51S and C198S MsrAs behaved similarly to wild-type MsrA, except that only 1 mol of pyridine-2-thione/mol of MsrA was formed.  $pK_{\text{app}}$  value of  $9.3 \pm 0.1$  and a  $k_{2\max}$  value of  $(3.1 \pm 0.7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for Cys-51 and a  $pK_{\text{app}}$  of  $9.8 \pm 0.1$  and a  $k_{2\max}$  value of  $(2.6 \pm 0.6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for Cys-198 were determined (Fig. 1B). Altogether, the data support a  $pK_{\text{app}}$  value of both Cys-51 and Cys-198 in the reduced free wild-type enzyme close to 9.5.

**Direct Thiolate UV Absorbance of Reduced Wild-type, C51S, and C198S MsrAs**—The thiolate absorbance of wild-type, C51S, and C198S MsrAs was monitored between pH 6 and 10. Analysis of the spectra and of the  $\epsilon_{240 \text{ nm}}$  as a function of pH yielded monosigmoidal plots for all three MsrAs. Data fitted to  $pK$  values of 9.7, 9.8, and 9.7, associated with  $\Delta\epsilon_{240 \text{ nm}}$  of  $3.1 \cdot 10^4$ ,  $2.3 \cdot 10^4$ , and  $2.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for wild-type, C51S, and C198S MsrAs, respectively (Fig. 2). These  $pK_{\text{app}}$  values of Cys-51 and Cys-198 in the reduced free enzyme are in good agreement with those obtained with 2PDS.

### Kinetic Characterization with Identification of the Rate-limiting Step of the Mutated MsrAs at pH 8

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

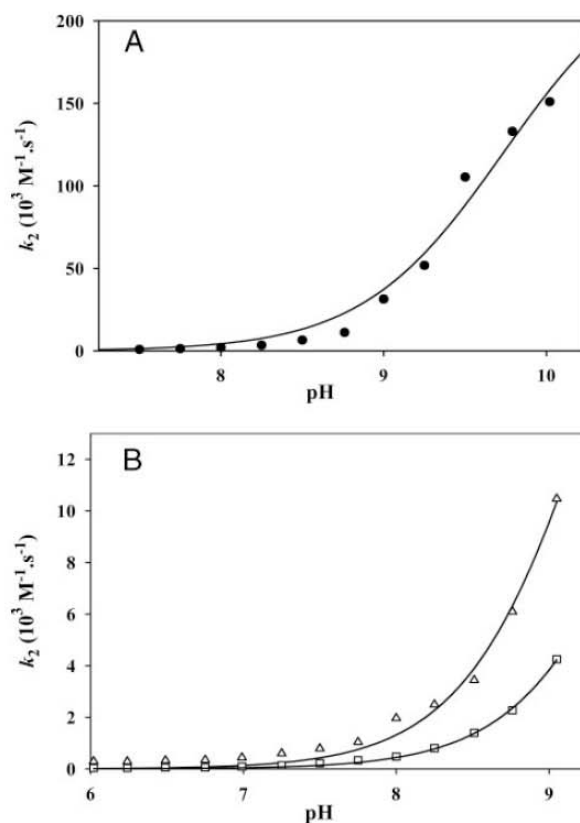


FIGURE 1. pH dependence of the second-order rate constant  $k_2$  for the reaction of the thiol group with 2PDS of wild-type (●, panel A), C51S (□, panel B) and C198S (Δ, panel B) MsrAs. Reaction kinetics were performed at 25 °C over a pH range of 5–9 or 10 in polybuffer B. The concentrations of enzymes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

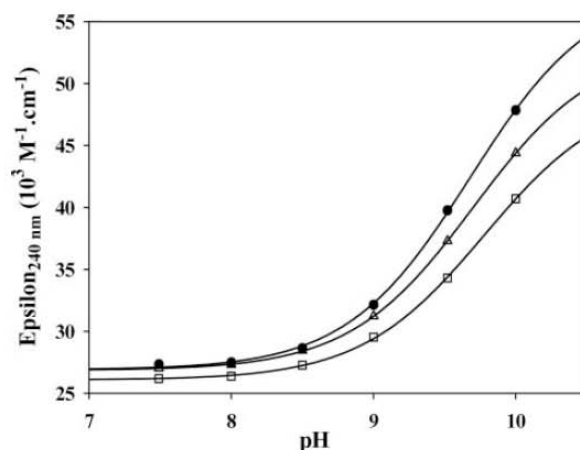


FIGURE 2. pH dependence of the Cys thiol group absorbance properties of wild-type (●), C51S (Δ), and C198S (□) MsrAs. Molecular absorption coefficients at 240 nm were calculated from the absorbance spectra from 300 to 200 nm performed over a pH range of 7 to 10 in polybuffer B. Absorption coefficients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

Y134F, and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs showed strongly decreased  $k_{\text{cat}}$  values, from  $1 \cdot 10^{-3}$  to  $2.5 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  and increased  $K_m$  from 24 to 161 mM.

## Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat

**TABLE 1**

Steady-state and reductase step kinetic parameters of wild-type and mutated MsrAs, with associated  $pK_{app}$

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

<sup>a</sup> Steady-state parameters were deduced from nonlinear regression of initial rates to the Michaelis-Menten relationship (see "Experimental Procedures").

<sup>b</sup> Kinetic parameters of the reductase step were obtained from nonlinear regression of  $k_{obs}$  to Equation 7 (see "Experimental Procedures"), except for E94A and E94D MsrAs. For these two latter substituted MsrAs,  $k_{max}$  and  $K_S$  values correspond to  $k_{cat}$  and  $K_m$  values determined under steady-state conditions (see "Results").

<sup>c</sup> Kinetic parameters,  $k_{max\ opt}$  at optimum pH and  $pK_{app}$  values, were deduced from nonlinear regression of  $k_{obs}$  to Equation 8 (see also Fig. 4).

In the wild type, the rate of the reductase step is largely higher than the  $k_{cat}$  value (1). Therefore, to interpret the eventual kinetic consequences of the substitutions at positions 82, 94, and 134 at the level of the reductase step, it was first necessary to attain this rate. This was determined for E94Q, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F, and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs by following the variation of the Trp-53 fluorescence intensity under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of reductant (1). In that context, it was assumed that the reductase step of the mutated MsrAs is still rate-determining in the process leading to formation of the Msr disulfide bond,<sup>4</sup> as previously shown for the wild type (1). In the case of E94Q, Y82F, and Y134F MsrAs, formation of the disulfide bond led to an increase in the Trp-53 fluorescence emission similar to that described for the wild type, whereas a quenching of the fluorescence was observed for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs. Structural factors responsible for this different behavior remain unknown. For all mutated MsrAs, the variation of the fluorescence signal in function of time is of monoexponential type whatever the AcMetSONHMe concentration. The kinetic parameters  $k_{max}$  and  $K_S$  values are summarized in Table 1. No strong  $K_S$  effect was observed for any of the five mutated MsrAs ( $K_S$  values ranging from 26 to 151 mM). The  $k_{max}$  value for E94Q MsrA is still high compared with that of the wild type and is 14-fold higher than  $k_{cat}$  value, which is indicative of a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step. This is also the case for Y82F and Y134F MsrAs for which the  $k_{max}$  values are 23- and 160-fold higher than  $k_{cat}$  values, respectively. In contrast, drastic effects on  $k_{max}$ , *i.e.* at least  $2 \cdot 10^4$ -fold decrease, were observed for Y82F/Y134F and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs. Moreover,  $k_{max}$  and  $k_{cat}$  values are similar, showing that the reductase step is the rate-limiting step.

The fact that the variation of the Trp-53 fluorescence message is, for unknown reasons, not of monoexponential type for E94A and E94D MsrAs (curve not shown) led us to use another method to attain the kinetics of the reductase step for these two

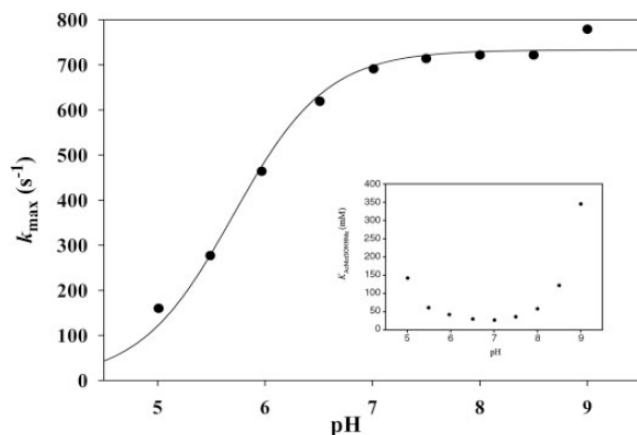
mutated MsrAs. This method, which was already used for the wild type, consists of following the rate of formation of AcMetNHMe and of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of Trx. This was done at a saturating concentration of 300 mM AcMetSONHMe. E94D analysis required the use of a rapid mixing apparatus, whereas E94A study was possible by manual mixing. Formation of 0.9 mol of AcMetNHMe/mol of enzyme was observed for both E94D and E94A MsrAs. Rate constant for AcMetNHMe formation ( $k_{Met}$ ) was  $0.27\ s^{-1}$  and  $2.9 \cdot 10^{-2}\ s^{-1}$  for E94D and E94A MsrAs, respectively. The free thiol content profile fitted to a monoexponential model, with concomitant loss of Cys-51 and Cys-198 thiols, with rate constant ( $k_{SS}$ ) of  $0.31\ s^{-1}$  and  $4.10^{-2}\ s^{-1}$  for E94D and E94A MsrAs, respectively. The fact that  $k_{Met}$ ,  $k_{SS}$ , and  $k_{cat}$  values are similar indicated that the reductase step is rate-limiting for both mutated MsrAs. Therefore, the  $K_m$  value determined under steady-state conditions represents the  $K_S$  value of the reductase step. As observed for the other mutated MsrAs, the  $K_S$  values are similar to that of the wild type (see Table 1).

### pH Dependence of the Kinetic Parameters of the MetSO Reductase Step

The kinetic parameters  $k_{max}$  and  $K_S$  of the reductase step for the wild type were determined at different pH values by fluorescence stopped-flow spectroscopy under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of Trx. The pH- $k_{max}$  plot, presented in Fig. 3, exhibits a monosigmoidal profile governed by the contribution of an ionizable group of  $pK_{app}\ 5.7 \pm 0.1$  that must be deprotonated for efficient MetSO reduction. This ionized species is characterized by a  $k_{max\ opt}$  value of  $730\ s^{-1}$ .

For E94Q, Y82F, Y134F, Y82F/Y134F, and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs, the rate of the reductase step was also measured by fluorescence spectroscopy under single turnover conditions, either on a stopped-flow apparatus or a conventional spectrofluorometer, depending on the value of the rate. In the case of E94A and E94D MsrAs, the rate of the reductase step was determined under steady-state conditions. For each substituted MsrA, the observed rate constant  $k_{obs}$  of the MetSO reductase step was measured, at each pH, with only one concentration of AcMetSONHMe (300 mM). This concentration was shown to be saturating over the pH range investigated except for E94Q MsrA (data not shown). Therefore,  $k_{obs}$  value can be considered

<sup>4</sup> For each Glu-94-mutated MsrA, the rate constant of the reductase step was shown to be rate-determining in the two-step process leading to the formation of the disulfide bond by following the rate of AcMetNHMe and disulfide bond formation directly by acid-quenching of the reaction, followed by quantification of product and MsrA remaining free thiols (see "Results" for E94A and E94D MsrAs, data not shown for E94Q). For each Tyr-substituted MsrA, the rate of the reductase step was shown to be too fast at pH 8 to allow direct determination of the rate of AcMetNHMe and disulfide bond formation (data not shown).

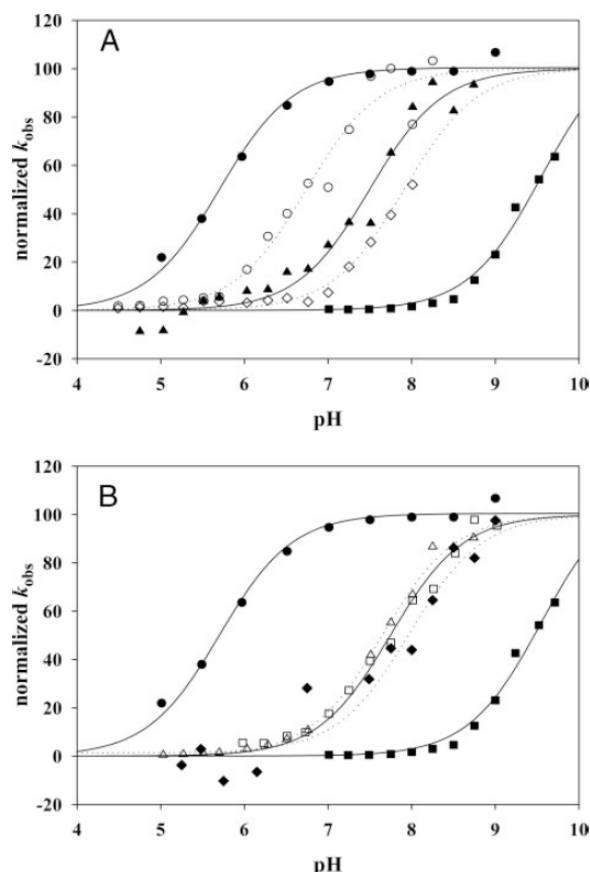


**FIGURE 3. pH dependence of the reductase step rate constant  $k_{\max}$  and AcMetSONHMe affinity constant  $K_s$  (inset) of wild-type MsrA.** Kinetics of MsrA fluorescence variation were followed after excitation at 284 nm on a stopped-flow apparatus by rapidly mixing 10  $\mu\text{M}$  enzyme and various concentrations of AcMetSONHMe (50–800 mM) at various pH values in polybuffer B. It should be noted that, below pH 5.5, disulfide bond formation is not accompanied by an increase but by a quenching of Trp-53 fluorescence emission for an unknown reason (curve not shown). For each pH, experimental  $k_{\text{obs}}$  data obtained at each substrate concentration were analyzed by nonlinear regression against Equation 7 to obtain  $k_{\max}$  and  $K_s$  values (see also “Experimental Procedures”).  $k_{\max}$  values (●) were plotted against pH and fitted to Equation 8 (solid line) leading to a  $k_{\max \text{ opt}}$  value of  $730 \text{ s}^{-1}$  and  $\text{p}K_{\text{app}}$  value of 5.7.

as a  $k_{\max}$  value. In the case of E94Q MsrA, 300 mM AcMetSONHMe was not saturating at  $\text{pH} > 8$ , and consequently  $k_{\text{obs}}$  values were determined only up to pH 8. The  $k_{\text{obs}}$  profile remains monosigmoidal for all substituted MsrAs, with increasing  $k_{\text{obs}}$  value with increasing pH. Data fitted to a single  $\text{p}K_a$  model (see Fig. 4). E94D MsrA has a  $\text{p}K_{\text{app}}$  of 6.7 with a  $k_{\max \text{ opt}}$  value of  $0.19 \text{ s}^{-1}$ . E94A, E94Q, Y82F, Y134F, and Y82F/Y134F MsrAs displayed a more pronounced  $\text{p}K_{\text{app}}$  shift, with values ranging from 7.5 to 8.0 and with  $k_{\max \text{ opt}}$  values of  $2 \cdot 10^{-2}$ , 28, 46, 380, and  $7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively (see Fig. 4 and Table 1). It is noteworthy that substitutions of Tyr-82 or Tyr-134 induced a similar  $\text{p}K_{\text{app}}$  shift to 7.6 and that double substitution of these two TyrS led to a higher shift to 8.0. The triple substituted MsrA Y82F/Y134F/E94Q displayed the most highly shifted  $\text{p}K_{\text{app}}$  with a value of 9.5 and the lowest  $k_{\max \text{ opt}}$  value of  $1.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (see Fig. 4 and Table 1).

## DISCUSSION

The methionine sulfoxide reductase step of the MsrA mechanism was previously shown to be very fast (1) and postulated to imply the formation of a sulfurane transition state of bipyramidal geometry on the basis of the theoretical chemistry study (6). According to these data, the reductase step should imply 1) the formation of an enzyme-substrate complex, 2) the deprotonation of Cys-51, 3) the involvement of an acid catalyst to protonate the sulfoxide substrate and favor the sulfurane-type transition state formation, and 4) the rearrangement of the sulfurane-type transition state to obtain Met and sulfenic acid. The invariant residues Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 are correctly positioned in the three available x-ray MsrA structures to interact via H-bond with a water molecule that is located at the place of the oxygen of the sulfoxide function (Fig. 5). Based on these structural features, a reasonable hypothesis supports Glu-94 as the presum-



**FIGURE 4. pH dependence of the reductase step rate constant  $k_{\max}$  of wild-type and substituted MsrAs.** For wild-type MsrA, refer to Fig. 3. For all substituted MsrAs, the rate of the reductase step was determined with 300 mM AcMetSONHMe at various pH values in polybuffer B. The independence of the rate constant on AcMetSONHMe concentration was verified at two extreme pH values (around 5 and 9). For E94Q, Y82F, and Y134F MsrAs, the increase of Trp-53 fluorescence intensity was followed after excitation at 284 nm on a stopped-flow apparatus. For Y82F/Y134F and E94Q/Y82F/Y134F MsrAs, variation of fluorescence emission was recorded on a spectrofluorometer with excitation and emission wavelength set at 284 and 340 nm, respectively. For E94A and E94D MsrAs, the reductase step rate constant was followed using the Trx-recycling system. Experimental  $k_{\text{obs}}$  data obtained at each pH were analyzed by nonlinear regression against Equation 8 to obtain  $k_{\max \text{ opt}}$  and  $\text{p}K_{\text{app}}$  values (see also “Experimental Procedures”).  $k_{\max \text{ opt}}$  and  $\text{p}K_{\text{app}}$  values are presented in Table 1. Experimental  $k_{\text{obs}}$  data were normalized, taking  $k_{\max \text{ opt}}$  value as 100% for each enzyme, for the clarity of the representation. Symbols represent normalized data, and lines represent the fit. Panel A, wild type (●, solid line); E94A MsrA (▲, solid line); E94D MsrA (○, dotted line); E94Q MsrA (◇, dotted line); E94Q/Y82F/Y134F MsrA (■, solid line). Panel B, wild type (●, solid line); Y82F MsrA (□, solid line); Y134F MsrA (Δ, dotted line); Y82F/Y134F MsrA (◆, dotted line); E94Q/Y82F/Y134F MsrA (■, solid line).

ably required acid catalyst. This proposition is reinforced by the observation that no other acidic residue is present in the close proximity of the sulfoxide function. The two phenolic side chains of Tyr-82 and Tyr-134 could be involved in substrate binding (*i.e.* an affinity contribution) and/or in substrate positioning and transition state stabilization (*i.e.* a chemical catalysis contribution).

**Cys-51 Activation within the Active Site**—In the free wild-type enzyme, 2-PDS titration and direct thiolate UV absorbance titration revealed a single  $\text{p}K_{\text{app}} \sim 9.5$  for both Cys-51 and -198. Moreover, the 2PDS chemical reactivity of MsrA Cys is

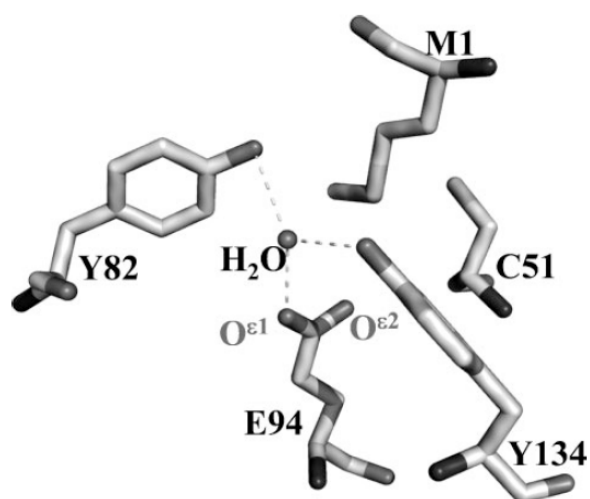


FIGURE 5. Schematic representation of *M. tuberculosis* MsrA active site containing methionine 1 (M1) from a neighboring monomer (from Ref. 3). Residues Cys-51, Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 are shown together with bound M1. The water molecule is also represented in the active site by a sphere. The dashed lines represent the hydrogen bonds observed between residues and the water molecule. Monitored distances between atoms are:  $d(O^{\epsilon 1}_{E94}-O_{H_2O}) = 2.52 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\epsilon 2}_{E94}-S^{\delta}_{M1}) = 3.43 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\epsilon 2}_{E94}-S^{\gamma}_{C51}) = 5.06 \text{ \AA}$ ;  $d(S^{\gamma}_{C51}-S^{\delta}_{M1}) = 3.47 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\zeta}_{Y82}-O_{H_2O}) = 2.88 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\zeta}_{Y82}-S^{\delta}_{M1}) = 3.57 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\zeta}_{Y134}-O_{H_2O}) = 2.75 \text{ \AA}$ ;  $d(O_{H_2O}-S^{\delta}_{M1}) = 3.33 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\zeta}_{Y82}-S^{\gamma}_{C51}) = 6.61 \text{ \AA}$ ;  $d(O^{\zeta}_{Y134}-S^{\gamma}_{C51}) = 7.16 \text{ \AA}$ .

comparable with that of the thiolate of glutathione (10), arguing for two Cys residues not activated but accessible in the free wild-type MsrA. The fact that 2PDS mediates oxidation of reduced MsrA to its disulfide state with simultaneous liberation of two moles of pyridine-2-thione/enzyme, via an apparent one-step kinetic mechanism, can be explained by a mechanism reminiscent of that of the Msr mechanism. First, the rate-limiting reaction between one Cys and one molecule of 2PDS would lead to a transient mixed disulfide. This disulfide would be rapidly attacked by the second Cys of the enzyme, leading to the disulfide-oxidized MsrA. Such a mechanism would imply that the measured  $pK_{app}$  only reflects ionization of the first Cys. It is tempting to assign Cys-51 as this “2-PDS-reactive” Cys. 2-PDS titration of C51S and C198S MsrAs supports this assignment, as Cys-51 (C198S MsrA) exhibits a stronger reactivity than Cys-198 (C51S MsrA) between pH 8 and 9 (see Fig. 1B). The measured  $pK_{app}$  values around 9.5 for Cys-51 and Cys-198, respectively, are significantly higher than the value of 8.8 for the model Cys of glutathione (10). As MsrA function is supposed to be widely used during oxidative stress burst, high  $pK_a$  could serve as a protection against oxidative modification of both Cys by restricting their reactivity toward reactive oxygen or nitrogen species. Stabilization of the thiol state of Cys-51 could be provided by the hydrophobic character of the active site.

As stated above, Cys-51 has to be deprotonated to allow its efficient attack on the sulfoxide function. The observed high rate constant of the reductase step at pH 8.0 implies a large, mandatory shift in Cys-51  $pK_a$ , from near 9.5 to at least somewhere below 7. The pH dependence of  $k_{max}$  displays a single  $pK_{app}$  of 5.7, the rate of sulfoxide reduction increasing with pH. Moreover, the E94Q and Y82F/Y134F/E94Q MsrAs still show

the contribution of a single  $pK$  of 8 and 9.5, respectively. Such results support the attribution of the  $pK_{app}$  of 5.7 to Cys-51 and not to Glu-94. Thus, formation of the MsrA-AcMetSONHMe complex provokes an activation of Cys-51 by decreasing its  $pK_{app}$  by 3.8 units.

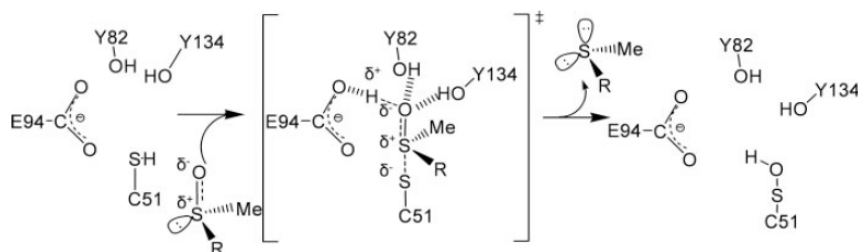
*Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 Contributions in the Reductase Step*—Substitution of Glu-94 by Ala or Asp drastically decreased the  $k_{max\ opt}$  rate of the reductase step of the MsrA mechanism by factors of  $3.6 \cdot 10^4$  and  $3.8 \cdot 10^3$ , respectively, with no significant  $K_S$  effect at pH 8 and caused the shift of the rate-limiting step from the Trx-recycling process to the sulfoxide reduction step. These data support the implication of Glu-94 in the catalysis of sulfoxide reduction, but not in substrate binding, and identify its side chain as a critical catalyst. However, the kinetic parameters of the reductase step obtained with E94Q MsrA revealed a rather minor  $k_{max\ opt}$  decrease of only 26-fold compared with that of the wild type. As Glu-94 cannot be a proton donor, it is tempting to conclude that Glu-94 does not directly play a role as general acid catalyst but likely stabilizes, via H-bonding, the sulfurane transition state leading to sulfenic acid formation (see the last paragraph under “Discussion”). Indeed, substitution of Glu by Gln retains an H-bonding ability. This is reinforced by the fact that no  $pK_{app}$  of an acidic catalyst is observed on the pH- $k_{max}$  profile of the wild-type MsrA. In addition to this effect on the rate constant of the sulfoxide reduction, substitution of Glu-94 induced an increase of the  $pK_{app}$  governing this step and assigned to Cys-51. Thus, Glu-94 is, directly or not, also involved in the activation of Cys-51 upon substrate binding.

Substitution of Tyr-82 and Tyr-134, or both, by Phe did not affect  $K_S$  values. Moreover, the  $k_{max\ opt}$  constant of the sulfoxide reduction was slightly decreased by the absence of one of the phenolic hydroxyls, in particular of Tyr-134, but drastically decreased when both were removed. The fact that substitutions of both Tyrs is required to observe a strong decrease of  $k_{max\ opt}$  suggests that in single Tyr-substituted MsrA the remaining Tyr in the presence of Glu-94 compensates the absence of the second phenolic hydroxyl. Similarly to Glu-94, substitution of Tyr-82 and/or Tyr-134 also leads to an increase of the  $pK_{app}$  governing this step, assigned to Cys-51. Importantly, in contrast to the catalytic role of Tyr-82 and Tyr-134, which can be fairly well assumed by only one Tyr, Cys-51 activation is more sensitive to the absence of one of the two phenolic side chains.

Taken together, these data strongly suggest that Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134, in addition to their role in favoring the polarized form of the sulfoxide function of the substrate bound, are involved in the stabilization of the sulfurane transition state (see the last paragraph under “Discussion”) that precedes the sulfenic acid formation. They also participate, directly or indirectly, in the Cys-51 activation upon formation of the MsrA-substrate complex. As a confirmation, the triple substituted MsrA Y82F/Y134F/E94Q displays the most highly shifted  $pK_{app}$  with a value of 9.5, close to the  $pK_{app}$  of Cys-51 determined in the free enzyme, and the biggest reduction of  $k_{max\ opt}$  by a factor of  $6.6 \cdot 10^4$  compared with the wild type.

*Structure/Function Relationships within the MsrA Active Site*—The available x-ray structure of MsrA from *M. tuberculosis* in complex with a Met from a neighboring monomer pro-





**SCHEME 2. Schematic representation of the catalytic mechanism of the MetSO reductase step of MsrA from *N. meningitidis*.** The four essential functional groups of Cys-51, Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 are represented.  $RSOCH_3$  and  $RSCH_3$  represent MetSO and Met, respectively. The substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized. A transition state (or intermediate) of sulfurane type is then likely formed as proposed from theoretical computations (6). The nature of the rearrangement that leads to formation of the sulfenic acid intermediate and of Met remains to be determined. See "Discussion" for more details on the mechanism.

vides a good model of the substrate-MsrA complex (3). Inspection of the structure shows that no residue bearing a positively charged side chain is present in close proximity to Cys-51 (Fig. 5). Moreover, on one hand the distance between the carboxylate of Glu-94 and the sulfur atom of Cys-51 (5.1 Å) is by far too large to allow a direct interaction between these two functions. On the other hand, the sulfur atom of the Met residue is positioned between one oxygen atom of the carboxylate and the thiol function of Cys-51. Thus, stabilization of the thiolate form of Cys-51 by the protonated form of Glu-94 is rather unlikely. The direct implication of Tyr-82 and Tyr-134 is also unlikely, as the distance between their hydroxyl groups and the thiol of Cys-51 is too large (at least 6.6 Å, Fig. 5). Therefore, the decrease in  $pK_{app}$  of 3.7 units of Cys-51 in the Michaelis complex is likely due to a substrate-assisted mechanism. In the MsrA-substrate complex, the polarization of the sulfur-oxygen bond should be favored by the presence of the side chains of Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134. Such a polarization was already described for the sulfur-oxygen bond of the  $Me_2SO$  by using theoretical chemistry method (11–13) and experimental approaches that gave a dipole moment of 3.96 D (14, 15). The close proximity of a positive, or a partially positive, charge on the sulfur of the sulfoxide function near the thiol group of Cys-51 (3.4 Å between the sulfur of Met and the thiol of Cys-51 in the *M. tuberculosis* binary complex MsrA-Met, Fig. 5) likely stabilizes the thiolate form of Cys-51 and thus is believed to be the driving force that favors the shift of the Cys-51  $pK_a$  from 9.5 to 5.7 upon substrate binding. In the case of the E94Q MsrA, the same scenario occurs but the polarization of the sulfur-oxygen bond could be lesser developed, leading to a smaller positive partial charge on the sulfur atom and therefore to the shift of the Cys-51  $pK_{app}$  from 5.7 to 8. It is likely that the proton initially borne by Cys-51 is transferred to the oxygen of the sulfoxide function via a concerted mechanism concomitantly with the attack of the thiolate of Cys-51 on the sulfoxide sulfur atom, leading to the formation of the sulfurane-type transition state. In this context, a proton shift that transfers the proton coming from the thiol of Cys-51 to the oxygen of the sulfoxide must occur. It is seductive to postulate that this proton transfer could be catalyzed via Glu-94. However, as already mentioned, in the structure of *M. tuberculosis* MsrA, the distance of 5.1 Å between the thiol of Cys-51 and the nearest oxygen of Glu-94 is too far for a direct interaction unless a shortening of this dis-

tance occurs or a water molecule is transiently present between the carboxylate and the thiol.

*Proposed Scenario for the Sulfoxide Reductase Step of the MsrA Mechanism*—MetSO likely binds to the active site of MsrA with its sulfoxide largely in its polarized form. The spatial proximity between the sulfur of the sulfoxide function and the thiol of Cys-51 leads to a stabilization of the thiolate form due to the presence of the positive, or partially positive, charge borne by the sulfur. Concomitantly to the sub-

strate binding, the proton of Cys-51 is transferred to the oxygen of the sulfoxide function and the positively, or partially charged, sulfur of MetSO undergoes a nucleophilic attack of the Cys-51 thiolate leading to the formation of a sulfurane transition state of trigonal bipyramidal geometry, as suggested from quantum chemistry calculations (6) (see Scheme 2). How the rearrangement occurs for forming the sulfenic acid intermediate and Met remains to be determined. The mechanism is likely concerted rather than stepwise. In this scenario, Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 have two roles. First, they favor the binding of the polarized form of the sulfoxide function that is the form that is also present in solution. Second, they stabilize the sulfurane transition state. In that context, Glu-94 has the most important contribution and probably intervenes under its carboxylate form, whereas Tyr-82 and Tyr-134 form a hydrogen bond with the two lone pairs of the hydroxyl group.

However, questions remain to be addressed on the mechanism that allows the formation of a sulfenic acid of tetrahedral geometry from a sulfurane transition state of trigonal bipyramidal geometry. Indeed, recent theoretical study of the reduction mechanism of  $Me_2SO$  by thiols supports the formation of a sulfurane transition state with the sulfur of the thiol and the OH group in apical position and the two methyl groups and the lone pair in equatorial position (6). Such a geometry is, however, not compatible with a direct shift of the OH group to the sulfur atom of the thiol. A possibility that has also been considered is the formation of a transition state with the sulfur of the thiol into equatorial position and the OH group into apical position. The S–S–O bond angle is near 90°. Such a geometry necessitates higher activation energy to attain the transition state (~20 kcal/mol) that leads to shift of the OH group to the thiol group (6). An alternative that has also been proposed is to form a transition state of epoxide type. In that case, the geometry is more favorable to a shift of the OH group to the thiol group but the penalty in terms of energy of activation is higher (~40 kcal/mol) (6). Another question concerns the way by which the proton of the sulfur of Cys-51 is transferred to the sulfoxide function. An evident candidate is Glu-94. However, as already pointed out, the distance between Cys-51 and Glu-94 is at least 5 Å. In this context, the studies that are underway by theoretical approaches and taking into account the structure of the MsrA active site will be of particular interest.

---

*Acknowledgments—We thank Prof. W. W. Cleland, Dr. M. F. Ruiz-Lopez, and Dr. G. Monard for helpful discussions. We thank Dr. F. Barras for the kind gift of the BE002 E. coli strain, C. Gauthier and A. Kriznik for their very efficient technical help and AcMetSONHMe synthesis, Dr. G. Chevreux and Dr. S. Sanglier-Cianferani for mass spectrometry analysis, and Dr. S. Sonkaria for reviewing the manuscript.*

---

#### REFERENCES

1. Antoine, M., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45352–45357
2. Olry, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *Biochemistry* **43**, 11616–11622
3. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4119–4126
4. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure Fold Des.* **8**, 1167–1178
5. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307–13312
6. Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2006) *J. Phys. Chem. A* **110**, 7628–7636
7. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022
8. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913
9. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231–238
10. Marchal, S., and Branlant, G. (1999) *Biochemistry* **38**, 12950–12958
11. Dobado, J. A., Martinez-Garcia, H., Molina, J. M., and Sundberg, M. R. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3156–3164
12. Stener, M., and Calligaris, M. (2000) *J. Mol. Struct. (Theochem.)* **497**, 91–104
13. Mrazkova, E., and Hobza, P. (2003) *J. Phys. Chem. A* **107**, 1032–1039
14. Cotton, F. A., and Francis, R. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2986–2991
15. Dreizler, H., and Dendl, G. (1964) *Z. Naturforsch.* **19a**, 512–514

## **I.2 Résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde**

### **I.2.1 Résumé des résultats**

Pour les résidus Phe52 et Trp53, les variants F52L, W53A et W53F ont été générés, d'autres variants en position 52 tels que F52A n'ayant pu être produits. Les paramètres cinétiques de l'étape réductase obtenus pour les variants F52L et W53F montrent une diminution importante de la constante de vitesse de deuxième ordre ( $k_2$  *AcMetSONHMe*), respectivement d'un facteur 745 et 1000, reflétant à la fois une diminution de l'affinité apparente vis-à-vis du substrat ( $K_S$ ) et une diminution de la constante de vitesse maximale de l'étape réductase ( $k_{obs\ max}$ ). Dans le cas du variant W53A, les résultats obtenus à l'état stationnaire montrent une diminution importante de l'affinité apparente (augmentation d'un facteur 1300 de la valeur du  $K_M$ ) avec une diminution du  $k_{cat}$  d'un facteur 10. Pour les résidus His186 et Tyr189, deux types de variants ont été générés : d'une part les variants H186N et Y189F, qui conservent la possibilité d'interagir avec le noyau indole du résidu Trp53 *via* respectivement une liaison H et une interaction de type « stacking », et d'autre part les variants H186A et Y189A incapables d'interagir avec le Trp53. Pour les variants H186A et Y189A, une diminution du  $k_2$  *AcMetSONHMe* est observée, reflétant une diminution de l'affinité apparente vis-à-vis du substrat ( $K_S$ ) ainsi qu'une diminution de la constante de vitesse de l'étape réductase ( $k_{obs\ max}$ ). Les valeurs de  $K_S$ ,  $k_{obs\ max}$  et  $k_2$  *AcMetSONHMe* obtenues pour les variants H186N et Y189F sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour la MsrA sauvage.

Pour les résidus Asp129 et Tyr197, les paramètres cinétiques des variants D129A, D129N, Y197A et Y197F ont été déterminés à la fois à l'état stationnaire et pour l'étape réductase. La valeur du  $k_2$  *AcMetSONHMe* de l'étape réductase est diminuée pour tous les variants générés (facteur variant de 3 à 37), reflétant essentiellement un effet sur l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat. Les paramètres cinétiques de ces variants ont également été déterminés avec la MetSO ou le DMSO comme substrat.

L'ensemble de ces résultats montre l'existence de deux sites de reconnaissance du substrat sulfoxyde dans les MsrA. D'une part, une poche hydrophobe qui joue un rôle majeur, constituée des deux résidus Phe52 et Trp53, le noyau indole de ce dernier étant positionné de façon adéquate par des interactions spécifiques avec les chaînes latérales des résidus His186 et Tyr189, et d'autre part un site de reconnaissance de la chaîne principale du substrat constitué des chaînes latérales des résidus Asp129 et Tyr197.

***Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat***

I.2.2 Publication 2

Adeline GAND, Mathias ANTOINE, Sandrine BOSCHI-MULLER et Guy BRANLANT  
(2007) Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of Methionine Sulfoxide Reductase A. *J. Biol. Chem.*, 282, 20484-91.

Pages 77 à 84

## Characterization of the Amino Acids Involved in Substrate Specificity of Methionine Sulfoxide Reductase A\*

Received for publication, March 19, 2007, and in revised form, May 9, 2007. Published, JBC Papers in Press, May 11, 2007, DOI 10.1074/jbc.M702350200

Adeline Gand, Mathias Antoine, Sandrine Boschi-Muller, and Guy Branlant<sup>1</sup>

From the Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Unité Mixte de Recherche CNRS-UHP 7567, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld. des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Methionine sulfoxide reductases (Msrs) are ubiquitous enzymes that catalyze the thioredoxin-dependent reduction of methionine sulfoxide (MetSO) back to methionine. *In vivo*, Msrs are essential in protecting cells against oxidative damages on proteins and in the virulence of some bacteria. There exists two structurally unrelated classes of Msrs. MsrAs are stereo-specific toward the *S* epimer on the sulfur of the sulfoxide, whereas MsrBs are specific toward the *R* isomer. Both classes of Msrs display a similar catalytic mechanism of sulfoxide reduction by thiols via the sulfenic acid chemistry and a better affinity for protein-bound MetSO than for free MetSO. Recently, the role of the amino acids implicated in the catalysis of the reductase step of *Neisseria meningitidis* MsrA was determined. In the present study, the invariant amino acids potentially involved in substrate binding, *i.e.* Phe-52, Trp-53, Asp-129, His-186, Tyr-189, and Tyr-197, were substituted. The catalytic parameters under steady-state conditions and of the reductase step of the mutated MsrAs were determined and compared with those of the wild type. Altogether, the results support the presence of at least two binding subsites. The first one, whose contribution is major in the efficiency of the reductase step and in which the  $\epsilon$ -methyl group of MetSO binds, is the hydrophobic pocket formed by Phe-52 and Trp-53, the position of the indole ring being stabilized by interactions with His-186 and Tyr-189. The second subsite composed of Asp-129 and Tyr-197 contributes to the binding of the main chain of the substrate but to a lesser extent.

Methionine is one of the amino acids in proteins that is the most sensitive to reactive oxygen species (1). It is converted into methionine sulfoxide (MetSO),<sup>2</sup> the function of which is a mixture of two epimers at the sulfur atom, *i.e.* Met-*S*-SO and Met-*R*-SO (2). Formation of MetSO may impair the biological function of the oxidized proteins, depending on the location of the MetSO in the protein. There exist two structurally unrelated

classes of methionine sulfoxide reductases (Msrs) in most organisms, called MsrA and MsrB, which selectively reduce free or protein-bound Met-*S*-SO and Met-*R*-SO, respectively. Msrs are described to exert various biological functions *in vivo* (3–5). They can (i) repair oxidized proteins, and thus, may regulate their function, (ii) play an antioxidant role as oxidation of surface methionine residues is considered as a mechanism that scavenges reactive oxygen species without modification of the properties of proteins, and (iii) play a role in the virulence of some bacteria.

The catalytic mechanism of both classes of Msrs characterized to date (6–9) is composed of three steps including: 1) a reductase step consisting of a nucleophilic attack of the catalytic Cys residue on the sulfur atom of the sulfoxide substrate that leads to formation of a sulfenic acid intermediate and release of 1 mol of Met/mol of enzyme, 2) formation of an intradisulfide bond between the catalytic Cys and a recycling Cys with a concomitant release of 1 mol of water, and 3) reduction of the Msr disulfide bond by thioredoxin (Trx) that leads to regeneration of the reduced form of Msr and to formation of oxidized Trx. The catalytic mechanism is in agreement with the kinetic mechanism, which was shown to be of ping-pong type for both classes of Msrs (9, 10). Moreover, for both classes of Msrs, the overall rate-limiting step is associated with the Trx-recycling process, whereas the rate of formation of the intradisulfide bond is governed by that of the reductase step, the rate of which is fast (11, 12).

A theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols has been recently investigated by quantum chemistry calculations, which supports formation of a sulfurane intermediate (13). The amino acids involved in the catalysis of the reductase step of *Neisseria meningitidis* MsrA have also recently been characterized by molecular enzymology approaches (14). The invariant Glu-94,<sup>3</sup> and to a lesser extent Tyr-82 and Tyr-134, were shown to play a major role in the stabilization of the transition state of sulfurane type and indirectly in the decrease of the  $pK_{app}$  of the catalytic Cys-51. A scenario was proposed in which the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized via interactions with Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 and participates via the positive or partially positive charge borne by the sulfur of the sulfoxide to the stabilization of the catalytic Cys.

The three-dimensional structures of the MsrAs from *Escherichia coli*, *Bos taurus*, *Mycobacterium tuberculosis*, and poplar

\* This work was supported by grants from the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Federatif de Recherche 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC Number 5436), and the French Ministry of Research (ACI BCMS047) and by financial support from the French Ministry of Research (to M. A. and A. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-83-68-43-04; Fax: 33-3-83-68-43-07; E-mail: Guy.Branlant@maem.uhp-nancy.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: MetSO, methionine sulfoxide; AcMetSONHMe, Ac-L-Met-*R,S*-SO-NHMe; AcMetNHMe, Ac-L-Met-NHMe; Msr, methionine sulfoxide reductase; Trx, thioredoxin.

<sup>3</sup> In this report, MsrA amino acid numbering is based on *E. coli* MsrA sequence (9).

have been recently obtained by x-ray crystallography (15–18). The MsrA models describe a single-domain protein composed of a central core around which the long N- and C-terminal coils seem to wind. The overall fold is of the mixed  $\alpha/\beta$  type, with the core containing a two-layer sandwich,  $\alpha$ - $\beta$  plait motif. The active site can be represented as an opened basin easily accessible to the MetSO substrate in which the catalytic Cys-51 is situated at the entrance of the first  $\alpha$ -helix of the central core. In all the structures, the active site is occupied by a molecule that is covalently or noncovalently bound to the Cys-51. In particular, in the *E. coli* MsrA, a dimethyl arsenate is covalently bound, whereas in the *M. tuberculosis* MsrA, a methionine residue (Met-1) from a neighboring monomer occupies the active site. In both cases, a water molecule is present, the position of which can mimic the oxygen atom of the sulfoxide function of the substrate. One of the methyl groups of the dimethyl arsenate and the  $\epsilon$ -methyl group of Met-1 are bound to a hydrophobic pocket formed by invariant Phe-52 and Trp-53 residues. The Trp-53 indole ring is in interactions with invariant His-186 and Tyr-189 residues, whereas invariant Asp-129 and Tyr-197 residues are in a position to interact with the NH main chain of the Met-1 that occupies the active site of the *M. tuberculosis* MsrA (see Fig. 1 and see “Results and Discussion” under the paragraph “Rationale for the Substitutions”).

In view of this information, it was reasonable to postulate that Phe-52, Trp-53, His-186, Tyr-189, directly or indirectly, and Asp-129 and Tyr-197 residues are involved in the binding of the MetSO substrate via the  $\epsilon$ -methyl group and the main chain, respectively. In the present study, all these residues of MsrA from *N. meningitidis* were substituted to validate their role. The catalytic parameters under steady-state conditions and of the reductase step of the mutated MsrAs were determined and compared with those of the wild type. Altogether, the results support the presence of at least two subsites involved in substrate binding. The first one, whose contribution is major, is the hydrophobic pocket formed by the side chains of invariant Phe-52 and Trp-53, the position of the latter being stabilized by interactions with His-186 and Tyr-189. The second subsite is composed of the side chains of invariant residues Asp-129 and Tyr-197.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Site-directed Mutagenesis, Production, and Purification of Mutated *N. meningitidis* MsrAs**—The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* MsrA productions was BE002 (MG1655 msrA::specW, msrB::a3kana), transformed with plasmid pSKPILBmsrA containing only the coding sequence of MsrA from *pilB*, under the *lac* promoter (7). The BE002 strain was kindly provided by Dr F. Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli*, and thus, avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* MsrA by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications were realized as described previously (11). Mutated MsrAs were pure, as verified by electrophoresis on a 12.5% SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses.

Enzymes were stored as described previously. The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficient at 280 nm of  $26,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  for all mutated MsrAs except W53A and W53F MsrAs, which corresponded to an extinction coefficient of  $20,480 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Steady-state MsrA Kinetics in the Presence of the Trx-recycling System**—Steady-state kinetic parameters were determined with the Trx reductase recycling system (*E. coli* Trx reductase (1.2  $\mu\text{M}$ ), NADPH (0.3 mM)) with saturating concentration of *E. coli* Trx (100  $\mu\text{M}$ ) and by varying the concentrations of AcMetSONHMe. Initial rate measurements were carried out at 25 °C in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. Initial rate data were fit to the Michaelis-Menten relationship using least squares analysis to determine  $k_{\text{cat}}$  and  $K_m$  for AcMetSONHMe. *E. coli* Trx1 and Trx reductase were prepared following experimental procedures already published (19, 20). Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe was prepared and purified as described previously (12).

**Fluorescence Properties of Mutated MsrAs**—The fluorescence excitation and emission spectra of mutated MsrAs, in their reduced and Cys-51/Cys-198 disulfide states, were recorded on an fx spectrofluorometer (SAFAS) thermostated at 25 °C in buffer A with 10  $\mu\text{M}$  of each protein, as described previously (11). For the determination of  $\lambda_{\text{max}}$  of the emission spectrum and of the fluorescence intensity at  $\lambda_{\text{max}}$ , the excitation wavelength was 295 nm, and the emission was measured from 300 to 450 nm using a 10-nm band-pass for excitation and emission.

**Determination of the Rate of AcMetNHMe Formation by Single Turnover Quenched-flow Experiments for W53F MsrA**—Quenched-flow measurements were carried out at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for double mixing and adapted to recover the quenched samples, as described previously (11). The apparatus operated in a pulsed mode. Under the conditions used, a minimum aging time of about 25–40 ms was determined. Equal volumes (57.5  $\mu\text{l}$ ) of a solution containing 550  $\mu\text{M}$  of W53F MsrA in buffer A and a solution containing AcMetSONHMe in buffer A were mixed in the aging loop. The mixture was then allowed to react for the desired time before being mixed with 115  $\mu\text{l}$  of a quenched aqueous solution containing 2% of trifluoroacetic acid. Quenched samples were collected in a 200- $\mu\text{l}$  loop. For each aging time, four shots were done, and the four corresponding quenched samples were pooled in a volume of 700  $\mu\text{l}$  and then analyzed.

After centrifugation, AcMetNHMe quantification in the resulting supernatant was carried out by reverse phase chromatography; 100  $\mu\text{l}$  were injected onto a  $4.6 \times 250$ -mm Atlantis dC18 reverse phase column (Waters) on an AKTA explorer system (Amersham Biosciences), equilibrated with  $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$  trifluoroacetic acid. AcMetNHMe was eluted after AcMetSONHMe, with a linear gradient of acetonitrile.

Data were plotted as mol of AcMetNHMe formed per mol of MsrA as a function of time. The rate of AcMetNHMe formation was determined by fitting the curve to the monoexponen-

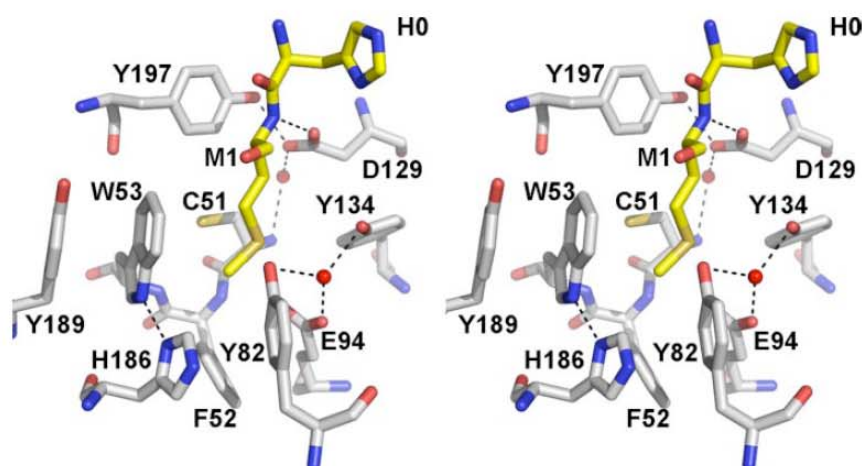


FIGURE 1. Stereo view of the *M. tuberculosis* MsrA active site containing Met-1 from a neighboring monomer (Protein Data Bank code 1NWA (17)). Residues Cys-51, Phe-52, Trp-53, Tyr-82, Glu-94, Tyr-134, His-186, Asp-129, Tyr-189, and Tyr-197 are shown in stick representation (carbon atoms in gray) together with bound His-0–Met-1 dipeptide from a neighboring monomer (carbon atoms in yellow). His-0 is part of the N-terminal His<sub>10</sub> tag used to obtain the recombinant *M. tuberculosis* MsrA. Phe-52, Trp-53, and Tyr-82 are located in  $\alpha$ -helix, whereas Glu-94, Tyr-134, and Asp-129 belong to  $\beta$ -strands, and His-186, Tyr-189, and Tyr-197 are located in the C-terminal coil. Two water molecules are also represented by red spheres, and hydrogen bonds are shown as black dashed lines. The figure was generated using the program PyMOL (DeLano Scientific LLC).

tial Equation 1, in which  $a$  represents the fraction of AcMetNHMe formed per mol of MsrA and  $k_{\text{AcMetNHMe}}$ , the rate constant.

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

*Kinetics of the Formation of the Cys-51/Cys-198 MsrA Disulfide Bond in the Absence of Reductant by Single Turnover Stopped-flow Experiment at pH 8*—Kinetics of the Trp-53 fluorescence variation associated with the formation of the Cys-51/Cys-198 disulfide bond were measured for F52L, D129A, D129N, H186A, H186N, Y189A, Y189F, Y197A, and Y197F MsrAs at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for fluorescence measurements, as described previously (11). The excitation wavelength was set at 284 nm, and the emitted light was collected using a 320-nm cutoff filter. One syringe contained MsrA in buffer A (10  $\mu\text{M}$  final concentration after mixing), and the other one contained AcMetSONHMe at various concentrations, *i.e.* up to 200 mM for Y197A and Y197F MsrAs and up to 800 mM for F52L, D129A, D129N, H186A, H186N, Y189A, and Y189F MsrAs in buffer A. An average of at least six runs was recorded for each AcMetSONHMe concentration. Rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential Equation 2, in which  $c$  represents the end point and  $a$  represents the amplitude of the fluorescence increase ( $<0$ ). For all mutated MsrAs, the variation of the fluorescence signal as a function of time was of monoexponential type irrespective of the substrate concentration used.

$$y = ae^{-k_{\text{obs}}t} + c \quad (\text{Eq. 2})$$

When saturating concentrations of AcMetSONHMe were observed (for H186N and Y189F MsrAs), the data were fit to Equation 3 using least square analysis to determine  $k_{\text{obs max}}$  and

$K_S$  for AcMetSONHMe.  $S$  represents the AcMetSONHMe concentration and  $K_S$  the apparent affinity constant.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{obs max}}S}{K_S + S} \quad (\text{Eq. 3})$$

To determine the pseudo-second-order constant ( $k_2$ ) values, subsaturating concentrations of AcMetSONHMe were used, from 1 to 50 mM for F52L, D129A, D129N, H186A, H186N, Y189A, Y197A, and Y197F MsrAs and from 1 to 20 mM for wild-type and Y189F MsrAs. The slope ( $k_2$ ) of the rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) plotted against the substrate concentration was obtained by linear fitting. For D129A, D129N, Y197A, Y197F, and wild-type MsrAs,  $k_2$  values were also determined with subsaturating concentrations of L-Met-*R,S*-SO and dimethyl sulfoxide as a substrate.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Rationale for the Substitutions

As indicated in the Introduction, invariant Phe-52 and Trp-53 form a hydrophobic pocket in which one of the methyl groups of dimethyl arsenate in *E. coli* MsrA and the  $\epsilon$ -methyl group of Met-1 in *M. tuberculosis* MsrA is bound (Fig. 1). Therefore, this strongly supported binding of the  $\epsilon$ -methyl group of MetSO to this pocket. Inspection of the MsrA active sites also shows the existence of (i) a hydrogen bond between the NH group of the Trp-53 indole ring and the N $\delta$  of His-186 (distance of 2.9 Å) and (ii) a stacking of the Trp-53 indole ring with the phenyl ring of Tyr-189, the two aromatic rings being parallel at 3.4 Å from each other. These interactions are likely essential to stabilize the positioning of the indole ring adequate for efficient binding of the MetSO substrate via its  $\epsilon$ -methyl group. Thus, two types of substitutions were performed: 1) those that are expected to significantly perturb the binding of the  $\epsilon$ -methyl of the substrate, either directly (F52L,<sup>4</sup> W53A, and W53F MsrAs) or indirectly (H186A and Y189A MsrAs), and thus, can lead to a  $K_S$  and a  $k_{\text{obs max}}$  effects; and 2) those that conserve the ability to position efficiently the indole ring of Trp-53 (H186N by hydrogen bond via the amide function and Y189F by stacking via the phenyl ring) and therefore are expected to have little effect on the kinetic parameters of the reductase step.

As mentioned in the Introduction, Asp-129 and Tyr-197 were postulated to stabilize the main chain of the substrate. Indeed, the inspection of the *M. tuberculosis* MsrA active site, which is occupied by the Met-1 residue, shows that the carboxylate group of Asp-129 makes two hydrogen bonds: 1) one with

<sup>4</sup> For unknown reasons, it was not possible to produce F52V and F52A MsrAs.

the NH $\alpha$  of Met-1 engaged in a peptidic bond with His-0 and 2) the other with the hydroxyl group of Tyr-197. Moreover, the Tyr-197 phenyl ring also forms a stacking interaction with the peptide bond between His-0 and Met-1. Thus, to determine their role, Asp-129 and Tyr-197 residues were both substituted: 1) by Ala to disrupt all the stabilizing interactions that can exist and 2) by Asn and Phe, respectively, to conserve one putative stabilizing interaction.

**Justification of the Methods Used to Characterize the Properties of the Mutated MsrAs**

As indicated in the Introduction, the rate of the reductase step in MsrA is fast and largely higher than the  $k_{cat}$  value. Therefore, to interpret the consequences of a substitution on the kinetic parameters of the reductase step, it was necessary to attain the rate of the reductase step for each mutated MsrA. For that, we took advantage of the Trp-53 fluorescence emission signal intensity of all the mutated MsrAs, except for W53F MsrA, which varied from the reduced to the oxidized disulfide form. In fact, formation of the disulfide bond led to an increase in the Trp-53 fluorescence emission for D129A, D129N, H186N, Y189F, Y197A, and Y197F MsrAs similarly to that described for the wild type (11), whereas a quenching was observed for F52L, H186A, and Y189A MsrAs, which is due to an increase of the fluorescence intensity of the reduced form of these mutated MsrAs (see below, paragraph “Fluorescence Properties of F52L, H186A/H186N, and Y189A/Y189F MsrAs”). For all mutated MsrAs, the rate of the reductase step was determined under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of reductant as already described for the wild type (11). In that context, we have assumed that the reductase step was still rate-determining in the process, leading to formation of the Msr disulfide bond, as demonstrated previously for the wild type (11). For all mutated MsrAs,  $k_2$  values that are representative of the  $k_{obs\ max}/K_S$  values were determined under subsaturating concentrations of AcMetSONHMe. When saturating concentration of AcMetSONHMe was observed,  $K_S$  and  $k_{obs\ max}$  values were also determined.

In the absence of the fluorescent probe Trp-53, the kinetics of the reductase step for the W53F MsrA was attained by following the rate of formation of AcMetNHMe under single turnover conditions, *i.e.* in the absence of reductant (11). This was done only at two concentrations of AcMetSONHMe (300 and 600 mM) with the use of a rapid mixing apparatus. Formation of  $\sim 0.9$  mol of AcMetNHMe/mol of W53F MsrA was observed for both substrate concentrations.

The kinetic experiments were performed with AcMetSONHMe as a substrate for all mutated MsrAs. The rationale is that the wild-type MsrA was previously shown to exhibit a better affinity for AcMetSONHMe ( $K_S$  value of 55 mM) when compared with MetSO, *i.e.* by a factor of at least 20, in the reductase step (9, 11). Thus, AcMetSONHMe can be considered as a better mimic of MetSO included in proteins when compared with free MetSO. For mutated MsrAs at positions 129 and 197,  $k_2$  values were determined not only with AcMetSONHMe but also with MetSO and Me<sub>2</sub>SO. Indeed, comparison of the  $k_2$  values can provide information

**TABLE 1**  
**Steady-state and reductase step kinetic parameters of wild-type and mutated MsrAs**

Steady-state parameters were deduced from nonlinear regression of initial rates to the Michaelis-Menten relationship.  $k_2$  values of the reductase step were obtained by linear regression of  $k_{obs}$  determined under subsaturating concentration of substrate (see “Experimental Procedures”). It is important to note that the  $K_m$  values have to be divided by 2 and the  $k_2$  values have to be multiplied by 2, taking into account the fact that the *R* isomer of the sulfoxide function is neither a substrate nor an inhibitor of MsrA (7). ND, not determined.

Enzyme	Steady-state		Reductase step ( $k_2$ AcMetSONHMe)
	$k_{cat}$	$K_m$ AcMetSONHMe	
	$s^{-1}$	mM	$mM^{-1}\cdot s^{-1}$
Wild type	$3.4 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.2$	$14.9 \pm 0.9$
F52L	$0.5 \pm 0.1$	$39 \pm 8$	$0.02 \pm 0.01$
W53A	$0.3 \pm 0.1$	$800 \pm 300$	ND
W53F	$0.8 \pm 0.1$	$36 \pm 1$	$0.015^a$
H186A	$2.6 \pm 0.3$	$99 \pm 1$	$0.12 \pm 0.01$
H186N	$3.1 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.9$	$4.5 \pm 0.1$
Y189A	$2.5 \pm 0.2$	$34 \pm 9$	$0.60 \pm 0.02$
Y189F	$1.8 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$	$13.0 \pm 0.5$
D129A	$1.7 \pm 0.3$	$10 \pm 4$	$0.40 \pm 0.01$
D129N	$1.8 \pm 0.1$	$6 \pm 1$	$0.80 \pm 0.01$
Y197A	$1.3 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.3$	$1.90 \pm 0.04$
Y197F	$3.5 \pm 0.3$	$3 \pm 1$	$4.8 \pm 0.3$

<sup>a</sup> The  $k_2$  value was an estimation obtained from only two substrate concentrations (300 and 600 mM, see “Results,” paragraph “Kinetic Properties of F52L and W53F/W53A MsrAs”).

on the structural factors that are responsible for the enhanced affinity of MsrA for AcMetSONHMe.

**Characterization of the amino acids involved in the recognition of the  $\epsilon$ -methyl group of Ac-L-MetSONHMe**

*Kinetic Properties of F52L and W53F/W53A MsrAs*—As shown in Table 1, the substitution of Phe-52 by Leu and Trp-53 by Phe or Ala resulted in a significant increase of the  $K_m$  value for AcMetSONHMe from 60- to 1300-fold, whereas the  $k_{cat}$  value decreased in the range of only 4–11-fold. Under single turnover conditions, no saturating kinetic effects with respect to AcMetSONHMe were observed for F52L MsrA up to 800 mM substrate (Fig. 2A). The  $k_{obs}$  value determined at 800 mM substrate was 16-fold higher than the  $k_{cat}$  value for F52L MsrA, indicating a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step. The  $k_2$  value of  $0.02\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$  decreased 745-fold when compared with that of the wild type. For W53F MsrA,  $k_{obs}$  values of 5.2 and  $8.5\ s^{-1}$  for AcMetNHMe formation were determined at 300 and 600 mM AcMetSONHMe, respectively (Fig. 3). These data indicated: 1) a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step and 2) a substrate saturating effect not yet attained at 600 mM AcMetSONHMe. A  $k_2$  value of  $\sim 0.015\ mM^{-1}\cdot s^{-1}$  can be estimated that is  $\sim 1000$ -fold smaller than the  $k_2$  value of the wild type (Table 1). For both W53F and F52L MsrAs, the  $k_{obs}$  value at a substrate concentration of 600 and 800 mM, respectively, is at least 80-fold lower than the  $k_{obs\ max}$  of the wild type. Therefore, the 750–1000-fold decrease in  $k_2$  reflects both a  $k_{obs\ max}$  effect and a  $K_S$  effect. Therefore, it is probable that substituting Phe for Trp-53 and Leu for Phe-52 disrupts, in part, the hydrophobic pocket, and as a consequence, not only decreases the affinity of the substrate by a factor that can be estimated to be at least 20 but also perturbs the positioning of the sulfoxide function relative to that of the catalytic amino acids involved in the sulfoxide reduction. The situation is probably the same and even more pronounced



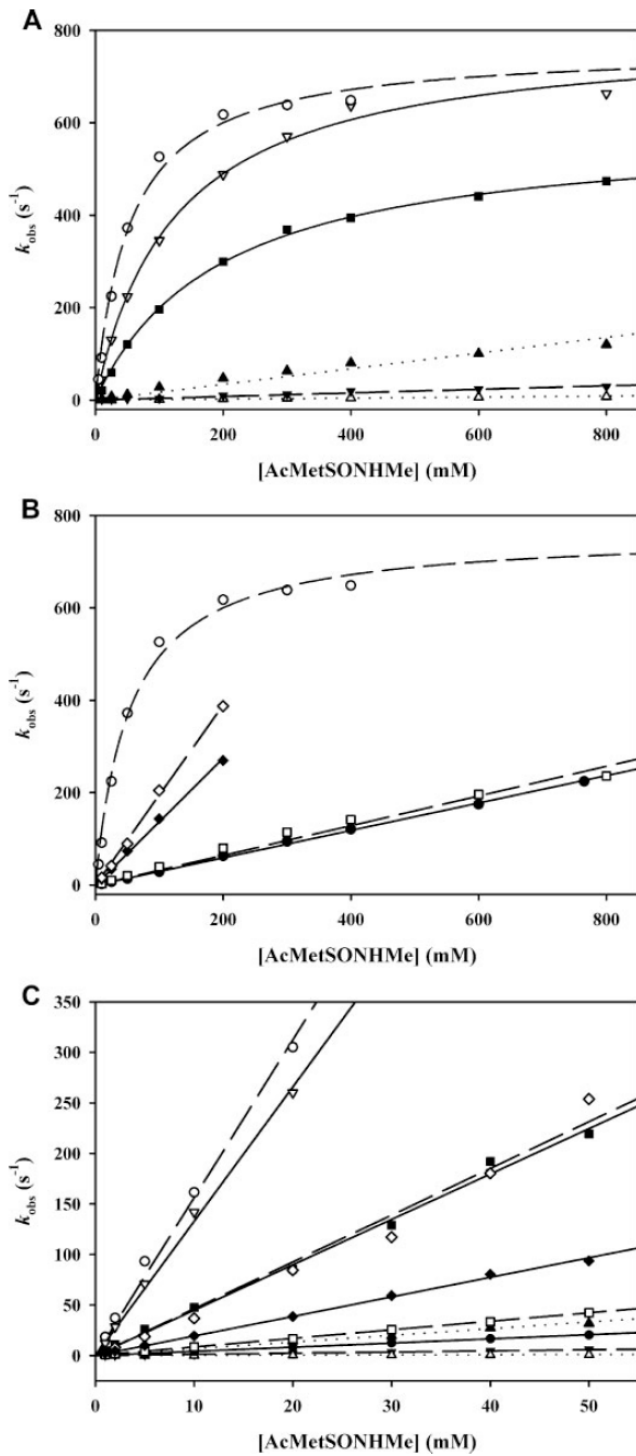


FIGURE 2. Determination of the catalytic parameters of the reductase step of wild-type, F52L, H186A/H186N, Y189A/Y189F, D129A/D129N, and Y197A/Y197F MsrAs measured by fluorescence stopped-flow under single turnover kinetics. The MsrA fluorescence variation was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C. Final concentration of MsrA was 10  $\mu$ M. Excitation wavelength was set at 284 nm, and emitted light was collected above 320 nm using a cut-off filter. For each substrate concentration, experimental data were analyzed by nonlinear regression against Equation 2 to obtain  $k_{obs}$ . In A and B, the substrate range was from 10 to 800 mM. For H186N and Y189F MsrAs, saturating concentrations of AcMetSONHMe were observed, and  $k_{obs}$  data were fit to Equation 3, which gave  $k_{obs,max}$  and  $K_S$  values as follows: Y189F

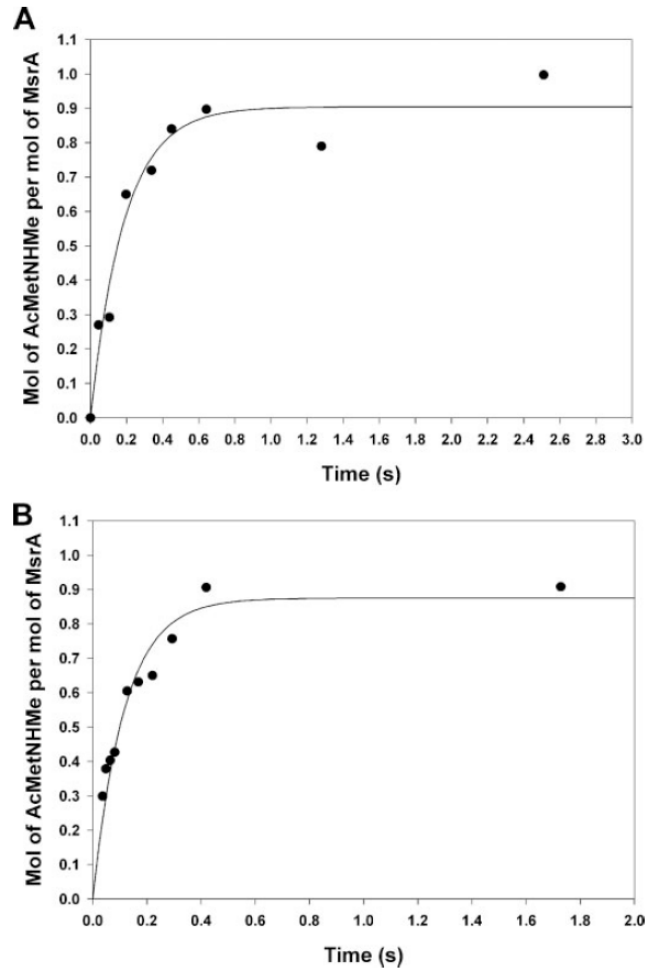


FIGURE 3. Time-resolved appearance of Ac-L-Met-NHMe for the W53F MsrA under single turnover kinetics. The quenched-flow experiments were carried out at 25 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 8, at 300 (A) and 600 mM (B) of AcMetSONHMe as described under "Experimental Procedures." The symbols represent experimental data points. Data were fit to Equation 1 and gave rate constants of  $5.2 \pm 1.0$  and  $8.5 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$  with amplitudes of  $0.90 \pm 0.05$  mol of Ac-L-Met-NHMe/mol of enzyme and  $0.87 \pm 0.04$  mol of Ac-L-Met-NHMe/mol of enzyme in the presence of 300 and 600 mM substrate, respectively.

when Trp-53 is substituted by Ala, as suggested by the very high  $K_m$  value for the substrate (800 mM when compared with 0.6 mM for the wild type).

*Kinetic Properties of H186A/H186N and Y189A/Y189F MsrAs*—The kinetic constants determined for the H186A, H186N,

MsrA (A,  $\nabla$ , solid line,  $k_{obs,max} = 800 \pm 30 \text{ s}^{-1}$  and  $K_S = 130 \pm 10 \text{ mM}$ ); H186N MsrA (A,  $\blacksquare$ , solid line,  $k_{obs,max} = 590 \pm 10 \text{ s}^{-1}$  and  $K_S = 200 \pm 10 \text{ mM}$ ). For F52L, H186A, Y189A, D129A/D129N, and Y197A/Y197F MsrAs, no saturating concentrations of AcMetSONHMe were observed, and  $k_{obs}$  data were fit to the linear equation as follows: F52L MsrA (A,  $\Delta$ , dotted line); H186A MsrA (A,  $\blacktriangledown$ , dashed line); Y189A MsrA (A,  $\blacktriangle$ , dotted line); D129A MsrA (B,  $\bullet$ , solid line); D129N (B,  $\square$ , dashed line); Y197A MsrA (B,  $\blacklozenge$ , solid line); Y197F MsrA (B,  $\diamond$ , dashed line). The data of the wild-type MsrA were also presented as reference (A and B,  $\circ$ , dashed line,  $k_{obs,max} = 790 \pm 10 \text{ s}^{-1}$  and  $K_S = 55 \pm 2 \text{ mM}$  (9)). In C, the substrate range was from 1 to 50 mM. The  $k_2$  values were obtained by linear fitting of  $k_{obs}$  values for wild-type ( $\circ$ , dashed line), F52L ( $\Delta$ , dotted line), D129A ( $\bullet$ , solid line), D129N ( $\square$ , dashed line), H186A ( $\blacktriangledown$ , dashed line), H186N ( $\blacksquare$ , solid line), Y189A ( $\blacktriangle$ , dotted line), Y189F ( $\nabla$ , solid line), Y197A ( $\blacklozenge$ , solid line), and Y197F ( $\diamond$ , dashed line) MsrAs.

Y189A, and Y189F MsrAs under steady-state conditions showed that the  $k_{\text{cat}}$  is not modified for all mutated MsrAs (Table 1). The  $K_m$  values varied slightly for the H186N and Y189F MsrAs (4-fold increase and 2-fold decrease, respectively) but were strongly increased for the H186A and Y189A MsrAs (165- and 57-fold, respectively) when compared with that of the wild type.

Under single turnover conditions, a saturating kinetics effect with respect to AcMetSONHMe concentration was only observed for H186N and Y189F MsrAs, whereas no saturating effect was observed for H186A and Y189A MsrAs up to 800 mM (Fig. 2, A and B). The  $k_{\text{obs}}$  values determined at 800 mM substrate were 11-, 52-, 190-, and 444-fold higher than the  $k_{\text{cat}}$  values for H186A, Y189A, H186N, and Y189F MsrAs, respectively, indicating a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step. The  $K_S$ ,  $k_{\text{obs max}}$ , and  $k_2$  values determined for H186N and Y189F MsrAs were in the range of those determined for the wild type (Fig. 2B and Table 1). This was not the case when His-186 or Tyr-189 was substituted by Ala, as probed by the 124- and 25-fold  $k_2$  decrease observed, respectively. The  $k_2$  decreases reflect both a  $K_S$  effect and a  $k_{\text{obs max}}$  effect since the  $k_{\text{obs}}$  values determined at 800 mM AcMetSONHMe were decreased by 27- and 6-fold for H186A and Y189A MsrAs, respectively, when compared with the  $k_{\text{obs max}}$  value of the wild type. When compared with the W53F MsrA, the  $k_2$  values for H186A and Y189A are decreased less. Altogether, the kinetic data are thus in accord with the postulated role of His-186 and Tyr-189 that favored an efficient positioning of the Trp-53 indole ring via a hydrogen bond and a stacking interaction, respectively. This also agrees with the fact that the conservative substitutions of His-186 and Tyr-189 by Asn and Phe, respectively, have no significant effect on the catalytic efficiency of the reductase step.

**Fluorescence Properties of F52L, H186A/H186N, and Y189A/Y189F MsrAs**—Previous work showed that the fluorescence properties of wild-type MsrA, when excitation was performed at 295 nm, were only due to the contribution of Trp-53 and consequently reflect the microenvironment of the Trp-53 indole ring (11). Comparison of the emission spectra of all mutated MsrAs with that of the wild-type, of either the reduced or the oxidized disulfide forms, showed no difference except for the reduced form of F52L, H186A, and Y189A MsrAs (spectra not shown). For these mutated MsrAs, the  $\lambda_{\text{max}}$  is shifted from 338 to 346 nm, which reflects a microenvironment of the indole side chains of Trp-53 more polar than in the reduced forms of the wild type and the other mutated MsrAs. This is likely due to an increased accessibility of Trp-53 to solvent. Moreover, in contrast to other mutated MsrAs, in particular to H186N and Y189F MsrAs, F52L, H186A, and Y189A MsrAs display a 3.8-, 2.3-, and 2.7-fold increase of the fluorescence intensity at  $\lambda_{\text{max}}$  respectively, when compared with that of the wild type (spectra not shown). This reflects a lesser quenching of the Trp-53 fluorescence. As already mentioned, inspection of the x-ray MsrA structure shows a  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction between the phenyl ring of Tyr-189 and the indole ring of Trp-53. Therefore, Tyr-189 is a good candidate as the quencher of the Trp-53 fluorescence in the wild type. This is in accord with the increase of the Trp-53 fluorescence intensity, which is observed in Y189A

MsrA but not in Y189F MsrA that still possesses a phenyl ring. The increase of the fluorescence intensity observed for H186A MsrA and F52L MsrA suggests a separation taking place between Trp-53 and the phenyl ring of Tyr-189 in both mutated MsrAs. In both cases, it is probable that the positioning of the indole ring relative to that of Tyr-189 is perturbed. For H186A, it is likely the consequence of the loss of a hydrogen bond with the indole ring of Trp-53. As a support, H186N MsrA, which conserves the capacity of forming a hydrogen bond, displays similar  $\lambda_{\text{max}}$  and fluorescence intensity as the wild type. In the case of F52L, it is probable that substituting Leu for Phe-52 disrupts, in part, the hydrophobic pocket, and in return, destabilizes the positioning of Trp-53 relative to Tyr-189. These interpretations are in accord with the  $K_S$  effects observed for F52L, H186A, and Y189A MsrAs.

### Role of Asp-129 and Tyr-197 in the recognition of the main chain of the substrate

The kinetic parameters of D129A, D129N, Y197A, and Y197F MsrAs determined under steady-state conditions showed that the  $k_{\text{cat}}$  value was not modified, whereas the  $K_m$  value was increased 16-, 10-, 2.5-, and 5-fold, respectively, when compared with those of the wild type (Table 1). Under single turnover conditions in the absence of reductant, no kinetic saturation effect was observed up to 800 and 200 mM AcMetSONHMe for D129A/D129N and Y197A/Y197F<sup>5</sup> MsrAs, respectively (Fig. 2C). The  $k_{\text{obs}}$  values determined at substrate concentration of 800 mM for D129A and D129N MsrAs and of 200 mM for Y197A and Y197F MsrAs were 141-, 133-, 208-, and 110-fold higher than their corresponding  $k_{\text{cat}}$  values, indicating a rate-limiting step still associated with the Trx-recycling step for all these mutated MsrAs.

The  $k_2$  values were 37-, 19-, 8-, and 3-fold decreased for D129A, D129N, Y197A, and Y197F MsrAs, respectively, when compared with that of the wild type (Table 1). These decreases in  $k_2$  reflect essentially a  $K_S$  effect since the  $k_{\text{obs}}$  values determined at 800 and 200 mM AcMetSONHMe decreased only 2–3-fold for D129A/D129N and Y197A/Y197F MsrAs, respectively, when compared with the  $k_{\text{obs max}}$  value of the wild type.

The fact that Asp-129 and Tyr-197 were predicted from the three-dimensional structure of MsrA from *M. tuberculosis* complexed with a Met residue to stabilize the main chain of the substrate raised the question whether they can discriminate in favor of the binding of a protein-bound MetSO against the binding of free MetSO. Indeed, MsrA displays a better affinity of at least 20-fold for AcMetSONHMe when compared with free MetSO. As shown in Table 2, substituting Asp-129 by Ala or Asn and Tyr-197 by Ala or Phe also affected the  $k_2$  values with MetSO as a substrate with the same magnitude as with AcMetSONHMe, in contrast to Me<sub>2</sub>SO, for which the  $k_2$  values are not significantly modified except for D129A MsrA. Altogether, the data support: 1) a nondiscriminating role of Asp-129 and Tyr-197 in the recognition of the NH main chain of the MetSO with the amino and carboxyl groups of MetSO either

<sup>5</sup> For Y197A/Y197F MsrAs, the variation of the fluorescence signal as a function of time becomes, for an unknown reason, not significant for substrate concentration higher than 200 mM.

**TABLE 2**

**Reductase step second order rate constants  $k_2$  of wild-type and mutated MsrAs with different sulfoxide substrates**

$k_2$  values of the reductase step were obtained by linear regression of  $k_{obs}$  determined under subsaturating concentration of substrate (see "Experimental Procedures"). The number in brackets represents the  $k_2$  value of mutated MsrAs when compared with the  $k_2$  value of the wild type expressed in percentage. It is important to note that the  $k_2$  constant for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe and for L-Met-R,S-SO, in contrast to the  $k_2$  constant for Me<sub>2</sub>SO, have to be multiplied by 2, taking into account the fact that the R isomer of the sulfoxide function is neither a substrate nor an inhibitor of MsrA (7).

Enzyme	$k_2$ AcMetSONHMe	$k_2$ MetSO <i>mm</i> <sup>-1</sup> <i>s</i> <sup>-1</sup>	$k_2$ Me <sub>2</sub> SO
Wild type	14.9 ± 0.9 (100)	1.40 ± 0.01 (100)	0.50 ± 0.01 (100)
D129A	0.40 ± 0.01 (2.7)	0.03 ± 0.01 (2)	0.18 ± 0.01 (36)
D129N	0.80 ± 0.01 (5.4)	0.12 ± 0.01 (9)	0.42 ± 0.01 (84)
Y197A	1.90 ± 0.04 (13)	0.40 ± 0.01 (29)	0.36 ± 0.01 (72)
Y197F	4.8 ± 0.3 (32)	0.50 ± 0.01 (36)	0.30 ± 0.01 (60)

free, and thus, charged, or engaged in amide bonds, as is the case for a protein-bound MetSO; and 2) a higher contribution of Asp-129 to the substrate binding when compared with Tyr-197. Nevertheless, the fact that a phenyl ring can make interaction with a peptidic bond as well as with a protonated amine (21, 22) prevents discrimination between a direct role of Tyr-197 in substrate binding or an indirect role, via the orientation of the carboxylate group of Asp-129. Anyway, the contribution of Asp-129 and Tyr-197 remains modest when compared with that of Phe-52 and Trp-53 in terms of  $K_S$  values.

The selectivity of MsrA for protein-bound MetSO should thus arise from other structural factors (either a stabilizing effect for protein-bound MetSO via interactions with the amide bonds or a destabilizing effect for MetSO due to repulsive interactions with the charges on the amino and/or carboxyl groups) located near the active site of the MsrA. These factors, if existing, remain to be characterized. In that context, determination of the three-dimensional structure of a complex between a MsrA and a protein MetSO substrate could provide additional information to those obtained from the three-dimensional structure of MsrA from *M. tuberculosis* complexed with a Met residue.

**Conclusion**

We have shown that for MsrA: 1) the hydrophobic pocket, formed by the side chains of invariant Phe-52 and Trp-53, is the major factor that contributes to MetSO binding via interactions with the  $\epsilon$ -methyl group; 2) invariant His-186 and Tyr-189 are key residues for orienting the Trp-53 indole ring, the positioning of which is essential for an efficient reductase activity to occur; and 3) the side chains of invariant residues Asp-129 and Tyr-197 participate in the substrate binding but are not discriminating in terms of binding between a MetSO either engaged in amide bonds or with amino and carboxyl groups free. The  $K_I$  value of MsrA for AcMetNHMe is at least 2 M (data not shown). This shows a low affinity of MsrA for AcMetNHMe, although the  $\epsilon$ -methyl group is present. As indicated in the Introduction, Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 are involved in catalysis but not in substrate binding. Moreover, a MetSO substrate such as AcMetSONHMe is bound to the active site with its sulfoxide function largely polarized via interactions with Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134. Therefore, the sulfur of the sulfoxide function bears a positive charge, or at least a partial charge, and thus,

participates by a substrate-assisted mechanism to interacting and stabilizing the thiolate form of Cys-51 (14). In contrast, the sulfur of AcMetNHMe is rather negatively charged (23, 24). Thus, a repulsive electrostatic interaction is expected to occur between the sulfur of Cys-51 and the sulfur of the product, which can be considered as an anti-determinant factor that disfavors binding of product such as AcMetNHMe. The consequence is either a higher rate of dissociation of the product from the MsrA-product complex when compared with that of a MsrA-MetSO complex and/or a lower rate of association of the product to MsrA when compared with that of MetSO substrate, and thus, would explain the low affinity of MsrA for AcMetNHMe.

Recent structural and dynamical NMR studies of both reduced and oxidized forms of *E. coli* MsrA (25) show the existence of a conformational switch that would be a prerequisite to form the Cys-51/Cys-198 bond. The consequence is a solvent exposition of the hydrophobic surface of the active site of the oxidized MsrA, which could permit an efficient interaction with Trx. The switch only concerns two segments that contain Asp-129 and Tyr-197 residues, respectively. In the oxidized form, the distance between Asp-129 and Tyr-197 is too large for hydrogen bond interaction between both residues in contrast to what is observed in reduced form. It is probable that the release of the product for which MsrA displays low affinity is the driving factor responsible for the conformational switch.

*Acknowledgments*—We thank Dr. F. Barras for the kind gift of the BE002 *E. coli* strain, C. Gauthier for the AcMetSONHMe synthesis, Dr. G. Chevreux and Dr. S. Sanglier-Cianferani for mass spectrometry analyses, Dr. G. Monard for helpful discussion, and Dr. S. Sonkaria for the careful reading of the manuscript.

**REFERENCES**

- Vogt, W. (1995) *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 93–105
- Schoneich, C. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 111–119
- Moskovitz, J. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 213–219
- Weissbach, H., Resnick, L., and Brot, N. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 203–212
- Ezraty, B., Aussel, L., and Barras, F. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 221–229
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022
- Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42462–42468
- Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231–238
- Boschi-Muller, S., Azza, S., and Branlant, G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 2272–2279
- Antoine, M., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 45352–45357
- Olry, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *Biochemistry* **43**, 11616–11622
- Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2006) *J. Phys. Chem. A* **110**, 7628–7636
- Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 39062–39070
- Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure Fold. Des.* **8**, 1167–1178

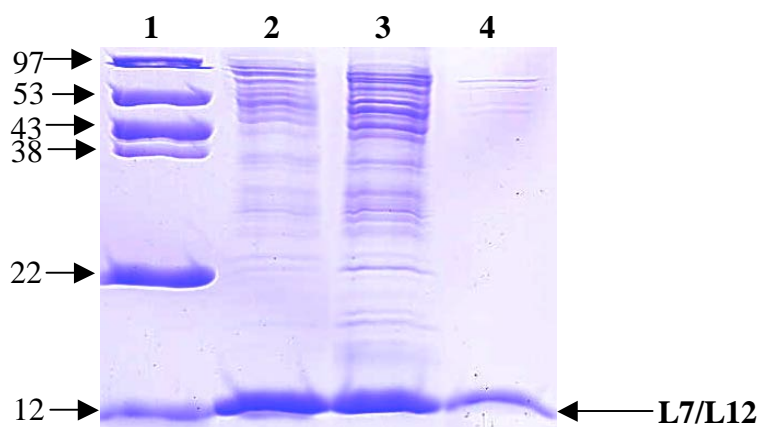
## ***Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat***

16. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307–13312
17. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 4119–4126
18. Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Paladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J. P., and Boschi-Muller, S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3367–3378
19. Mulrooney, S. B. (1997) *Protein Expression Purif.* **9**, 372–378
20. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233–1244
21. Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2004) *J. Mol. Biol.* **343**, 29–41
22. Tsou, L. K., Tatko, C. D., and Waters, M. L. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14917–14921
23. Chipot, C., Angyan, J. G., Maignret, B., and Scheraga, H. A. (1993) *J. Phys. Chem.* **97**, 9788–9796
24. Guillot, R., Muzet, N., Dahaoui, S., Lecomte, C., and Jelsch, C. (2001) *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr.* **57**, 567–578
25. Coudeville, N., Antoine, M., Bouguet-Bonnet, S., Mutzenhardt, P., Boschi-Muller, S., Branlant, G., and Cung, M. T. (2007) *J. Mol. Biol.* **366**, 193–206

### **I.3 Etude d'un substrat protéique : la protéine L7/L12 d'*E. coli***

Les études cinétiques de l'étape réductase montrent que les MsrA présentent une faible affinité apparente pour un substrat sulfoxyde, même protégé type AcMetSONHMe ( $K_S = 55$  mM). Une hypothèse pour expliquer cette faible affinité serait que les résidus adjacents à la MetSO joueraient un rôle dans la reconnaissance, bien que l'examen des séquences de protéines substrat ne montrent pas de séquence signature particulière autour de la MetSO. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, la stratégie retenue a consisté à déterminer les paramètres cinétiques de l'étape réductase de la MsrA pour la protéine L7/L12, dont les Met ont été oxydées en MetSO. En effet, la protéine L7/L12 ainsi oxydée a été décrite comme étant un substrat des MsrA (Brot *et al.*, 1980, Introduction, paragraphe I.4.2.3, page 12).

La séquence codant la protéine L7/L12 a été clonée à partir de l'ADN génomique d'*E. coli* dans un vecteur permettant l'expression de la protéine avec un étiquette His du côté N-terminal. Cette protéine a été produite en quantité suffisante pour réaliser notre étude et obtenue pure après chromatographie d'affinité sur complexe  $Ni^{2+}$  (IMAC). Le rendement obtenu est de 125 mg par litre de culture. La pureté de la protéine a été vérifiée sur gel SDS-PAGE 12,5% (Figure 38) ainsi que par la détermination de la masse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (Résultat non montré).



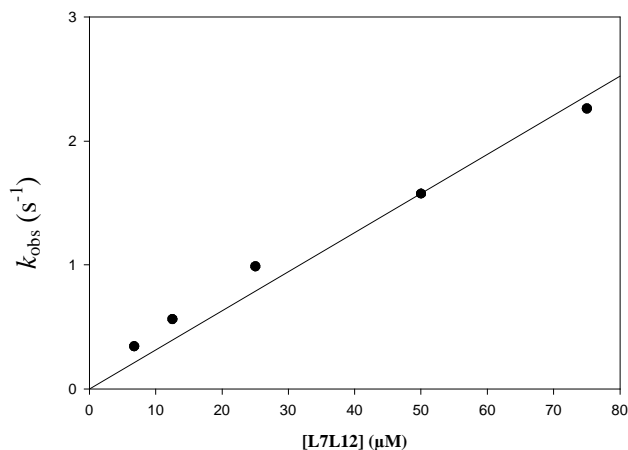
**Figure 38 :** Gel SDS-PAGE bilan de purification de la protéine L7/L12 portant une étiquette His du côté N-terminal

1 : Marqueur de taille, 2 : extrait cellulaire, 3 : surnageant de sonication, 4 : échantillon après chromatographie d'affinité sur complexe  $Ni^{2+}$  (IMAC). Les productions ont été réalisées dans des cellules BL21 (DE3). L'expression est induite par ajout d'IPTG à 1 mM lorsque la  $DO_{600\text{ nm}}$  est de 0,6, puis les cultures sont laissées sous agitation à 37°C pendant 18 H.

## **Résultats : Résidus impliqués dans la catalyse et la reconnaissance du substrat**

L'oxydation des trois Met de la protéine L7/L12 a été réalisée en présence de 0,1 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de 50 % d'acide acétique permettant de rendre les Met accessibles pour l'oxydation. Lorsque les Met de L7/L12 sont oxydées, le dimère est dissocié et la protéine se retrouve alors à l'état monomérique. L'oxydation des trois résidus Met a été vérifiée par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (résultats non montrés).

Les paramètres cinétiques de l'étape réductase de la MsrA sauvage ont été déterminés avec comme substrat la protéine L7/L12 oxydée au niveau de ses trois résidus Met en sous-saturation. En effet, les expériences réalisées avec un appareil de cinétique rapide (« stopped-flow ») consomment une grande quantité de substrat et au vu des protocoles de purification et d'oxydation de la protéine L7/L12, il nous était impossible d'obtenir de fortes concentrations en substrat. Les expériences ont donc été réalisées en faisant varier la concentration en substrat de 8 à 75  $\mu\text{M}$  (soit 24 à 225  $\mu\text{M}$  compte tenu de la présence de 3 MetSO par monomère). Les résultats obtenus s'ajustent sur l'équation d'une droite ( $y = ax + b$ ) ce qui permet d'obtenir une valeur de  $k_2$  de  $2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 39), similaire à celle obtenue avec le substrat AcMetSONHMe ( $k_2 = 1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). De plus, les vitesses mesurées avec la protéine L7/L12 comme substrat sont équivalentes à celles obtenues avec le substrat AcMetSONHMe, pour des concentrations équivalentes. Ces résultats montrent que le fait que les constantes  $k_2$  soient similaires pour les deux substrats reflète des constantes  $k_{\text{obs max}}$  et  $K_S$  elles aussi similaires. L'affinité apparente de la MsrA pour L7/L12 n'est donc pas améliorée par rapport à celle pour l'AcMetSONHMe. Ceci confirme, comme attendu d'après l'absence de séquence signature, que les résidus adjacents à la MetSO dans les protéines n'interviennent pas dans la reconnaissance.



**Figure 39 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape réductase de la MsrA sauvage de *N. meningitidis* avec la protéine L7/L12 oxydée comme substrat.**

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence de l'enzyme qui passe de la forme réduite à la forme pont disulfure, à l'état pré-stationnaire grâce à un appareil de mélange rapide. Les mesures sont réalisées à 25°C dans du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm et l'émission de fluorescence est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 320 nm. Le mélange réactionnel comporte : la protéine L7/L12 oxydée (en concentrations variables) et MsrA (10  $\mu M$ ). Les valeurs expérimentales ont été ajustées par régression linéaire à l'équation d'une droite  $y = ax + b$  qui donne une valeur de  $k_2$  de  $(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$ .

## **Partie II : Les disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis***

Les études menées au laboratoire sur le mécanisme, la catalyse et la spécificité structurale des MsrA et B ont été réalisées sur les domaines MsrA et MsrB isolés de la protéine PilB de *N. meningitidis*. PilB est une protéine périplasmique à trois domaines, contenant deux domaines Msr et un domaine supplémentaire à l'extrémité N-terminale, appelé domaine N-ter. Récemment, il a été montré que ce domaine N-ter est capable de réduire les domaines MsrA, certes avec une faible efficacité, et MsrB de *N. meningitidis* (Wu *et al.*, 2005), qu'il possède un repliement caractéristique des protéines de type DsbE (Ranaivoson *et al.*, 2006) et qu'il est réduit par le domaine N-terminal de la protéine transmembranaire DsbD (nDsbD) (Brot *et al.*, 2006). Comme décrit dans l'Introduction (paragraphe I.3.2 p50), les DsbE sont des disulfure oxydoréductases périplasmiques, appartenant à la famille des Trx, impliquées dans la maturation des cytochromes *c*, plus précisément dans la réduction du pont disulfure intramoléculaire entre les deux Cys de l'apocytochrome *c*, ces deux Cys sous forme réduite formant un lien covalent avec l'hème générant l'holocytochrome *c*. De plus, les DsbE sont réduites par le domaine nDsbD (Stirnemann *et al.*, 2006). Ainsi, bien que possédant un repliement identique, le domaine N-ter et les DsbE semblent avoir des cibles différentes mais le même partenaire réducteur. Quels sont alors les facteurs structuraux et moléculaires permettant d'une part la reconnaissance spécifique de leurs cibles et d'autre part leur interaction avec le même partenaire réducteur ?

Pour essayer de répondre à ces questions, une étude des relations structure-fonction du domaine N-ter de PilB de *N. meningitidis* d'un côté, et d'une DsbE de l'autre, a été entreprise. La caractérisation du domaine N-ter est réalisée par Laure Selme, et je me suis intéressée pour ma part à l'étude de la DsbE. L'examen du génome de *N. meningitidis* suggérait l'existence d'un système de maturation de type II, bien qu'aucune « DsbE-like » n'avait pu être identifiée (Tinsley *et al.*, 2004 ; Sinha *et al.*, 2004). Des recherches par identité de séquence dans le génome de *N. meningitidis* (séro groupe C) montrent l'existence de trois disulfure oxydoréductases putatives périplasmiques, que l'on a nommé DsbE1, DsbE2 et DsbE3, d'où la question : sont-elles impliquées dans le système de maturation des cytochromes *c*, processus vital pour la fonctionnalité du système de transport d'électrons de cette bactérie pathogène ? De plus, qu'en est-il du rôle respectif de ces DsbE putatives et du domaine N-terminal ? Y a-t-il redondance ? Sinon, comment peut-on expliquer la sélectivité de cible des DsbE putatives



pour les apocytochromes *c* et du domaine N-terminal pour les domaines Msr ? La DsbD est-elle le partenaire réducteur de ces trois DsbE putatives ?

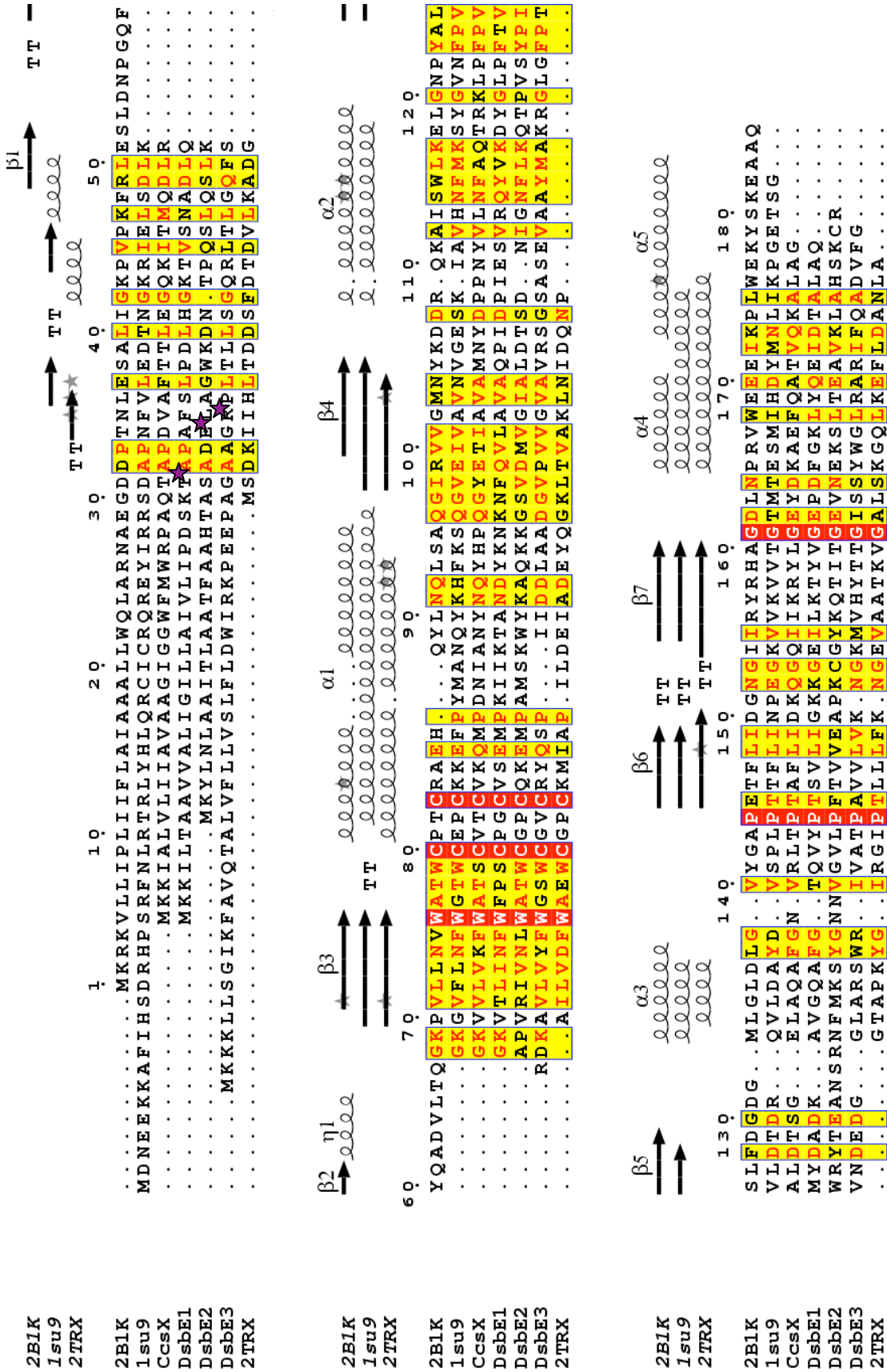
L'étude de ces trois DsbE putatives a donc été entreprise par différentes approches : 1) la caractérisation *in vitro* de formes solubles de ces trois protéines, 2) l'étude du mécanisme de réduction d'une cible potentielle de type apocytochrome *c* et de réduction par le domaine N-terminal de la DsbD (nDsbD) de *N. meningitidis*, et 3) une approche fonctionnelle *via* la complémentation de différentes souches bactériennes déficientes en DsbE.

Les techniques utilisées pour ces différentes approches ont dû être mises au point. La protéine DsbE3t n'ayant pas été obtenue sous forme soluble, toutes les études ont été réalisées uniquement sur la DsbE1t et la DsbE2t.

## **II.1 Analyse des séquences des DsbE1, DsbE2 et DsbE3**

L'analyse des alignements de séquences de la CcmG d'*E. coli*, de ResA de *B. subtilis* et de CcsX de *B. pertussis* avec les trois DsbE putatives de *N. meningitidis* pouvait donner une première indication quant au rôle de ces des trois DsbE putatives (Figure 40). Tout d'abord, les pourcentages d'identité de séquences entre les trois DsbE de *N. meningitidis* et les protéines ResA et CcsX sont respectivement de 33 et 35%, 11 et 18% et 21 et 23%. ResA et CcsX ont été prises comme référence étant donné que chez *B. subtilis* et *B. pertussis*, le système de maturation des cytochromes *c* est un système de type II, tout comme chez *N. meningitidis*. Au vu de ces pourcentages, il semblerait que la DsbE1 soit la protéine la plus proche des DsbE en terme de séquence protéique. Les DsbE possèdent certaines caractéristiques structurales supplémentaires par rapport à des protéines de type Trx classiques, à savoir : une extension N-terminale structurée en épingle à cheveux et qui contient deux brins  $\beta$ , une insertion centrale, une région très conservée appelée région « Fingerprint » ainsi qu'un site actif composé d'acides aminés acides : Glu86, Glu145 et Asp107 dans la CcmG d'*E. coli* (Ouyang *et al.*, 2006 ; Edeling *et al.*, 2002).

Les protéines DsbE2 et DsbE3 possèdent toutes les deux une séquence signature de type WCXXC, contrairement à la protéine DsbE1 qui elle présente une séquence signature un peu particulière où le résidu Trp localisé en amont de la Cys catalytique est remplacé par une Ser. Néanmoins, il est à noter que la protéine CcsX de *B. pertussis*, qui est décrite intervenir dans la maturation des cytochromes *c*, possède un site actif similaire avec une Ser à la place du Trp habituellement retrouvé en amont de la Cys catalytique. Il est intéressant de noter que la



**Figure 40 :** Alignement des séquences de protéines appartenant à la famille des DsbE

La numérotation est basée sur celle de la CcmG d'*E. coli*. 2B1K : CcmG d'*E. coli*, 1su9 : ResA de *B. subtilis*, CcsX : CcsX de *B. pertussis*, DsbE1, DsbE2 et DsbE3 : DsbE putatives de *N. meningitidis*, 2Trx : Trx1 d'*E. coli*. Les résidus strictement conservés sont surlignés en rouge, les résidus homologues à au moins 60% sont surlignés en jaune. Les structures secondaires des protéines dont la structure tridimensionnelle a été déterminée sont présentées au dessus de l'alignement, à savoir pour la CcmG d'*E. coli*, ResA de *B. subtilis* et la Trx d'*E. coli*. L'étoile violette représente l'endroit où a été réalisée la troncation de l'extrémité N-terminale des trois DsbE permettant de produire ces protéines dans le cytoplasme.

**Résultats : Disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis***

DsbE2 possède une séquence signature retrouvée chez les Trx, à savoir une signature WCGPC. Cette DsbE2 pourrait donc être une Trx périplasmique réduisant des ponts disulfures intramoléculaires de protéines périplasmiques mais non impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. L'examen des alignements de séquences (Figure 40) montre que les trois DsbE putatives semblent posséder une insertion centrale (résidus 110 à 133) qui n'est pas présente dans la séquence de la Trx1 d'*E. coli*. Il est un peu plus difficile de se prononcer quant à la région N-terminale en épingle à cheveux puisqu'à partir des alignements de séquences, il est impossible de savoir si les trois DsbE putatives possèdent une extension N-terminale structurée en épingle à cheveux et composée de deux brins  $\beta$ . En ce qui concerne la région « Fingerprint », si dans le cas des DsbE d'organismes possédant un système de maturation des cytochromes *c* de type I cette région est strictement conservée, il n'en est pas de même pour les DsbE d'organismes possédant un système de maturation des cytochromes *c* de type II (Figure 41).

	140	145
<i>E. coli</i>	G--V	YGAPETF
<i>N. winogradskyi</i>	G--V	YGVPETF
<i>M. loti</i>	G--V	YGVPETF
<i>L. pneumophila</i>	G--V	YGAPETF
<i>B. japonicum</i>	G--V	YGVPETF
<i>B. subtilis</i>	D--V	SPLPTTF
<i>B. pertussis</i>	GN-V	RLTPTAF
<i>N. men</i> DsbE1	G--T	QVYPTSV
<i>N. men</i> DsbE2	GNNV	GVLPTTV
<i>N. men</i> DsbE3	R--I	VATPAVV

**Figure 41 : Alignement de séquences de la région « Fingerprint » de différentes DsbE.**

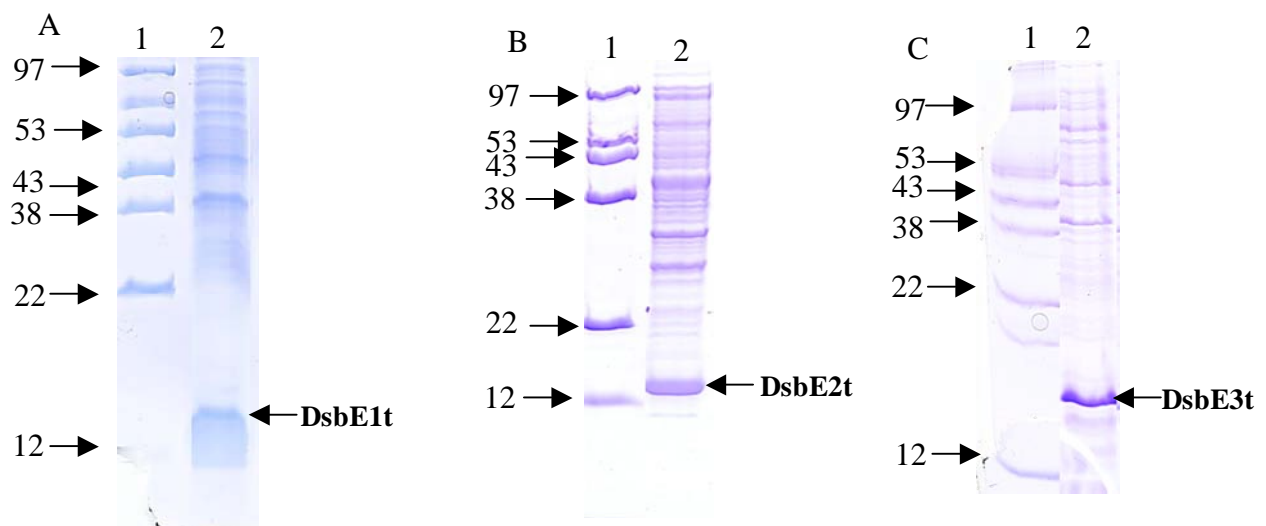
Sont représentées les régions « Fingerprint » des séquences de DsbE d'organismes possédant un système de maturation des cytochromes *c* de type I (*E. coli*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Mesorhizobium loti*, *Legionella pneumophila*, *B. japonicum*), des séquences d'organismes possédant un système de maturation des cytochromes *c* de type II (*B. subtilis*, *B. pertussis*) ainsi que les trois séquences des DsbE putatives de *N. meningitidis* (*N. men* DsbE1, DsbE2 et DsbE3).

Dans le site actif de la CcmG d'*E. coli*, trois résidus acides sont présents, deux résidus Glu (Glu86, Glu145) et un résidu Asp (Asp107). Aucun de ces trois résidus n'est conservé dans la DsbE3. Par contre dans les DsbE1 et DsbE2, le résidu Glu86 et un Asp, respectivement en position 107 et 108 pour la DsbE1 et la DsbE2, sont bien conservés. Il est à noter que le second Glu est localisé au niveau de la région « Fingerprint » qui n'est pas conservée dans les DsbE appartenant à un système de maturation de type II.

## II.2 Etudes *in vitro* des trois DsbE putatives

### II.2.1 Production et purification des formes solubles des trois DsbE

Un préalable à toute étude était de pouvoir disposer des trois DsbE sous forme soluble et en grande quantité. Pour cela, différentes constructions ont été réalisées afin de produire des formes cytoplasmiques solubles (délétion de la séquence codante correspondant à la séquence d'export de la protéine vers le périplasma et à la séquence permettant la fixation à la membrane cytoplasmique). Nous avons ainsi réussi à produire les trois DsbE « tronquées » dans le cytoplasme en quantité suffisante pour pouvoir réaliser notre étude (Figure 42). Ces protéines sont appelées DsbE1t, DsbE2t et DsbE3t et leurs masses théoriques respectives sont de 14966, 15318 et 13424 Da.



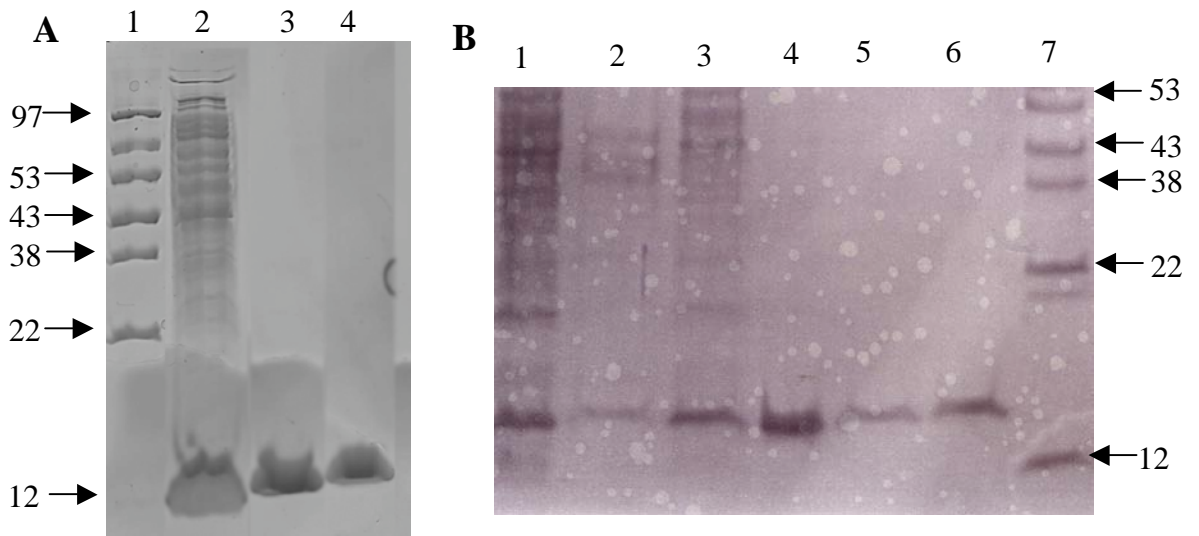
**Figure 42 :** Analyse sur gel SDS-PAGE des productions des protéines DsbE1t (A), DsbE2t (B) et DsbE3t (C)

1 : Marqueur de taille ; 2 : Extrait cellulaire. Les productions ont été réalisées dans des cellules BL21(DE3) pour la DsbE1t et la DsbE2t et dans des cellules C41 pour la DsbE3t. L'expression des protéines est induite par ajout d'IPTG à 1 mM lorsque la  $DO_{600nm}$  est de 0,6, puis les cultures sont laissées sous agitation à 37°C pendant 18 h.

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE des fractions solubles et insolubles après sonication des différents culots cellulaires a montré que les DsbE1t et DsbE2t étaient solubles alors que la DsbE3t était insoluble (résultats non montrés). Il reste donc encore à mettre au point un protocole de purification adapté permettant de disposer de la DsbE3t pure, sous forme soluble et en quantité suffisante pour l'étudier.

### Résultats : Disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*

Des protocoles de purification ont été mis au point pour la DsbE1t et la DsbE2t. Pour ces deux protéines, les protocoles utilisés sont similaires et font intervenir, après l'étape de sonication, une étape de purification par filtration sur gel et une étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions. Il est à noter que pour la DsbE2t une étape supplémentaire de précipitation au sulfate d'ammonium à 65% est réalisée avant la chromatographie par gel filtration. Les rendements obtenus sont respectivement de 144 et 50 mg par litre de culture pour la DsbE1t et la DsbE2t. La pureté des protéines a été vérifiée sur gel SDS-PAGE 12,5% (Figure 43) ainsi que par la détermination de la masse par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes. Les groupements thiols libres ont également été dosés par le DTNB (résultats non montrés). Pour ces deux protéines, les deux Cys du site actif sont bien titrés.



**Figure 43 :** Gel SDS-PAGE bilan de purification de la DsbE1t (A) et de la DsbE2t (B).

(A) 1 : Marqueur de taille, 2 : surnageant de sonication, 3 : échantillon après filtration sur gel (ACA54), 4 : échantillon après chromatographie échangeuse d'anions (Q-sépharose).

(B) 1 : surnageant de sonication, 2 : surnageant de précipitation au sulfate d'ammonium 65%, 3 : culot de précipitation au sulfate d'ammonium 65%, 4 : échantillon après chromatographie par filtration sur gel (ACA54), 5 : échantillon après chromatographie échangeuse d'anions (Q-sépharose), 6 : concentrat, 7 : marqueur de taille.

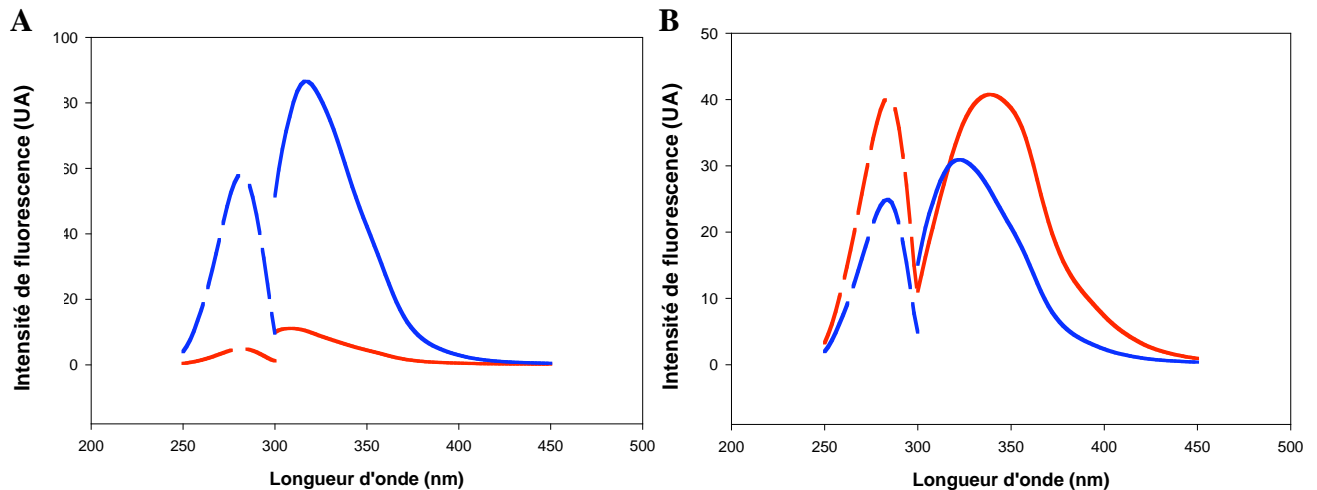
## II.2.2 Caractérisation biochimique de la DsbE1t et de la DsbE2t

### II.2.2.1 Détermination du potentiel redox de la DsbE1t et de la DsbE2t

Une technique couramment utilisée pour la détermination des potentiels redox à l'équilibre est basée sur une différence d'intensité de fluorescence existant entre les formes oxydées et réduites des protéines. Dans le cas de la Trx1 d'*E. coli*, cette augmentation de fluorescence est essentiellement attribuée au Trp situé juste en amont de la séquence signature CXXC, la formation du pont disulfure entraînant une diminution du signal d'émission de fluorescence du Trp. La DsbE2t possède également un Trp localisé juste avant sa séquence signature CXXC. Dans la DsbE1t, un Trp est aussi présent mais localisé quatre résidus en amont de la séquence signature.

Nous avons donc dans un premier temps réalisé les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la DsbE1t et de la DsbE2t sous forme réduite et oxydée. Ainsi, la DsbE1t sous forme réduite et oxydée présente un maximum d'excitation de fluorescence pour une longueur d'onde de 284 nm (Figure 44). Le maximum d'émission de fluorescence est retrouvé à 306 nm pour la forme oxydée et à 316 nm pour la forme réduite et l'intensité de fluorescence de la forme réduite de la protéine est très largement supérieure (90%) à celle de la forme oxydée. Ce résultat suggère, si l'on admet que la fluorescence observée est liée essentiellement à la présence du Trp, que comme dans le cas de la Trx1 d'*E. coli*, l'émission de fluorescence du Trp est diminuée par la formation du pont disulfure intramoléculaire. En ce qui concerne la DsbE2t, un maximum d'excitation de fluorescence est observé pour une longueur d'onde de 284 nm pour les formes réduite et oxydée. Le maximum d'émission de fluorescence est retrouvé à 320 nm pour la forme réduite et à 340 nm pour la forme oxydée et l'intensité de fluorescence de la forme oxydée de la protéine est supérieure de 20% à celle de la forme réduite. La variation d'émission de fluorescence entre la forme réduite et la forme oxydée de la DsbE2t est donc inversée comparée à celles observées pour la Trx1 d'*E. coli* et la DsbE1t.

Ces deux protéines présentent donc une différence d'émission de fluorescence entre leur forme réduite et oxydée, ce qui devrait permettre de déterminer le potentiel redox de ces protéines en utilisant cette différence d'intensité de fluorescence.



**Figure 44 : Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des DsbE1t (A), DsbE2t (B).**

La mesure est effectuée en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. La concentration en protéine est de 10  $\mu$ M. Les spectres d'excitation de fluorescence des formes réduites (bleu) et oxydées (rouge) des deux DsbEt sont représentés en pointillés (émission suivie à 340 nm) ; les spectres d'émission de fluorescence sont représentés en ligne pleine (excitation à 284 nm). L'oxydation des DsbE1t et DsbE2t se fait par ajout d'un excès de DTNB (100  $\mu$ M de DsbE pour 300  $\mu$ M de DTNB) en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 pendant 20 min à température ambiante. L'excès de DTNB ainsi que TNB<sup>-</sup> formé est éliminé par passage sur colonne de dessalage EconoPac 10DG.

La constante d'équilibre redox  $K_{\text{éq}}$  a été déterminée en se basant sur la variation du message de fluorescence des DsbEt à différents rapports de concentration de GSH/GSSG. Les formes oxydées des deux DsbEt ont été incubées en présence de 100  $\mu$ M de GSSG avec des concentrations croissantes en GSH (0 à 180 mM) pendant 20 H. La fraction de DsbEt sous forme réduite à l'équilibre est calculée à partir des intensités de fluorescence des formes complètement oxydées et réduites des DsbEt.

Les résultats ont été ajustés par régression non linéaire à l'équation 1, permettant la détermination de la valeur de la constante d'équilibre ( $K_{\text{éq}}$ ). R correspond à la quantité de protéine sous forme réduite obtenue à l'équilibre.

$$R = ([\text{GSH}]^2/[\text{GSSH}]) / (K_{\text{éq}} + [\text{GSH}]^2/[\text{GSSH}]) \quad (\text{Equation 1})$$

Les constantes d'équilibre déterminées pour la DsbE1t et la DsbE2t sont respectivement de  $0,27 \pm 0,01$  et  $0,80 \pm 0,01$  M. Des potentiels redox de -0,230 et -0,237 V ont ainsi pu être déterminés respectivement pour les DsbE1t et DsbE2t à 25°C et à pH 7,0. Les potentiels redox ont été calculés grâce à l'équation de Nernst (Equation 2) en utilisant une valeur de -0,240 V pour le potentiel redox du glutathion ( $E'_{0 \text{ GSH/GSSG}}$ ) (Aslund *et al.*, 1997).

$$E'_0 = E'_0_{\text{GSH/GSSG}} - (RT/nF) \ln K_{\text{éq}} \quad (\text{Equation 2})$$

Le potentiel redox mesuré pour les deux DsbEt est plus proche de celui des Trx cytoplasmiques (-0,230 à -0,270 V) et des DsbE (-0,217 to -0,175 V) que des PDI (-0,110 V) ou des DsbA (-0,124 V), ce qui suggère que ces deux protéines doivent être plutôt des protéines qui possèdent un rôle de réducteur.

#### II.2.2.2 Détermination des pKa des Cys

La titration des pKa des Cys des DsbE1t et DsbE2t a été réalisée en utilisant le réactif chimique 2PDS pour des pH allant de 5,5 à 9,5 pour lesquels l'enzyme sauvage ainsi que les deux variants monocystéiniques sont stables. L'ajout de réducteur sur l'enzyme sauvage isolée après réaction avec le 2PDS n'entraîne pas de libération de pyridine-2-thione, ce qui montre que pour la DsbE1t comme pour la DsbE2t cette réaction entraîne la formation d'un pont disulfure intramoléculaire (résultats non montrés).

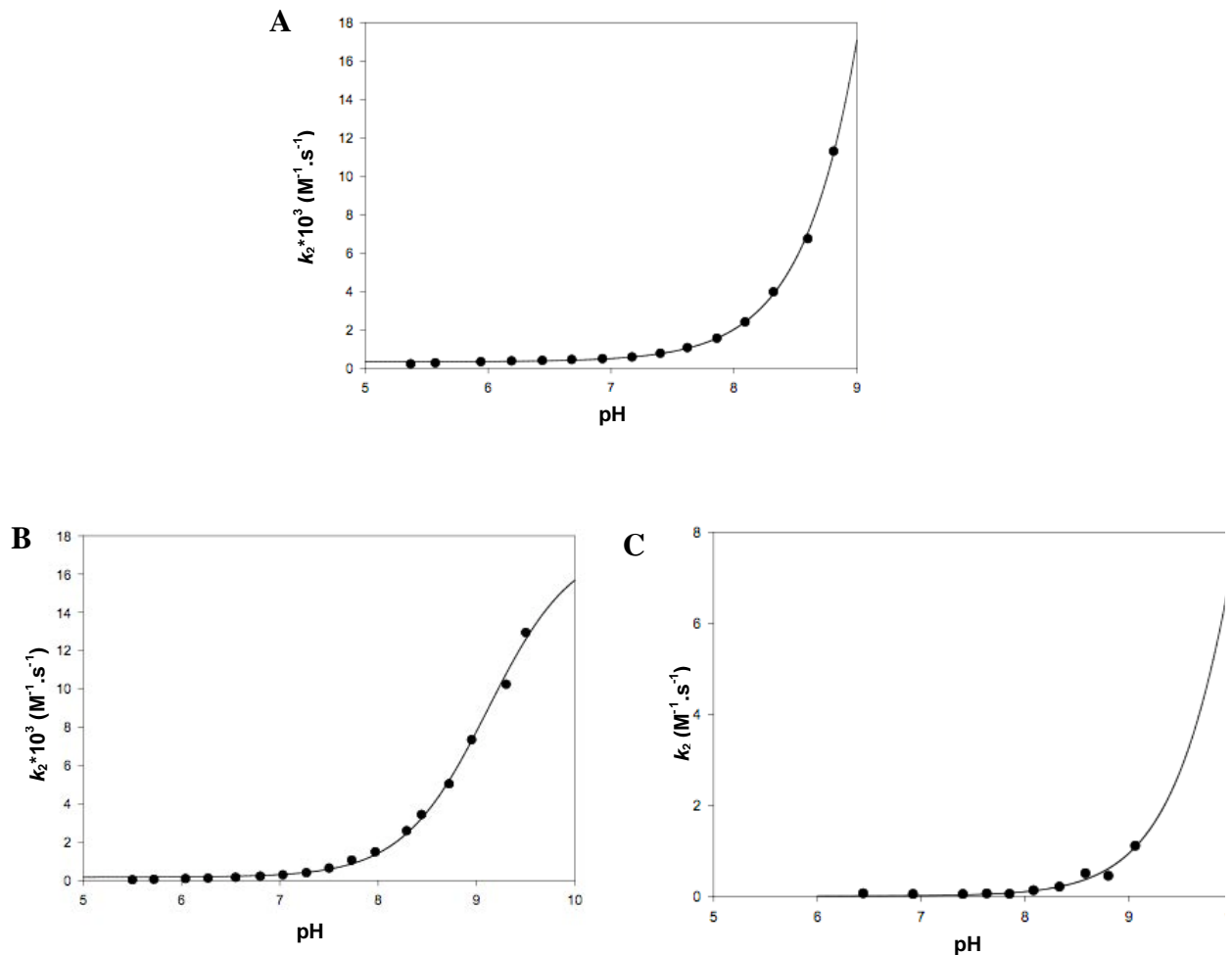
Pour la DsbE1t sauvage, la réaction suit une cinétique de pseudo-premier-ordre avec la formation de deux moles de pyridine-2-thione par mole d'enzyme. La courbe représentant la constante  $k_2$  (constante de vitesse de pseudo-second ordre) en fonction du pH s'ajuste sur une monosigmoïde avec un  $pK_{\text{app}}$  supérieur à 9 et un  $k'$  de  $1.10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 45). Afin de pouvoir assigner plus précisément un  $pK_{\text{app}}$  à chacune des Cys du site actif, leurs  $pK_{\text{app}}$  ont été déterminés par la même technique pour les deux variants DsbE1t C34A et C37A. Les résultats obtenus montrent des  $pK_{\text{app}}$  supérieurs à 9 pour les Cys34 et Cys37 respectivement avec des valeurs de  $k'$  respectivement de  $2,4.10^4$  et  $29,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Si pour les deux Cys les  $pK_{\text{app}}$  sont du même ordre de grandeur avec des valeurs supérieures à 9, leur constante de vitesse varie d'un facteur 800. Ceci peut s'expliquer soit par une différence de réactivité entre ces deux Cys, soit par une différence d'accessibilité. Des études précédentes ont permis de montrer que la Cys du glutathion, assimilée à une Cys libre, présentait un pKa de 8,8 et une valeur de  $k'$  de  $5,34.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Marchal *et al.*, 1999). La Cys34 présente une réactivité similaire à celle d'une Cys libre non activée. Par contre, la Cys37 présente une réactivité beaucoup plus faible, ce qui reflète probablement un problème d'accessibilité de cette Cys dans le mutant C34A.

Le fait que dans l'enzyme sauvage les deux Cys réagissent avec la même vitesse peut s'expliquer par le fait que dans ces conditions, la Cys37 attaque la Cys34 pour former un pont



**Résultats : Disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis***

disulfure intramoléculaire et n'attaque pas le 2PDS, la réaction intramoléculaire étant une réaction très favorable. Au vu des valeurs de  $pK_{app}$  élevées pour les deux Cys ainsi que de la valeur du  $k_2$ , la Cys catalytique est accessible mais n'est pas activée dans l'enzyme libre.



**Figure 45 :** Variation en fonction du pH de la constante de pseudo second-ordre  $k_2$  de la réaction des groupements thiols de la DsbE1t de *N. meningitidis* sauvage (A) ou des variants C37A (B) et C34A (C) avec le 2PDS.

Les expériences ont été réalisées à 25°C avec un polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM de pH 5,5 à 9 pour l'enzyme sauvage et le variant C34A et de pH 5,5 à 9,5 pour le variant C37A. Pour chaque expérience, la concentration en enzyme est de 10  $\mu$ M, celle en 2PDS est de 200  $\mu$ M. Les valeurs de  $k_2$  ont été ajustées à l'équation d'une monosigmoïde ( $f = y + (k' / (1 + 10^{(pK_a - pH)}))$ ) et les paramètres obtenus sont les suivants : (A)  $pK_{app} = 9,7 \pm 0,3$  et  $k' = (1,0 \pm 0,7).10^5 M^{-1}.s^{-1}$ , (B)  $pK_{app} = 9,5 \pm 0,1$  et  $k' = (2,4 \pm 0,2).10^4 M^{-1}.s^{-1}$  (C)  $pK_{app} = 10,5 \pm 2,7$  et  $k' = 29,6 \pm 0,1 M^{-1}.s^{-1}$ . Les points représentent les valeurs expérimentales et les traits continus représentent les ajustements.

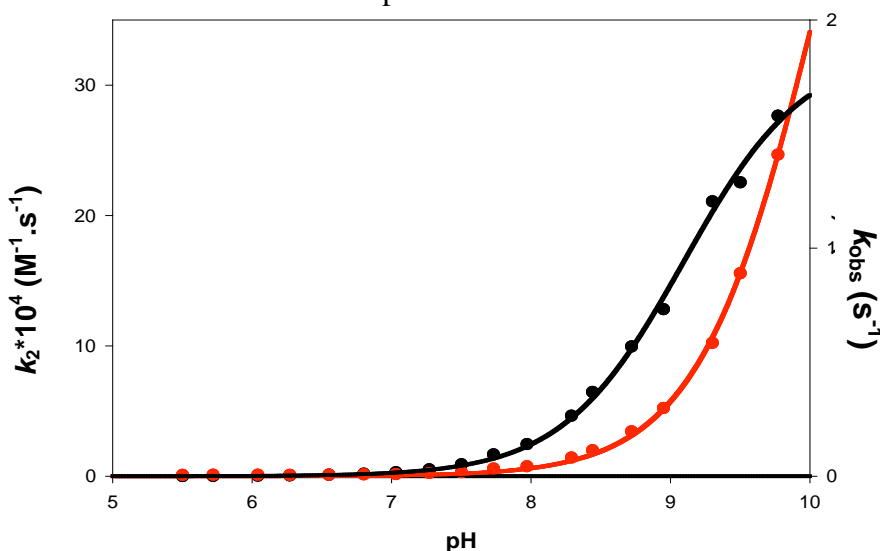
La réaction de la DsbE2t sauvage avec le 2PDS donne un profil de variation de la  $DO_{343 \text{ nm}}$  en fonction du temps biexponentiel, reflétant deux vitesses de réaction et permettant la libération de deux moles de pyridine-2-thione par mole d'enzyme. Comme dit précédemment, au cours de cette réaction entre l'enzyme sauvage et le 2PDS, on observe la

## Résultats : Disulfures oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*

formation d'un pont disulfure intramoléculaire. La seconde vitesse représente probablement la vitesse de l'attaque de la Cys33 sur l'intermédiaire Cys30-pyridine-2-thione, entraînant la libération d'une mole de pyridine-2-thione. Dans ces conditions, cette réaction ne peut pas être considérée comme une réaction de second ordre mais est une réaction de premier ordre.

La courbe, associée à la première vitesse, représentant la constante  $k_2$  en fonction du pH s'ajuste sur une monosigmoïde donnant des valeurs de  $pK_{app}$  supérieure à 9 avec un  $k'$  de  $3,5 \cdot 10^5$

$M^{-1} \cdot s^{-1}$  (Figure 46). La courbe représentant la constante de vitesse observée ( $k_{obs}$ ) de formation du pont disulfure intramoléculaire, en fonction du pH donne une valeur de  $pK_{app}$  supérieur à 9 pour la Cys33 avec une valeur de  $k_{obs \max}$  de  $4,5 \text{ s}^{-1}$ . Les  $pK_{app}$  ont été déterminés par la même technique pour les deux variants C30A et C33A. Pour les variants C30A et C33A, les valeurs de  $pK_{app}$  obtenues sont toutes les deux supérieures à 9 avec des  $k'$  de  $7,7 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$  et  $10,7 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$  (Résultats non montrés). Ces résultats montrent que dans l'enzyme sauvage les deux Cys sont accessibles mais ne sont pas activées.



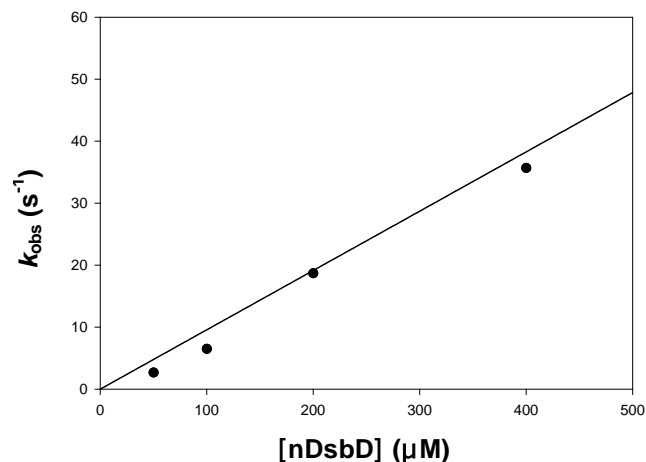
**Figure 46 :** Variation en fonction du pH des constantes de vitesse de la réaction de la DsbE2t sauvage de *N. meningitidis* avec le 2PDS.

Les expériences ont été réalisées à 25°C avec un polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM de pH 5,5 à 9. Pour chaque expérience, la concentration en enzyme est de 10  $\mu M$ , celle en 2PDS est de 200  $\mu M$ . La courbe noire représente la constante de pseudo second-ordre et la courbe rouge la constante de vitesse observée. Pour la courbe noire, les résultats obtenus ont été ajustés à l'équation d'une monosigmoïde ( $f = y + (k' / (1 + 10^{(pK_a - pH)}))$ ) et les paramètres obtenus sont les suivants :  $pK_{app} = 9,2 \pm 0,1$  et  $k' = (3,5 \pm 0,2) \cdot 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ . Pour la courbe rouge, les résultats obtenus ont été ajustés à l'équation d'une monosigmoïde ( $f = y + (k_{obs \max} / (1 + 10^{(pK_a - pH)}))$ ) et les paramètres obtenus sont les suivants :  $pK_{app} = 10,6 \pm 0,2$  et  $k_{obs \max} = 4,5 \pm 0,1 s^{-1}$ . Les points représentent les valeurs expérimentales et les traits continus représentent les ajustements.

### II.2.3 Réduction des DsbEt oxydées par la nDsbD

Le clonage de la séquence codant la nDsbD, ainsi que la production et la purification de la protéine nDsbD de *N. meningitidis* ont été réalisés au laboratoire par Laure Selme. Les spectres d'émission de fluorescence des formes oxydées et réduites de la nDsbD étant identiques, la réduction des deux DsbEt oxydées sous forme pont disulfure par le domaine nDsbD de *N. meningitidis* a été suivie en se basant sur la différence d'émission de fluorescence des DsbEt lors de leur passage d'une forme oxydée à une forme réduite.

Dans le cas de la DsbE1t oxydée, et pour des concentrations en nDsbD allant de 50 à 400  $\mu\text{M}$ , une augmentation du signal de fluorescence est observée. Les courbes obtenues s'ajustent sur l'équation d'une monoexponentielle croissante ( $y = ae^{-k_{\text{obs}}.t} + c$ ) ce qui permet d'obtenir une valeur de  $k_{\text{obs}}$  pour chaque concentration en nDsbD. La variation du  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration en nDsbD s'ajuste à l'équation d'une droite et donne une valeur de  $k_2$  de  $1.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (Figure 47).



**Figure 47 :** Cinétique de réduction de la DsbE1t par le domaine N-ter de la protéine DsbD (nDsbD).

Les vitesses ont été mesurées en suivant la variation du message d'émission de fluorescence de la DsbE1t qui passe de sa forme oxydée à réduite, à l'état pré-stationnaire grâce à un appareil de cinétique rapide (Stopped-flow). Les expériences ont été réalisées à  $25^\circ\text{C}$ , en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm et seules les longueurs d'ondes d'émission supérieures à 320 nm sont collectées grâce à un filtre. La concentration en DsbE1t sous forme oxydée est de 10  $\mu\text{M}$  et celle en nDsbD réduite varie de 50 à 400  $\mu\text{M}$ . Les valeurs expérimentales obtenues ont été ajustées à l'équation d'une droite ( $y = ax + b$ ) qui donne une valeur de  $k_2$  de  $(1,0 \pm 0,1).10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

En ce qui concerne la DsbE2t, dans les mêmes conditions, aucune variation de signal d'émission de fluorescence n'a pu être observée en présence de nDsbD réduite jusqu'à une concentration de 400  $\mu\text{M}$ . Ceci peut être dû soit au fait que le DsbE2t sous forme oxydée n'est

## **Résultats : Disulfures oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis***

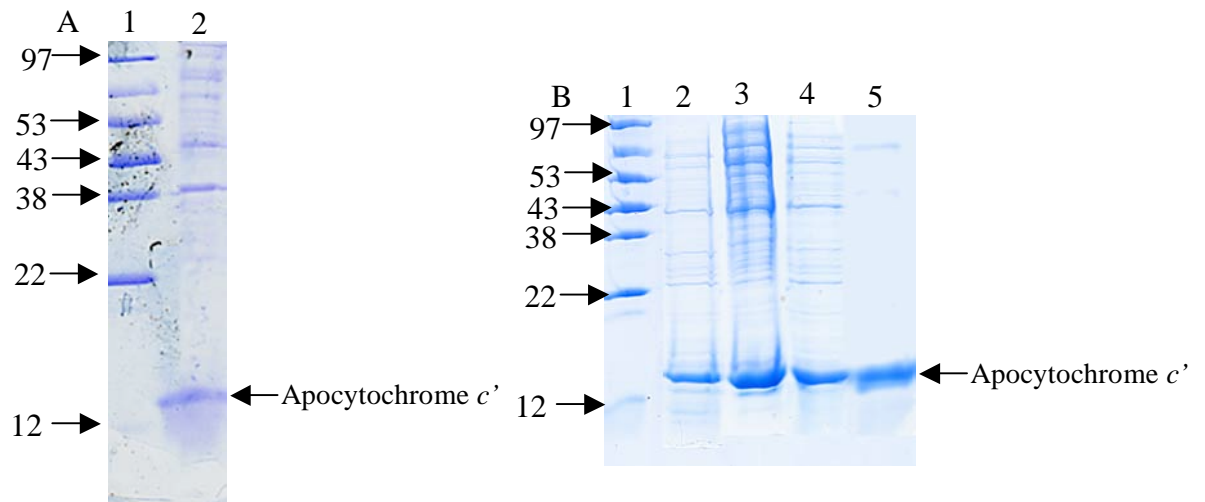
pas réduite par la protéine nDsbD, soit à un problème de sensibilité de la technique. Pour s'en assurer, la DsbE2t oxydée est incubée en présence de nDsbD réduite pendant 10 min et les deux protéines sont ensuite séparées par chromatographie échangeuse d'anions. Le dosage des groupements thiols libres sur ces deux protéines montre que la DsbE2t se retrouve sous forme réduite alors que la nDsbD est sous forme oxydée. Le domaine N-terminal de la protéine DsbD est donc bien capable de réduire la DsbE2t.

### II.2.4 Réduction d'un apocytochrome *c* oxydé par les DsbE

#### II.2.4.1 Production/purification d'un apocytochrome *c* oxydé

Un pré-requis pour pouvoir tester la capacité des DsbE à réduire un apocytochrome *c* oxydé était d'obtenir de l'apocytochrome *c* en quantité suffisante. Nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement au cytochrome *c'* de *N. meningitidis*, qui est décrit être impliqué dans la résistance au NO. La production ainsi que la purification de ce cytochrome *c'* avait été récemment décrite (Huston *et al.*, 2005). Cependant, ce protocole décrit une production du cytochrome *c'* dans le périplasma ce qui aboutit à l'obtention de cytochrome *c'* mature mais en assez faible quantité. Par ce protocole, nous avons obtenu effectivement du cytochrome *c'* sous forme holo. Pour obtenir une grande quantité de cytochrome *c'* sous forme apo, nous avons mis au point un nouveau protocole de production de l'apocytochrome *c'* dans le cytoplasme.

Le cytochrome *c'* a été produit sous une forme tronquée soluble (délétion de la séquence codante correspondant à la séquence d'export au périplasma ainsi qu'à la séquence d'ancrage à la membrane). Un protocole de purification a ensuite été élaboré, qui a permis d'obtenir l'apocytochrome *c'* pur. Comme pour les DsbE1t et DsbE2t, la pureté de la protéine a été vérifiée sur gel SDS-PAGE (Figure 48) ainsi que par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (résultats non montrés). Le rendement de cette purification est de 53 mg par litre de culture.

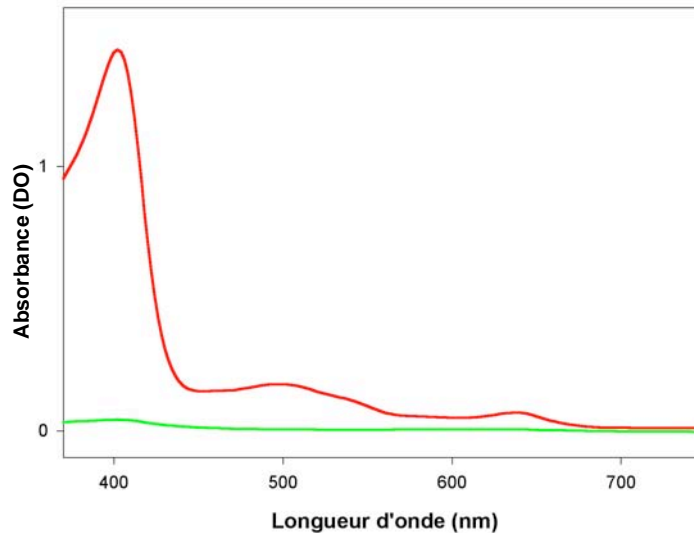


**Figure 48 :** Gels SDS-PAGE de production (A) et de purification (B) de l'apocytochrome *c'* de *N. meningitidis*.

(A) 1 : marqueur de taille, 2 : extrait cellulaire. Les productions ont été réalisées dans des cellules BL21(DE3). Les cultures sont induites à l'IPTG lorsque la  $DO_{600\text{ nm}}$  est de 0,6 et les cellules sont laissées sous agitation pendant 3 H à 37°C.

(B) 1 : marqueur de taille, 2 : surnageant de sonication, 3 : échantillon après chromatographie par filtration sur gel (ACA54), 4 : échantillon après chromatographie échangeuse d'anions (Q-sépharose), 5 : échantillon après chromatographie hydrophobe (Phényl-sépharose).

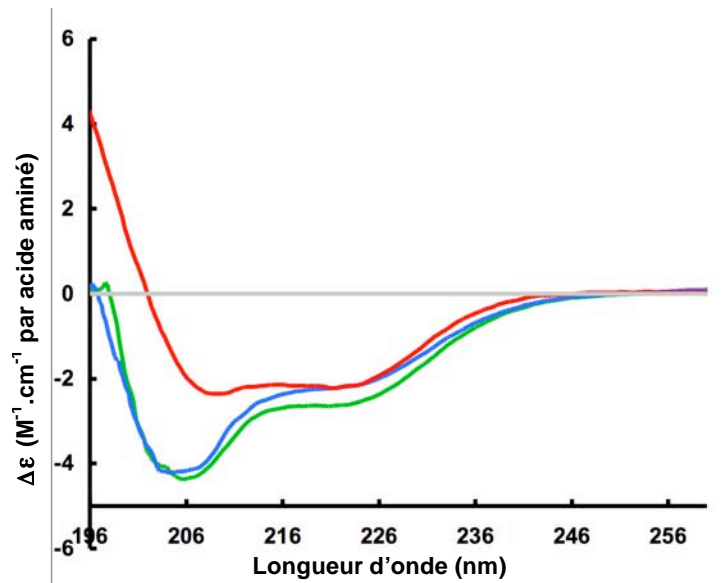
Les spectres d'absorbance de la protéine ont été réalisés de 350 à 600 nm afin de vérifier que la protéine est bien sous forme apo. En effet, lorsque les cytochromes *c* sont sous forme holo, ils présentent un spectre d'absorbance caractéristique composé de trois pics d'absorbance dans la région visible : les bandes  $\gamma$  (415 nm) (ou de Soret),  $\beta$  (500 nm) et  $\alpha$  (650 nm). Lorsque le cytochrome *c* se retrouve sous forme apo, aucune bande n'est observable entre 350 et 750 nm. Le spectre du cytochrome *c'* obtenu après purification ne présente aucune des trois bandes d'absorbance caractéristique de la présence de l'hème, ce qui montre que le cytochrome *c'* purifié est bien sous forme apocytochrome (Figure 49).



**Figure 49 : Spectres d'absorbance du cytochrome *c'* de *N. meningitidis* sous forme holo et apo.**

Les spectres d'absorbance sont réalisés à 25°C, en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Les concentrations en cytochromes *c'* sous forme holo et apo sont de 100  $\mu$ M et les spectres d'absorbance sont réalisés pour des longueurs d'onde allant de 350 à 750 nm. Le spectre d'absorbance de la forme holo du cytochrome *c'* de *N. meningitidis* est représenté en rouge et le spectre du cytochrome *c'* obtenu après purification est représenté en vert.

Les spectres de dichroïsme circulaire réalisés sur l'holocytochrome *c'* présentent deux bandes négatives à 208 et 222 nm, caractéristiques d'une structuration en hélice  $\alpha$  (Figure 50). Ceci était attendu puisque les cytochromes *c'* sont constitués de quatre hélices  $\alpha$ . Ces deux bandes négatives sont également retrouvées sur les spectres réalisés sur l'apocytochrome *c'* réduit et oxydé, ce qui prouve que ces deux formes d'apocytochrome *c'* sont également bien structurées en hélice  $\alpha$ . La structure préexiste donc dans la forme apo même si une différence significative des spectres est observée entre les formes holo et apo oxydée par rapport à la forme apo réduite à 222 nm, ce qui montre une différence du taux en hélice  $\alpha$  (Figure 50). La différence observée à 208 nm n'est pas significative et ne peut pas être interprétée en terme de différence de structuration des protéines les unes par rapport aux autres.



**Figure 50 :** Spectres de dichroïsme circulaire du cytochrome *c'* sous forme holo et apo.

Le spectre de dichroïsme circulaire du cytochrome *c'* sous forme holo est représenté en rouge, celui de l'apocytochrome *c'* sous forme réduite est représenté en vert et celui de l'apocytochrome *c'* sous forme oxydée pont disulfure est représenté en bleu. La forme oxydée a été obtenue en mélangeant l'apocytochrome avec du 2PDS en tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0 pendant 20 min à température ambiante. L'excès de 2PDS ainsi que la dithiopyridine formés sont éliminés par passage sur colonne de dessalage EconoPac10DG. Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe CD6 Jobin Yvon avec une vitesse de 2 nm/s. Les cuves en quartz utilisées présentent un trajet optique de 1 mm. Les échantillons contiennent 12,5  $\mu\text{M}$  de protéine en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

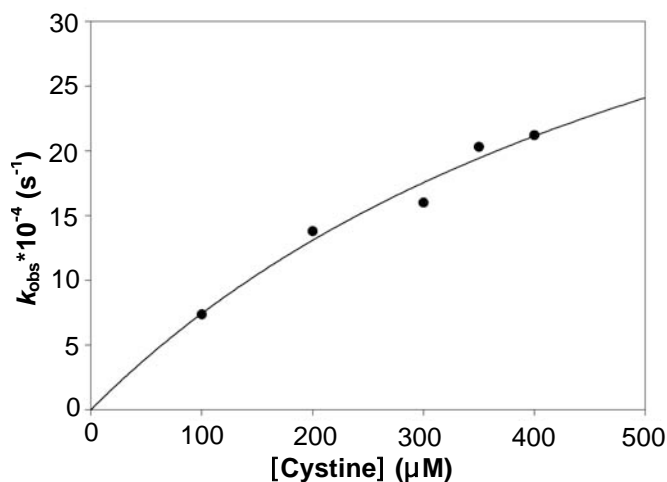
#### II.2.4.2 Réduction de l'apocytochrome *c'* oxydé par les DsbE1t et DsbE2t

La technique utilisée pour suivre la réduction de l'apocytochrome *c'* oxydé par les DsbEt est basée sur la différence d'émission de fluorescence des DsbEt lors du passage de leur forme réduite à oxydée, l'apocytochrome *c'* ne présentant pas de différence d'émission de fluorescence lors du passage de sa forme oxydée à sa forme réduite (résultats non montrés).

La vitesse de réduction de l'apocytochrome *c'* oxydé par la DsbE1t a été suivie à la fois sur un fluorimètre et sur un appareil de cinétique rapide (Stopped-flow), en faisant varier la concentration en apocytochrome *c'*. Les tests réalisés pour une concentration de 10  $\mu\text{M}$  d'enzyme et des concentrations en apocytochrome *c'* allant jusqu'à 200  $\mu\text{M}$  ne montrent aucune variation de l'émission de fluorescence. Dans ces conditions, l'apocytochrome *c'* n'est

## Résultats : Disulfures oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*

pas réduit par la DsbE1t. Ceci peut s'expliquer soit par l'absence de reconnaissance entre les deux partenaires, soit par l'absence de réactivité pouvant être liée à des potentiels redox non adaptés entre ces deux partenaires. Le fait que la DsbE1t soit capable de réduire la Cystine (Figure 51), certes avec une constante de vitesse faible ( $k_2 = 8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  comparé à la valeur obtenue pour la réduction de la cystine par la Trx1 d'*E. coli* :  $k_2 = 703 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Dr. Mathias Antoine, résultats non publiés)) montre que cette protéine est bien une oxydoréductase capable de réduire les ponts disulfures. Cette faible réactivité vis-à-vis de la cystine pourrait être due au fait que la réaction est faite à pH 8,0 et que dans ces conditions la Cys catalytique, qui présente un pKa élevé (supérieur à 9), n'est pas sous forme thiolate. Au contraire, le pKa de la Cys catalytique de la Trx étant de 7,5, à pH 8,0 elle sera majoritairement sous forme thiolate ce qui peut expliquer sa meilleure réactivité vis-à-vis de la cystine.



### Figure 51 : Réduction de la cystine par la DsbE1t.

Cette expérience a été réalisée à 25°C dans du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. La concentration en DsbE1t est de 10  $\mu\text{M}$  et la concentration en cystine varie de 100 à 400  $\mu\text{M}$ . Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation suivante :  $k_{\text{obs}} = k_{\text{obs max}} S / (K_S + S)$ . Les paramètres obtenus sont  $k_{\text{obs}} = (5,5 \pm 1,8) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  et  $K_S = 686 \pm 308 \mu\text{M}$ . Les points représentent les valeurs expérimentales et la ligne continue l'ajustement.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec la DsbE2t, et dans les mêmes conditions aucune variation de l'émission de fluorescence n'est observée que ce soit pour la réduction de l'apocytochrome *c'* ou pour la réduction de la cystine. Le fait qu'aucune réduction ne soit observée, même avec la cystine doit provenir d'un problème de sensibilité de la technique comme vu précédemment lors de la réduction de la DsbE2t par la protéine nDsbD. Il semblerait que la méthode de suivi de l'émission de fluorescence entre les formes réduites et oxydées de l'enzyme ne soit pas adaptée pour l'étude de la DsbE2t.



### **II.3 Détermination du rôle des DsbE *in vivo***

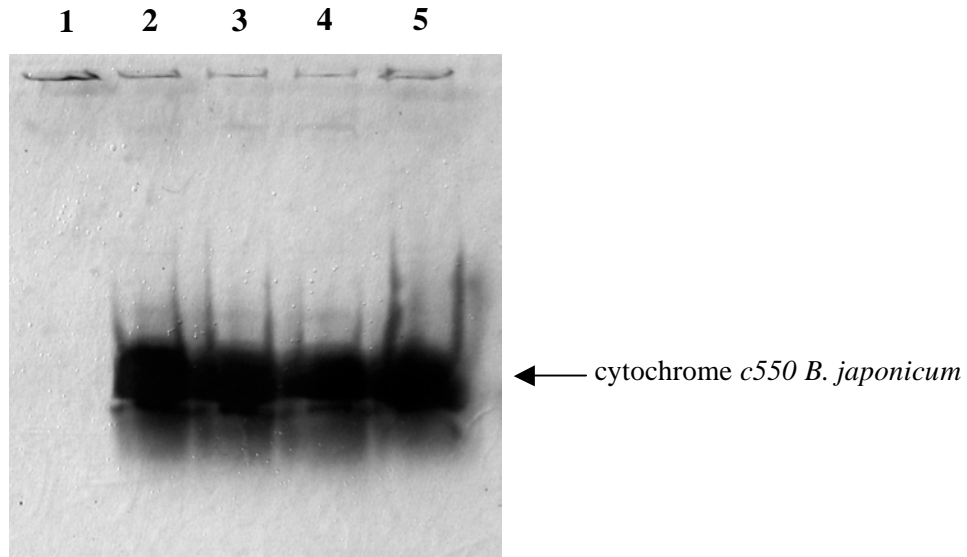
Afin d'identifier la DsbE impliquée dans la maturation des cytochromes *c* chez *N. meningitidis*, nous avons entrepris une étude de complémentation fonctionnelle de souches bactériennes délétées du gène *dsbE*. Le phénotype associé à ces souches mutantes se traduit par leur incapacité à synthétiser des cytochromes *c* matures. Deux souches mutantes ont été testées : 1) une souche  $\Delta ccmG$  d'*E. coli* qui constitue le système modèle pour l'étude des systèmes de maturation de type I, et 2) une souche  $\Delta ccsX$  de *B. pertussis*, qui constitue le système modèle pour l'étude des systèmes de maturation de type II.

#### **II.3.1 Tests de complémentation chez *E. coli***

Cette expérience est réalisée avec des cellules EC29 d'*E. coli* n'exprimant plus la protéine CcmG. Les cellules EC29 ainsi que les plasmides PRJ3290 et pEC210 nous ont été fournis par le Dr Linda Thöny-Meyer de l'Institut de Microbiologie de Zurich. Le plasmide pRJ3290 contient l'ORF codant le cytochrome *c550* de *B. japonicum* et le plasmide pEC210 contient l'ORF codant la CcmG d'*E. coli*.

Le plasmide pRJ3290 utilisé pour transformer des cellules EC29 d'*E. coli* permet de surproduire le cytochrome *c550* qui sera visualisable sur gel SDS-PAGE lorsque les cultures sont réalisées en anaérobiose dans un milieu contenant des nitrites. Le pEC210 contenant soit l'ORF codant la CcmG, soit une ORF codant une des trois DsbE putative de *N. meningitidis* est utilisé pour transformer les cellules ayant incorporé le plasmide pRJ3290.

Après fractionnement subcellulaire des culots cellulaires, les fractions périplasmiques sont déposées sur gel SDS-PAGE et traitées pour mettre en évidence la présence de l'hème. Ceci permet de mettre en évidence les cytochromes *c* ayant fixé l'hème de façon covalente. Les résultats sont présentés dans la Figure 52.



**Figure 52 : Gel SDS-PAGE de coloration de l'hème à l'*o*-dianisidine de fractions périplasmiques.** Les tests ont été réalisés dans des cellules d'*E. coli* EC29 n'exprimant plus le gène *ccmG*. Ces cellules ont été transformées par : 1) le plasmide pRJ3290 *c550 B. japonicum* ; 2) les plasmides pRJ3290 et pEC210 contenant la séquence codant la CcmG d'*E. coli* ; 3) les plasmides pRJ3290 et le plasmide pEC210 contenant la séquence codant la DsbE1 de *N. meningitidis* ; 4) le plasmide pRJ3290 et le plasmide pEC210 contenant la séquence codant la DsbE2 de *N. meningitidis* et 5) le plasmide pRJ3290 et le plasmide pEC210 contenant la séquence codant la DsbE3 de *N. meningitidis*. Les cultures sont réalisées en conditions anaérobies en présence de nitrites. Après fractionnement subcellulaire, les fractions périplasmiques sont déposées sur gel SDS-PAGE. La présence de l'hème au sein des cytochromes *c* est révélée par une technique de coloration spécifique de l'hème par le réactif chimique *o*-dianisidine.

En absence de CcmG (piste 1), aucune bande n'est visible sur le gel confirmant qu'en absence de DsbE le cytochrome *c550* n'est pas maturé. Par contre, quel que soit le plasmide cotransformé dans les cellules, on observe une bande sur gel correspondant au cytochrome *c550* ayant fixé l'hème. Deux hypothèses peuvent alors être envisagées : 1) les trois DsbE putatives sont effectivement capables de maturer les cytochromes *c*, ou 2) la réduction des Cys de l'apocytochrome *c550* est aspécifique et liée à la forte concentration dans le périplasma des DsbE qui ont un caractère réducteur, suite à une forte surproduction des DsbE par le plasmide pEC210.

Cependant, il est à noter que le système de maturation des cytochromes *c* chez *E. coli* est un système de type I et dans ce type de système, contrairement à ce qui est proposé pour les systèmes de type II, CcmG ne réduit pas directement l'apocytochrome *c* mais transfère ses électrons à la protéine CcmH qui réduit l'apocytochrome *c*. Il est donc fortement probable que ces deux systèmes ne soient pas compatibles et qu'il soit impossible d'utiliser un système I pour pouvoir mettre en évidence le rôle d'une DsbE appartenant à un système II.

### II.3.2 Tests de complémentation chez *B. pertussis*

Afin de palier les éventuels problèmes de surproduction de protéines, nous avons décidé d'utiliser une approche basée sur le remplacement de gène par recombinaison homologue. Ceci permet de n'avoir qu'une seule copie du gène *dsbE* et évite ainsi d'avoir un dosage non-physiologique des protéines. Cette expérience est réalisée avec la souche RK102 de *B. pertussis* délétée au niveau du gène *ccsX* (gène *BP036*). Les souches de *B. pertussis* nous ont été fournies par le Pr. Robert G. Kranz (Biology Department, St Louis, USA). Pour l'instant, cette étude n'a pu être menée qu'avec la DsbE1 de *N. meningitidis*. Les expériences de conjugaison et de recombinaison homologue chez *B. pertussis* ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Rudy Antoine (Inserm U629, Lille).

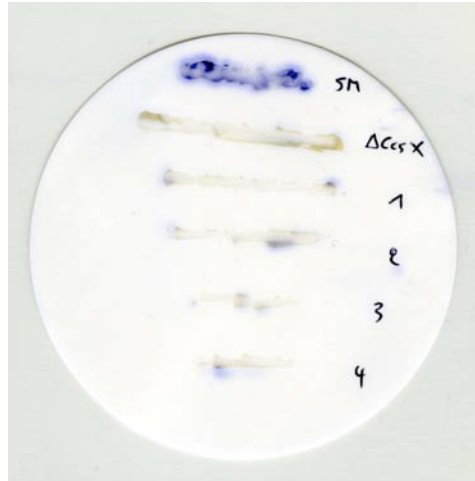
Après s'être assuré que les cellules BC39 délétées du gène *ccsX* ont bien intégré au sein de leur génome la séquence codant la DsbE1 de *N. meningitidis*, un test oxydase a été réalisé. Les souches qui sont oxydase plus, comme *B. pertussis*, possèdent un cytochrome *c* qui est capable d'oxyder le tétraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) (Figure 53). Lorsque le TMPD est oxydé, une coloration bleue apparaît. Une déficience en cytochrome *c* empêche l'oxydation du TMPD et aucune coloration n'est alors observée.



**Figure 53** : Schéma de la réaction du test oxydase avec le réactif TMPD (d'après Beckett *et al.*, 2000)

Pour l'instant, ces tests n'ont été réalisés que pour la DsbE1. Les résultats obtenus montrent clairement une coloration bleue pour la souche sauvage (ligne 1), et l'absence de coloration pour la souche délétée du gène *ccsX* (ligne 2). En ce qui concerne les souches complémentées par le gène *dsbe1* (ligne 3 à 6), les résultats sont moins tranchés (Figure 54). On observe une coloration bleue dans les zones de plus forte densité cellulaire. Il semblerait donc que la DsbE1 de *N. meningitidis* complémente partiellement la déficience du mutant  $\Delta ccsX$  de *B. pertussis*.

## Résultats : Disulfures oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*



**Figure 54 :** Résultats du test TMPD après complémentation par la DsbE1 de *N. meningitidis*.

Les différentes souches sont étalées sur une membrane de nitrocellulose et cette membrane est trempée dans une solution de TMPD 10%.

SM : Souche sauvage de *B. pertussis* ;  $\Delta ccsX$  : souche RK102 de *B. pertussis* délétée du gène codant la protéine CcsX ; 1, 2, 3 et 4 : Souche RK102 complétementée avec le gène *dsbE1*.

En parallèle, des expériences de Western-Blot ont été réalisées afin de s'assurer que pour chaque clone la protéine DsbE1 est exprimée et les résultats obtenus montrent que chacun des 4 clones de *B. pertussis* obtenus après conjugaison exprime la protéine DsbE1.

La protéine DsbE1 étant effectivement exprimée dans les souches conjuguées de *B. pertussis*, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénotype de complémentation partielle : 1) la DsbE1 pourrait être toxique pour les cellules. En effet, très peu de conjuguants ont pu être obtenus et un retard important de croissance est observé pour chaque clone obtenu après conjugaison ; 2) l'efficacité de réduction des apocytochromes *c* de *B. pertussis* par la DsbE1 de *N. meningitidis* pourrait être moins efficace que celle par CcsX, liée à des spécificités structurales légèrement différentes liées à l'espèce ; ou 3) le taux d'expression de la *dsbE1* dans la souche RK102 de *B. pertussis* est peut-être inférieur à celui de *ccsX*.

Discussion  
Perspectives



Les études biochimiques et d'enzymologie menées au laboratoire avant le début de ma thèse sur les MsrA et MsrB avaient montré que les Msr réduisent la MetSO par un mécanisme catalytique à trois étapes. La première étape, appelée étape réductase, conduit à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys catalytique et au relargage d'une mole de Met. Ensuite, un pont disulfure intramoléculaire est formé *via* l'attaque de la seconde Cys, appelée Cys de régénération, sur l'acide sulfénique. Ce pont disulfure intramoléculaire est ensuite réduit dans une ultime étape par la Trx, permettant la régénération des Msr sous forme réduite. Des études approfondies d'enzymologie par des approches expérimentales originales avaient aussi montré que pour les MsrA et MsrB, l'étape cinétiquement limitante de la réaction globale est associée à la réduction du pont disulfure par la Trx, et plus particulièrement au relargage de la Trx oxydée ; une reconnaissance spécifique ayant lieu entre la Msr<sub>ox</sub> et la Trx<sub>red</sub>. La vitesse de l'étape réductase est rapide, et cette étape est cinétiquement déterminante dans le mécanisme à deux étapes qui permet la formation du pont disulfure intramoléculaire (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004 ; Boschi-Muller *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'identifier les résidus conservés du site actif de la MsrA de *N. meningitidis* impliqués dans la catalyse de l'étape réductase et dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde. Ces travaux ont été réalisés sur le domaine MsrA de la protéine PilB. J'ai également initié un nouveau projet visant à caractériser les disulfure oxydoréductases périplasmiques appartenant à la famille des DsbE de *N. meningitidis*, dont fait partie le domaine N-terminal de la protéine PilB.

Ces différents points vont maintenant être discutés en intégrant les données structurales des MsrA et MsrB de *N. meningitidis* obtenues par RX en collaboration avec le Dr F. Tête-Favier de l'équipe Biostructure (UMR 7036 CNRS-UHP), celles de la MsrA d'*E. coli* obtenues par RMN en collaboration avec l'équipe de RMN des protéines dirigée par le Dr. M.T. Cung (UMR 7568 CNRS-INPL), et les résultats de chimie théorique obtenus en collaboration avec l'équipe de Chimie et Biochimie Théoriques dirigée par le Dr. M. Ruiz-López (UMR 7565 CNRS-UHP).

## **Partie I : Mécanisme catalytique de l'étape réductase des MsrA**

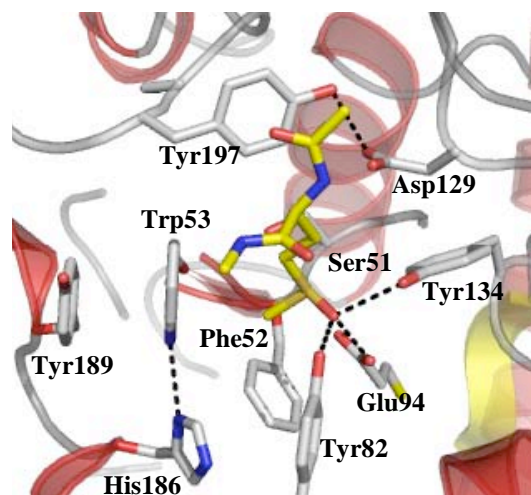
La vitesse de l'étape réductase de la MsrA de *N. meningitidis* est très rapide. Ceci implique une catalyse acide assistée pour augmenter le caractère électrophile de l'atome de

## ***Discussion et Perspectives***

soufre de la fonction sulfoxyde afin de faciliter l'attaque nucléophile du thiolate et de favoriser la formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Les résultats obtenus en combinant l'utilisation des techniques de cinétique rapide et d'ingénierie protéique nous a permis de montrer que 1) la Cys catalytique est activée au sein du complexe enzyme-substrat (le  $pK_{app}$  de la Cys catalytique est diminué d'au moins 2 unités de pH dans le complexe Michaelien par rapport à la MsrA libre) 2) les résidus Tyr82, Tyr134 et Glu94 jouent un rôle essentiel dans la catalyse de l'étape réductase, le Glu94 ayant un rôle supplémentaire en tant que catalyseur acide/base.

Dans un site actif, la stabilisation de la forme thiolate d'une Cys catalytique doit se faire par un environnement chargé positivement ou partiellement positif. Comme décrit dans l'introduction, la liaison SO de la fonction sulfoxyde n'est pas une double liaison, mais plutôt une simple liaison fortement polarisée avec une charge partielle positive sur l'atome de soufre et une charge partielle négative sur l'atome d'oxygène, la polarisation de la liaison étant fortement dépendante de l'environnement. L'examen de la structure du complexe inactif MsrA C51S/AcMetSONHMe résolue par radiocristallographie (Ranaivoson *et al.*, 2007) montre une distance très courte (3,3 Å) entre les atomes de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat et de la Cys catalytique (mimé par l'atome d'oxygène du résidu Ser51 dans le complexe inactif) (Figure 55). Ainsi la Cys pourrait être stabilisée sous forme thiolate par la charge positive portée par l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde polarisée du substrat au sein du complexe enzyme-substrat. La stabilisation de la fonction sulfoxyde sous forme polarisée impliquerait des interactions entre son oxygène et les chaînes latérales de Glu94, Tyr82 et Tyr134. De plus, la courte distance de 2,5 Å mesurée dans le complexe inactif MsrA/AcMetSONHMe entre l'un des oxygènes du Glu94 et l'oxygène de la fonction sulfoxyde est en faveur d'une liaison H forte entre ces deux atomes, suggérant que la fonction sulfoxyde est protonée et stabilisée par la forme carboxylate du Glu94.





**Figure 55 :** Représentation de la structure du site actif du variant C51S de la MsrA de *N. meningitidis* en complexe avec une molécule de substrat AcMetSONHMe.

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

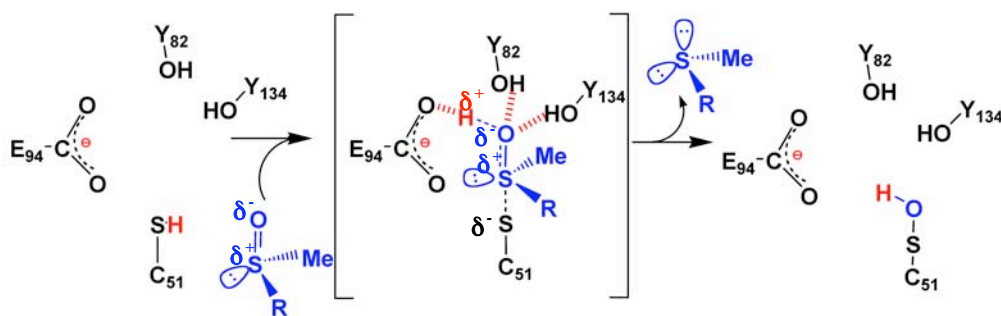
Restait posée la question de la nature du catalyseur acide responsable de la protonation de la fonction sulfoxyde. Le fait que le Glu94 ait été clairement démontré jouer un rôle majeur dans la catalyse, et qu'il soit correctement positionné pour interagir avec l'oxygène de la fonction sulfoxyde suggère qu'il joue ce rôle de catalyseur acide, bien que sa contribution n'ait pas pu être mise en évidence dans les études cinétiques en fonction du pH. De plus, il est probable que le proton qui est transféré sur la fonction sulfoxyde provienne de la Cys catalytique *via* le Glu94.

Concernant le chemin réactionnel permettant de décrire la réaction de réduction d'une fonction sulfoxyde, de géométrie tétraédrique, par un thiolate conduisant à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique, lui aussi de géométrie tétraédrique, rien n'était connu au début du projet. L'étude théorique d'une réaction modèle en solution a été réalisée par des approches de chimie quantique en collaboration avec l'équipe du Dr. M. Ruiz-López. Cette étude a montré que la réaction de réduction du DMSO par le méthanethiol implique deux étapes principales (voir publication Annexe 1 page 133) : 1) l'ionisation du système par transfert de proton du thiol vers le DMSO et la formation d'un intermédiaire ou état de

## *Discussion et Perspectives*

transition de type sulfurane de géométrie bipyramide trigonale, et 2) la décomposition de l'intermédiaire ou état de transition pour former, en solution, soit un acide sulfénique, soit un disulfure. Les énergies d'activation de ces deux étapes sont similaires, autour de 20 kcal/mol. De plus, l'examen de la structure du complexe MsrA C51S/AcMetSONHMe montre que la géométrie et le positionnement relatif de la fonction sulfoxyde par rapport au groupement thiol de la Cys51 (mimé par le groupement hydroxyle de la Ser51) sont compatibles avec la formation d'un intermédiaire ou état de transition de type sulfurane avec une géométrie bipyramide trigonale dans laquelle les atomes d'oxygène de la fonction sulfoxyde et de soufre de la Cys51 seraient en position apicale.

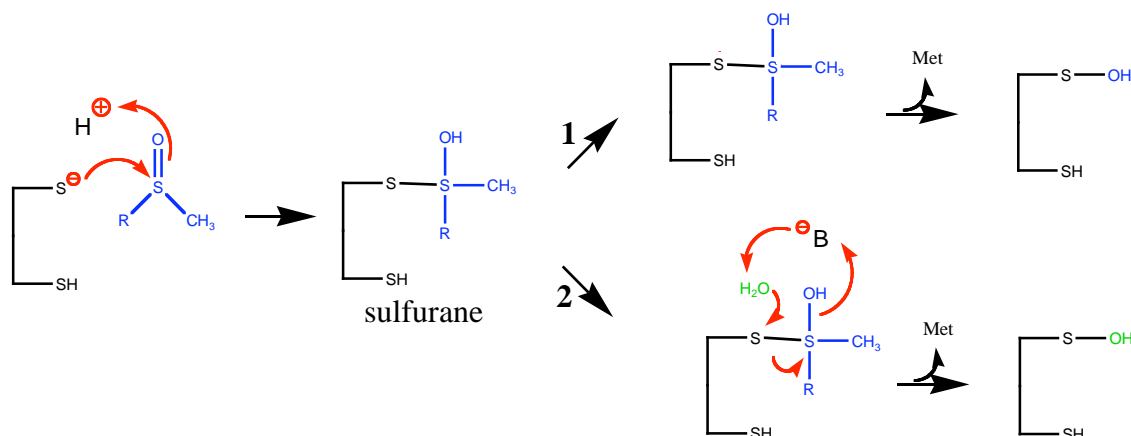
L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un scénario de l'étape réductase des MsrA (Figure 56). Ainsi, dans la MsrA sous forme réduite, la Cys51 catalytique est présente sous forme protonée à pH 8,0. La diffusion du substrat sulfoxyde, fortement hydraté et polarisé en solution, vers le site actif entraîne une désolvatation de la fonction sulfoxyde. Le caractère polarisé de la fonction sulfoxyde est conservé *via* les interactions avec les résidus Tyr82, Tyr134 et Glu94. Dans ce contexte, la stabilisation de la forme thiolate de la Cys51 serait assurée par la charge positive, ou partiellement positive, portée par l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde qui est proche de l'atome de soufre de la Cys51. C'est une catalyse assistée par le substrat. La forme protonée de la fonction sulfoxyde est stabilisée non seulement *via* une liaison H forte avec le résidu Glu94, mais également *via* des liaisons H avec les résidus Tyr82 et Tyr134. Le rôle supplémentaire du Glu94 est probablement de participer au transfert de l'atome d'hydrogène de la fonction thiol de la Cys51 sur l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat. Le caractère polaire de la fonction sulfoxyde doit par ailleurs être un facteur clé dans le transfert de proton. Le mécanisme catalytique, certainement concerté, conduit à l'attaque nucléophile du thiolate de la Cys51 sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde polarisée avec la formation d'un état de transition de type sulfurane qui est stabilisé par les résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134. Cet état de transition évolue ensuite de façon irréversible vers la formation de l'intermédiaire acide sulfénique et la libération de Met.



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

Les quatre groupements fonctionnels des résidus Cys51, Tyr82, Glu94 et Tyr134 essentiels à la catalyse de l'étape réductase sont représentés.  $\text{RSOCH}_3$  et  $\text{RSCH}_3$  représentent respectivement la MetSO et la Met. Le substrat se fixe dans le site actif sous une forme fortement polarisée. Un état de transition de type sulfurane est alors formé et est stabilisé par les résidus du site actif. Le réarrangement de cet état de transition permet la libération d'une mole de Met ainsi que la formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Le chemin conduisant à la formation de cet intermédiaire à partir de l'état de transition de type sulfurane reste à déterminer.

Plusieurs questions restent cependant posées, en particulier celle du chemin emprunté par le proton qui doit être transféré de la Cys catalytique à la fonction sulfoxyde et celle du mécanisme conduisant de l'état de transition de type sulfurane de géométrie bipyramide trigonale à l'intermédiaire acide sulfénique. Ainsi au sein de l'état de transition, le groupement hydroxyle du substrat et l'atome de soufre de la Cys catalytique se retrouvent en position apicale, ce qui exclut la possibilité d'un transfert direct de la fonction hydroxyle sur l'atome de soufre. Deux mécanismes passant par un sulfurane sont donc envisageables, soit *via* un réarrangement, soit *via* l'attaque d'une molécule d'eau (Figure 57).

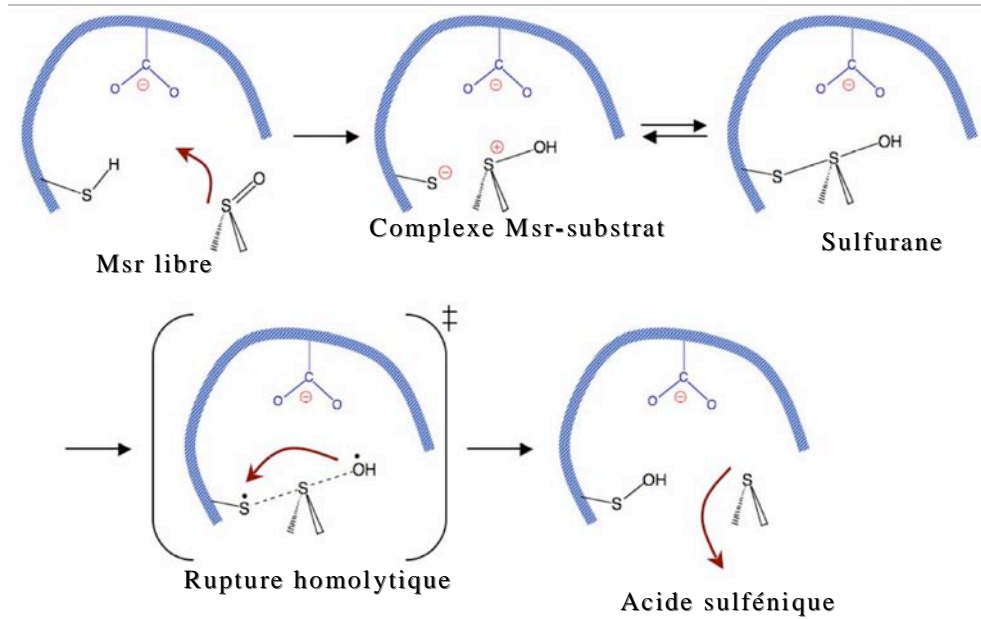


**Figure 57 :** Schéma des deux mécanismes envisageables pour la formation de l'intermédiaire acide sulfénique à partir du sulfurane.

Dans le mécanisme 1, un réarrangement direct du sulfurane est proposé. Dans le mécanisme 2, une molécule d'eau supplémentaire intervient, attaquant le soufre de la Cys51 du sulfurane, la molécule d'eau devant être activée par un catalyseur basique noté B.

## *Discussion et Perspectives*

L'utilisation de substrat ou d'H<sub>2</sub>O marqué à l'O<sup>18</sup> montre que l'oxygène de l'intermédiaire acide sulfénique peut être celui initialement présent sur le substrat sulfoxyde, suggérant que le mécanisme de réarrangement du sulfurane pourrait être celui privilégié dans le site actif de la MsrA (Dr. Mathias Antoine, résultats non publiés). Pour répondre à cette question, l'étude de l'étape réductase des MsrA, à partir des structures tridimensionnelles connues, a été entreprise en collaboration avec l'équipe du Dr M. Ruiz-López (E. Thiriot et G. Monard) par des méthodes mixtes de chimie théorique de type QM/MM, compte tenu de la taille des systèmes enzymatiques à traiter. Bien que préliminaires, les résultats suggèrent que la formation du complexe Michaelien, en modifiant les pKa effectifs des résidus dans le site actif, induit un transfert de proton de la Cys51 vers la MetSO *via* le Glu94. Le système (CysS<sup>-</sup>/MetSOH<sup>+</sup>/Glu<sup>-</sup>) ainsi formé peut conduire à une espèce sulfurane *via* la formation d'une liaison S-S. D'un point de vue énergétique, ces deux espèces sont assez proches et présentent une barrière d'activation faible, de sorte que l'on peut postuler un équilibre thermodynamique entre elles. La formation de l'acide sulfénique se ferait alors selon l'un de ces deux mécanismes : 1) dissociation homolytique de la liaison S-S du sulfurane, induisant une dissociation spontanée de la liaison S-O opposée, puis un réarrangement des unités pour former l'acide sulfénique avec libération de la Met, ou 2) transfert électronique du résidu CysS<sup>-</sup> vers MetSOH<sup>+</sup> induisant également la dissociation de la liaison S-O (Figure 58).



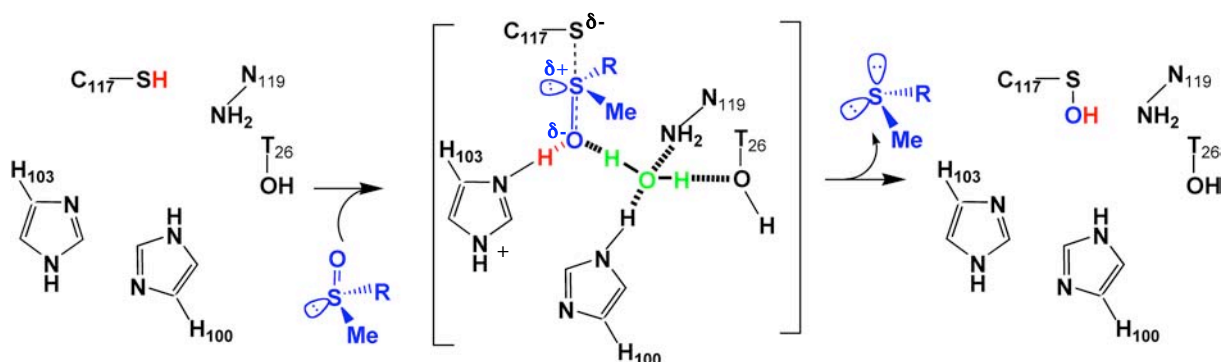
**Figure 58 :** Mécanisme proposé pour la réaction aboutissant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique (Thiriot *et al.*, résultats non publiés).

Le site actif de la MsrA est représenté de façon schématique avec les groupements fonctionnels des résidus conservés Glu94 et Cys51. Le substrat entre dans le site actif sous une forme fortement polarisée. Au sein du complexe enzyme/substrat, la Cys catalytique est déprotonée et la fonction sulfoxyde du substrat est protonée. Le transfert du proton de la Cys vers le substrat est suggéré passer *via* le résidu Glu94. Le système CysS<sup>-</sup>/MetSOH<sup>+</sup>/Glu<sup>-</sup> ainsi formé peut conduire à une espèce sulfurane par formation d'une liaison S-S. D'un point de vue énergétique, ces deux formes sont assez proches et présentent une barrière d'activation faible, de sorte que l'on peut postuler un équilibre thermodynamique entre elles. La formation de l'acide sulfénique se ferait alors selon l'un de ces deux mécanismes : 1) dissociation homolytique de la liaison S-S du sulfurane, induisant une dissociation spontanée de la liaison S-O opposée, puis un réarrangement des unités pour former l'acide sulfénique avec libération de la Met, ou 2) transfert électronique du résidu CysS<sup>-</sup> vers MetSOH<sup>+</sup> induisant également la dissociation de la liaison S-O.

Les MsrA et MsrB constituent un modèle intéressant d'évolution convergente impliquant un mécanisme catalytique identique mais faisant intervenir des résidus catalytiques différents. En effet, un scénario de l'étape réductase a également été proposé pour la MsrB de *N. meningitidis* (Neiers *et al.*, 2007) (Figure 59). Les résultats montrent que les deux classes de Msr partagent : 1) une activation de la Cys catalytique après fixation du substrat, 2) un rôle majeur de la forme polarisée de la fonction sulfoxyde du substrat dans la stabilisation de la forme thiolate de la Cys catalytique, et 3) un transfert de proton de la Cys catalytique sur l'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat. Cependant, les MsrA et MsrB présentent également des différences au niveau catalyse. Ainsi, les profils de variation de la constante de vitesse ( $k_{\max}$ ) de l'étape réductase en fonction du pH sont différents avec un profil en forme de cloche pour les MsrB, reflétant la contribution de la Cys catalytique et de l'His103 en tant que catalyseur acide-base, alors que pour les MsrA le profil est de type

## Discussion et Perspectives

monosigmoïdal croissant, reflétant seulement la contribution de la Cys catalytique. Cette différence associée au fait que la constante de vitesse maximale de l'étape réductase des MsrB est 16 fois inférieure à celle des MsrA, pourrait être due à un état de transition de nature légèrement différente, au sein de l'étape réductase, entre les deux classes de Msr. Les différences entre les MsrA et MsrB concernent également la nature du catalyseur acide et des autres résidus intervenant dans la stabilisation de la fonction sulfoxyde polarisée et de l'état de transition. Ainsi, dans le cas des MsrA, le rôle de catalyseur acide-base doit être joué par le résidu Glu94, qui n'est cependant pas titrable à l'inverse du résidu His103 dans les MsrB. De plus, dans le cas de la MsrA, les résidus Tyr82 et Tyr134 interagissent directement avec l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde alors que dans les MsrB, ce rôle est assuré par les résidus Thr26, His100 et Asn119, de façon indirecte *via* une molécule d'eau.

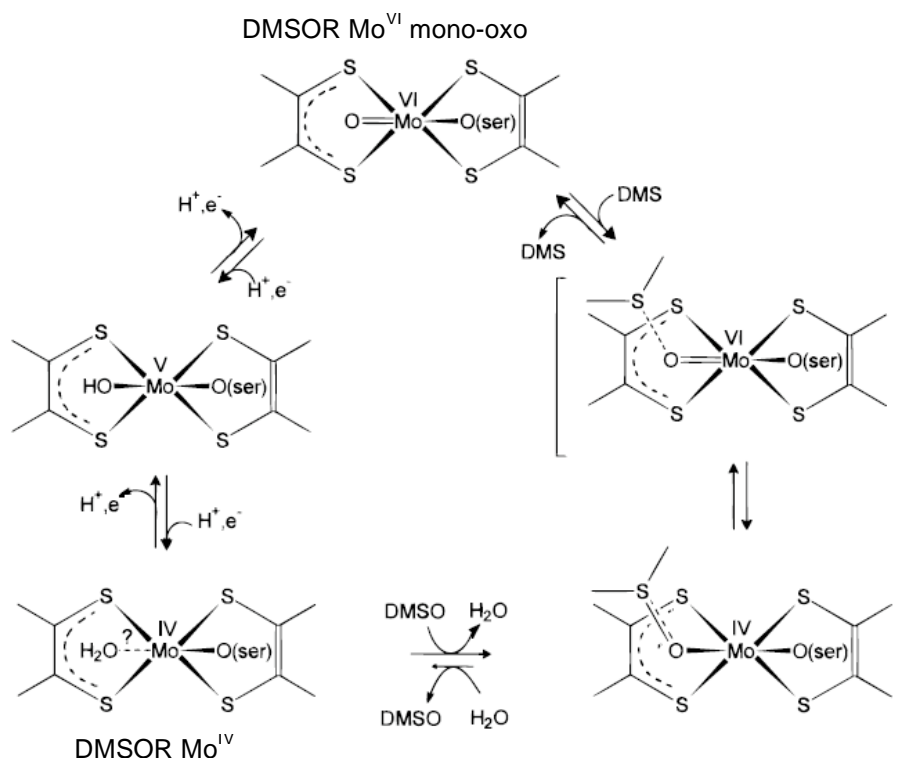


**Figure 59 :** Représentation schématique du mécanisme catalytique proposé pour l'étape réductase de la MsrB de *N. meningitidis* (Neiers *et al.*, 2007).

Les cinq groupements fonctionnels des résidus Thr26, His100, His103, Cys117 et Asn119 ainsi que la molécule d'eau formant un réseau de liaisons H sont représentés. RSOCH<sub>3</sub> et RSCH<sub>3</sub> représentent respectivement la MetSO et la Met. Le substrat se fixe dans le site actif sous une forme fortement polarisée. Un état de transition de type sulfurané est formé et est stabilisé *via* l'His103 et un réseau de liaison H formé entre la molécule d'eau et les résidus His100, Thr26 et Asn119. Le réarrangement de cet état de transition permet la libération d'une mole de Met ainsi que la formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Le mécanisme permettant la formation de cet intermédiaire reste à déterminer.

Dans ce contexte, la comparaison des mécanismes catalytiques de réduction d'une fonction sulfoxyde par les Msr et par les réductases à cofacteur molybdoptérine guanine dinucléotide (MGD) comme les DMSO réductases, met en évidence deux voies de réduction retenues au cours de l'évolution : d'une part, le mécanisme catalytique des Msr basé sur la réactivité des Cys et la chimie de l'acide sulfénique, et d'autre part, un mécanisme faisant intervenir un cofacteur molybdène, dans le cas des DMSOR (Figure 60). Pour ces dernières, le sulfoxyde se lie directement au cofacteur molybdène, ce qui entraîne une fragilisation de la liaison S-O permettant ainsi la formation de DMS. Bien que différents, ces deux mécanismes

de réduction d'une fonction sulfoxyde ont en commun l'activation de la fonction sulfoxyde, *via* soit la protonation de l'oxygène de cette fonction dans le cas des Msr, soit la coordination à un atome de molybdenium dans le cas des DMSOR.



**Figure 60 :** Mécanisme chimique détaillé de la réduction du DMSO catalysée par la DMSOR (Garton *et al.*, 1997).

Au cours de ce mécanisme catalytique, l'oxygène de la fonction sulfoxyde du DMSO vient directement se fixer au Mo, probablement à la place d'une molécule d'eau initialement présente. Cette coordination à l'atome de Mo entraîne la fragilisation de la liaison SO de la fonction sulfoxyde ce qui permet la formation de DMS et aboutit à l'oxydation de la DMSOR sous forme oxydée Mo<sup>VI</sup>. La DMSOR sera ensuite régénérée grâce au transfert de deux protons et de deux électrons à l'atome de Mo ce qui permet de libérer l'oxygène sous forme d'une molécule d'eau et la régénération de la forme réduite Mo<sup>IV</sup> du métal.

## Partie II : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance du substrat sulfoxyde

L'examen des structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, de *B. taurus* et de *M. tuberculosis* suggérait l'existence de trois sous-sites essentiels à la fixation sélective de la Met-S-SO. Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de caractériser ces trois sous-sites : le sous-site hydrophile composé des résidus Tyr82, Tyr134 et Glu94 dont les chaînes latérales stabilisent la forme polarisée du substrat comme indiqué dans le paragraphe

## *Discussion et Perspectives*

précédent, ne joue aucun rôle dans la reconnaissance du substrat. Le sous-site hydrophobe composé des acides aminés Phe52, Trp53, His186 et Tyr189 joue un rôle majeur dans la reconnaissance du substrat *via* des interactions de van der Waals avec les groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène du substrat. Dans ce contexte, les résidus His186 et Tyr189 sont impliqués indirectement dans la reconnaissance du substrat en permettant un positionnement adéquat du noyau indole du Trp53 grâce d'une part à une liaison H entre le N $\delta$  de l'His186 et le NH du noyau indole et d'autre part à une interaction  $\pi$ - $\pi$  entre le noyau phényl de la Tyr189 et le noyau indole du Trp53. De plus, la distance entre l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde, chargé positivement dans le complexe Michaelien, et le noyau indole du Trp53 est compatible avec une interaction cation/ $\pi$ . Le troisième sous-site est impliqué dans la reconnaissance du substrat mais sa contribution en terme énergétique est beaucoup plus faible que celle de la poche hydrophobe. Tous ces résultats sont donc en faveur d'une reconnaissance du substrat essentiellement basée sur la reconnaissance des groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène de la MetSO.

Il est d'ailleurs intéressant de noter que des études similaires réalisées au laboratoire par Fabrice Neiers sur la MsrB de *N. meningitidis* ont montré que le mode de reconnaissance du substrat pour les MsrB est similaire à celui observé pour les MsrA, c'est à dire une reconnaissance principalement des groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène du substrat par une poche hydrophobe (Neiers *et al.*, 2007). Dans le cas des MsrB, on retrouve une poche hydrophobe, constituée en particulier de la chaîne latérale du résidu Trp65, et une poche hydrophile, constituée des résidus His101 et d'une molécule d'eau stabilisée par trois liaisons H avec des résidus invariants. D'ailleurs, la stéréosélectivité des deux classes de Msr s'explique par la symétrie des deux sites actifs due à une orientation spatiale inverse de la poche hydrophobe et de la poche hydrophile par rapport à la chaîne latérale de la Cys catalytique.

Les études menées avec la protéine L7/L12, substrat protéique des Msr, a montré, dans le cas de la MsrA, que la reconnaissance n'était pas améliorée comparée à un substrat AcMetSONHMe mimant une MetSO incluse dans un polypeptide. Ceci suggère donc que les résidus adjacents à la MetSO ne favorisent pas la reconnaissance par la MsrA. Ceci est en accord avec le fait que 1) le site actif est localisé à la surface de la protéine et ne semble pouvoir accepter que la chaîne latérale du résidu MetSO, et 2) il n'existe aucune séquence signature particulière autour de la MetSO dans les protéines substrat. La reconnaissance entre les Msr et leurs substrats est donc très localisée à la MetSO ce qui est en accord avec leur rôle



de réparation de l'ensemble des MetSO retrouvées dans des protéines très diverses et donc dans des environnements différents. Pour être réduites par les Msr, les MetSO doivent donc être accessibles, ce qui implique soit que les MetSO soient localisées à la surface des protéines, soit que les protéines soient dépliées afin de rendre les MetSO accessibles.

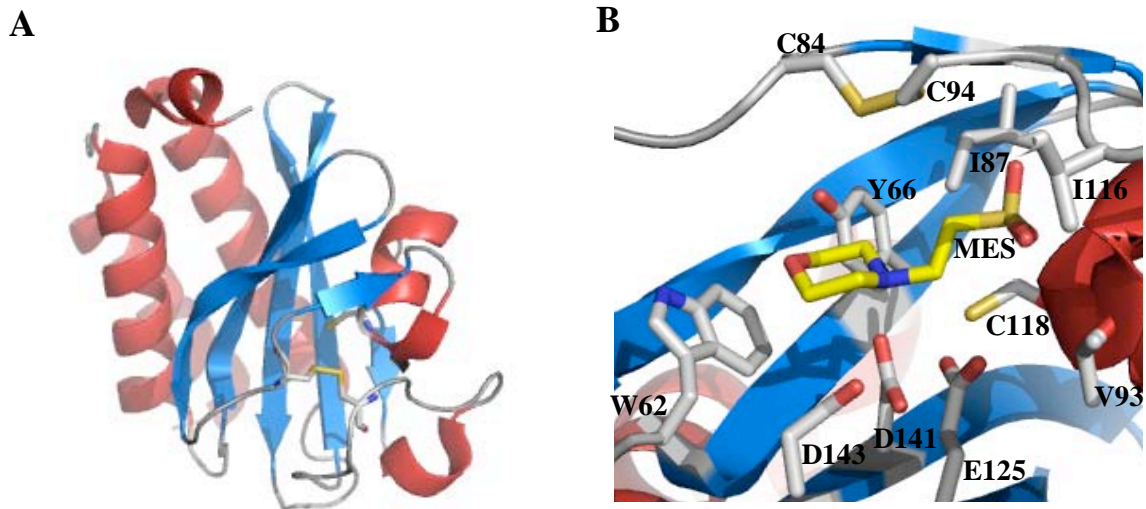
Récemment, une constante de dissociation de 70 nM a été déterminée pour la formation du complexe inactif entre la calmoduline oxydée et la MsrA bovine, par spectroscopie de fluorescence (Xiong *et al.*, 2006). Comment concilier ces résultats, qui suggèrent l'existence d'une forte affinité entre la MsrA et ses substrats protéiques, et nos résultats (constante d'affinité apparente de 55 mM avec le substrat AcMetSONHMe) ? Une explication possible est que la constante de dissociation mesurée entre la MsrA bovine et la calmoduline oxydée représente l'équilibre de formation d'un complexe inactif, qui n'est pas forcément représentatif de l'équilibre de formation du complexe compétent pour la catalyse.

Reste posée la question de la meilleure affinité apparente observée pour l'AcMetSONHMe, mimant un substrat inclus dans un polypeptide, par rapport à la MetSO. Bien que les résultats aient montré que les résidus Tyr197 et Asp129 sont impliqués dans des interactions avec la chaîne principale du substrat, ces interactions ne sont pas discriminantes en ce qui concerne la meilleure reconnaissance du substrat AcMetSONHMe. De plus, l'examen de la structure du complexe inactif MsrA C51S/AcMetSONHMe n'a pas permis d'identifier d'interactions stabilisatrices supplémentaires avec le substrat. Dans ce contexte, la seule explication est que cette moins bonne reconnaissance de la MetSO libre soit due à un effet déstabilisateur lié à des interactions répulsives *via* les charges positives et négatives portées respectivement par les groupements amine et carboxyle de la MetSO. Cependant, les structures tridimensionnelles disponibles n'ont pas permis d'identifier des facteurs structuraux permettant de conforter cette hypothèse. Un autre point important concerne l'absence d'effet inhibiteur significatif avec le produit de la réaction AcMetNHMe pour des concentrations allant jusqu'à 400 mM. Ces résultats montrent que les Msr présentent une faible affinité pour ce produit bien que les groupements  $\epsilon$ -méthyle et  $\gamma$ -méthylène soient présents. La différence existant entre le substrat et le produit de la réaction, est la présence de l'oxygène sur l'atome de soufre du substrat. Ceci a comme conséquence que l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde porte une charge positive, ou au moins une charge partielle positive, alors que dans l'AcMetNHMe l'atome de soufre est plutôt chargé négativement. Ceci conduit vraisemblablement à une répulsion électrostatique entre l'atome de soufre de l'AcMetNHMe et la Cys catalytique. Il en résultera une vitesse de dissociation du produit plus élevée ou une vitesse d'association du produit plus lente.

## ***Discussion et Perspectives***

Récemment, une nouvelle classe de Msr a été découverte, strictement spécifique des Met-*R*-SO, et appelée fRMsR (Lin *et al.*, 2007). La structure tridimensionnelle de la fRMsR d'*E. coli* a été obtenue en complexe avec une molécule de MES (Badger *et al.*, 2005) (Figure 61). Cette structure est similaire à celle observée pour des protéines appartenant à la famille des domaines GAF. Ces domaines GAF sont des domaines senseurs généralement retrouvés en tandem avec différents domaines effecteurs et impliqués dans les voies de signalisation des nucléotides cycliques, dans la transcription ou encore dans la phosphotransduction.

Bien que rien ne soit connu concernant son mécanisme catalytique et ses spécificités structurales, l'examen de la structure tridimensionnelle de la fRMsR d'*E. coli* et des alignements de séquences de différentes fRMsR putatives présentes dans les banques de données permet d'avancer certaines hypothèses. Ainsi trois Cys sont présentes dans le site actif, dont deux sont conservées dans toutes les séquences de fRMsR. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme catalytique similaire à celui démontré pour les Msr d'ores et déjà caractérisées. D'autre part, cette enzyme reconnaît spécifiquement les Met-*R*-SO libres, les Met-*R*-SO incorporées dans un peptide et le DMSO n'étant pas réduits. Ces résultats suggèrent l'existence d'une reconnaissance spécifique des groupements carboxylate et amine protoné de la Met-*R*-SO, c'est-à-dire un mode de reconnaissance du substrat différent de celui des MsrA et MsrB. Le site actif des fRMsR est enfoui, ce qui pourrait expliquer la spécificité de reconnaissance de ces enzymes pour un substrat MetSO libre. Le site actif de la fRMsR contient un résidu Trp conservé ainsi que de nombreux résidus acides conservés. Cependant, la structure tridimensionnelle disponible ne permet pas de prévoir comment les groupements  $\epsilon$ -méthyle, sulfoxyde,  $\alpha$ -carboxylate et  $\alpha$ -amine de la MetSO sont stabilisés dans le site actif. L'étude de cette fRMsR, qui vient d'être engagée dans le groupe, permettra de caractériser les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la spécificité de substrat et dans la catalyse de cette nouvelle Msr.



**Figure 61 :** Représentation de la structure tridimensionnelle de la fRMsR d'*E. coli*.

(A) Structure tridimensionnelle de la fRMsR d'*E. coli*. Les structures secondaires en hélice  $\alpha$  sont représentées en rouge, les brins  $\beta$  en bleu. Les trois Cys conservées du site actif sont représentées.

(B) Vue du site actif de la fRMsR d'*E. coli* à l'intérieur duquel une molécule de MES est présente. Les résidus conservés du site actifs Trp62, Tyr66, Cys84, Ile87, Val93, Cys94, Ile116, Cys118, Glu125, Asp141 et Asp143 sont représentés. La molécule de MES est représentée en jaune. Cette figure a été réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 1VHM.

### Partie III : Régénération de l'activité réductase

Les études cinétiques réalisées précédemment ont montré que pour la MsrA comme pour la MsrB la vitesse de formation du pont disulfure est rapide et limitée par la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique (Antoine *et al.*, 2003 ; Olry *et al.*, 2004). Il est donc impossible d'atteindre expérimentalement la vitesse de cette étape et de l'étudier.

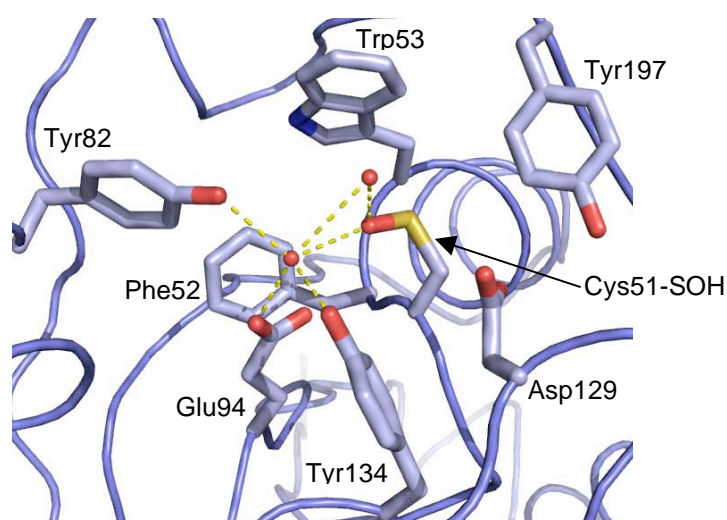
Pour que l'intermédiaire pont disulfure puisse se former, il est nécessaire que 1) la Cys de régénération se rapproche de la Cys catalytique, 2) la Cys de régénération soit sous forme déprotonée, et 3) l'intermédiaire acide sulfénique soit protoné pour permettre le départ de la molécule d'eau.

L'examen de la structure tridimensionnelle de la MsrA de *N. meningitidis* sous forme réduite (Ranaivoson *et al.*, 2008) montre que la Cys198 n'est pas en position pour réaliser une attaque nucléophile sur l'intermédiaire acide sulfénique, la distance entre les deux SH étant de 8 Å et la chaîne latérale de la Cys198 étant orientée à l'opposé du site actif. Le positionnement de la Cys198 est dépendant du résidu Tyr197 qui, dans les formes réduites et en complexe avec le substrat, est en interaction *via* une liaison H avec le résidu Asp129. Pour

## Discussion et Perspectives

qu'il y ait formation du pont disulfure, il est donc nécessaire dans un premier temps qu'il y ait rupture de cette liaison H pour que la chaîne latérale de la Cys198 puisse se réorienter vers le site actif.

Au cours de cette étape, la Cys de régénération doit être sous forme déprotonée pour permettre l'attaque nucléophile sur l'intermédiaire acide sulfénique. Cette réaction étant intramoléculaire, il est possible que l'intervention d'un catalyseur ne soit pas nécessaire pour qu'elle soit efficace, une réaction intramoléculaire étant beaucoup plus favorable qu'une réaction intermoléculaire. D'autre part, l'intermédiaire acide sulfénique doit être protoné pour permettre la formation de l'intermédiaire pont disulfure avec le départ d'une molécule d'eau. L'examen de la structure tridimensionnelle de la MsrA de *N. meningitidis* oxydée sous forme acide sulfénique montre la présence d'une molécule d'eau entre la fonction acide sulfénique et le carboxyle du Glu94 (Figure 62).

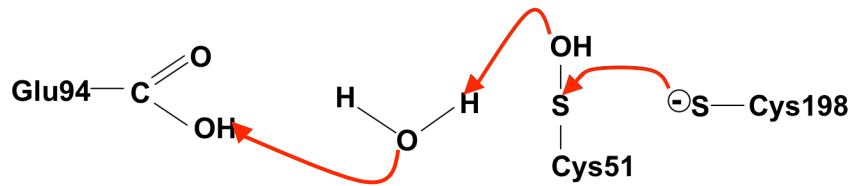


**Figure 62 : Représentation du site actif de la MsrA C198S de *N. meningitidis* oxydée sous forme acide sulfénique (d'après Ranaivoson *et al.*, 2008).**

Les chaînes latérales des résidus conservés Phe52, Trp53, Tyr82, Glu94, Asp129, Tyr134, Tyr197 ainsi que la Cys51 sous forme acide sulfénique sont représentés. Les molécules d'eau sont représentées en rouge. Les liaisons H sont représentées par des traits pointillés jaunes.

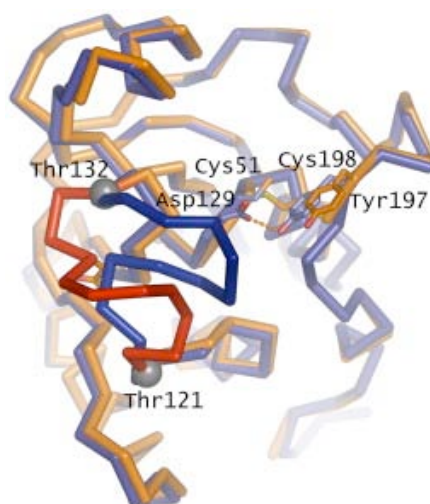
Des études précédentes réalisées au laboratoire par le Dr. Mathias Antoine sur des variants C198S et E94A/C198S de la MsrA avec un substrat marqué à l'O<sup>18</sup> ont montré que le Glu94 peut catalyser l'attaque d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire acide sulfénique, probablement *via* la protonation de la fonction sulfénique pour favoriser le départ de la molécule d'eau. L'ensemble de ces résultats permettent de proposer le mécanisme suivant

pour la formation du pont disulfure intramoléculaire et le départ de la molécule d'eau : attaque de la Cys198 sous forme déprotonée sur l'intermédiaire acide sulfénique et départ de la molécule d'eau catalysée par le Glu94 (Figure 63). Dans ce mécanisme, la Cys198 doit être déprotonée et le Glu94 doit être protoné. Reste donc posée la question de la provenance de ce proton sachant qu'à la fin de l'étape réductase, le Glu94 se retrouve sous forme déprotonée. Il est tentant de proposer que le proton vienne de la Cys198, probablement *via* un relais de molécules d'eau.



**Figure 63** : Schéma de la réaction proposée pour la formation de l'intermédiaire pont disulfure.

L'examen des structures de la MsrA de *N. meningitidis* sous forme acide sulfénique et sous forme oxydée pont disulfure obtenues par radiocristallographie (Ranaivoson *et al.*, 2008) et des structures des formes réduite et oxydée sous forme pont disulfure 51/198 de la MsrA d'*E. coli* obtenues par RMN (Coudeville *et al.*, 2006) montre l'existence d'un changement conformationnel qui est concomitant ou consécutif à la formation du pont disulfure. En effet, aucun changement de structure n'est observé entre les formes réduites, en complexe avec le substrat ou sous forme acide sulfénique, obtenue par diffusion de DMSO dans un cristal de MsrA. Par contre dans la forme oxydée pont disulfure, un basculement du segment 121-132, et donc la rupture de la liaison H préexistante entre l'Asp129 et la Tyr197, est observé (Figure 64). Celui-ci entraîne une modification importante de la surface moléculaire, qui devient plus hydrophobe, et du site actif qui devient plus accessible. Une hypothèse est que ce basculement permettrait la reconnaissance spécifique entre la MsrA oxydée et la Trx réduite, et donc la réduction du pont disulfure. Reste posée la question des facteurs structuraux et moléculaires qui engendrent ce changement conformationnel.



**Figure 64 :** Superposition des structures de la MsrA de *N. meningitidis* sous forme réduite et oxydée (d'après Ranaivoson *et al.*, 2007).

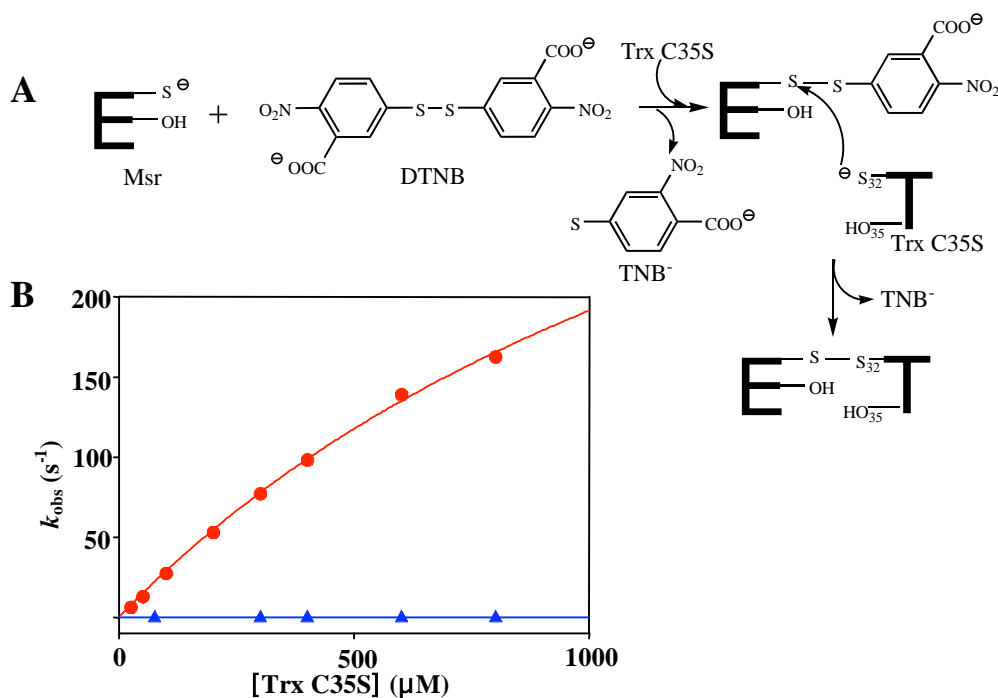
La structure de la forme réduite est représentée en bleu et la structure de la forme oxydée est représentée en jaune. Le positionnement du segment 121-132 dans la forme oxydée est représenté en rouge. Les résidus Cys51, Cys198, Asp129 et Tyr197 du site actif sont représentés. La liaison H entre l'Asp129 et la Tyr197 présente dans la forme réduite est représentée par un trait rouge pointillé.

#### **Partie IV : Facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans l'interaction entre MsrA et Trx.**

La Trx est une protéine ubiquitaire, capable de réduire de nombreuses cibles protéiques possédant des structures très variées, dont les Msr. Peu d'informations sont disponibles concernant les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre la Trx et ses cibles, et aucune séquence signature n'existe. Les résultats cinétiques obtenus ont permis de montrer qu'il existait une reconnaissance spécifique entre les Msr<sub>ox</sub> et la Trx<sub>réd</sub>. Néanmoins, la faible affinité entre les deux partenaires n'a pas permis de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'association entre les deux partenaires par des techniques biophysiques telles que la microcalorimétrie (ITC) ou la résonance plasmonique de surface (A. Gand, résultats non publiés). La seule façon de pouvoir identifier les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance spécifique entre les Msr et la Trx est donc de résoudre la structure d'un complexe covalent entre ces deux partenaires. Un préalable à l'étude d'un tel complexe était d'identifier la Cys des Msr impliquée dans le pont disulfure intermoléculaire avec la Cys32 de la Trx.

Des études réalisées au laboratoire par le Dr. Mathias Antoine avaient permis d'identifier clairement par deux approches différentes la Cys198 comme étant la Cys impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire avec la Trx. La première approche est basée sur des critères cinétiques indirects en suivant la cinétique de formation du

pont disulfure intermoléculaire entre la MsrA et la Trx à partir de variants de Msr ne possédant plus qu'une Cys activée par du DTNB (adduit Msr-TNB) et du variant Trx C35S qui ne possède plus que la Cys32 catalytique. Ceci a permis de montrer qu'il existait une différence de réactivité des deux adduits Msr-TNB vis-à-vis de la Trx, l'adduit MsrC198-TNB ( $k_2 = 3.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) étant  $10^4$  fois plus réactif que l'adduit MsrC51-TNB ( $k_2 = 21 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) vis-à-vis de la Trx C35S (Figure 65). La seconde approche a permis d'identifier directement le pont disulfure intermoléculaire formé entre la Cys198 de la MsrA et la Cys32 de la Trx par analyse par spectrométrie de masse du complexe covalent formé entre la MsrA<sub>ox</sub> et la Trx C35S, en collaboration avec le groupe du Dr. A. Van Dorsselaer à Strasbourg. Pour cela, après purification par filtration sur gel, le complexe covalent a été analysé par ESI-MS après protéolyse par AspN.



**Figure 65 :** Représentation schématique de la réaction de formation d'un complexe covalent entre la Trx C35S et les variants monocystéiniques des Msr activées par le DTNB (A) et cinétique de formation des complexes covalents MsrA/Trx C35S après activation de la MsrA par le DTNB (B).

(A) L'unique Cys d'un variant monocystéinique de Msr est activée par ajout de DTNB. Ceci entraîne la formation d'un adduit Cys-TNB. La Trx C35S va réagir avec la Cys activée ce qui permet d'une part le relargage d'une mole de TNB<sup>-</sup> et d'autre part la formation d'un complexe covalent Msr/Trx C35S. La cinétique de formation du complexe covalent est suivie grâce à la libération de TNB<sup>-</sup>.

(B) Cinétique de formation du complexe MsrA C51S/Trx C35S (courbe rouge) et du complexe MsrA C198S/Trx C35S (courbe bleue). Les résultats expérimentaux ont été ajustés sur l'équation  $k_{\text{obs}} = k_{\text{obs max}} S / K_{\text{trx}} + S$  (avec  $K_{\text{trx}}$  constante apparente d'affinité). Les paramètres obtenus à partir de cet ajustement sont les suivants :  $k_{\text{obs max}} = 510 \pm 48$  et  $(2,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  et  $1,7 \pm 0,2$  et  $1 \pm 0,1 \text{ mM}$  respectivement pour les complexes MsrA C51S/Trx C35S et MsrA C198S/Trx C35S, ce qui correspond à des constantes cinétiques de pseudo deuxième-ordre  $k_2$  de  $3.10^5$  et  $21 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

## *Discussion et Perspectives*

Pour la MsrB, les résultats obtenus au laboratoire par le Dr. Alexandre Olry par les mêmes approches ont montré qu'il n'existait aucune différence de réactivité vis-à-vis de la Trx C35S entre les adduits MsrBC63-TNB ( $k_2 = 13,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et MsrBC117-TNB ( $k_2 = 9,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), les deux étant faiblement réactifs. Une hypothèse est que la présence de TNB fixé sur une Cys de la MsrB diminue l'accessibilité pour la Trx ou/et perturbe le positionnement vis-à-vis de la Cys32 de la Trx. D'autre part, les études par spectrométrie de masse du complexe covalent formé entre la MsrB<sub>ox</sub> et la Trx C35S, après purification du complexe par gel filtration, avait permis d'identifier un complexe avec un pont disulfure intermoléculaire entre la Cys117 catalytique de la MsrB et la Cys32 de la Trx (MsrBC117-TrxC32).

L'analyse des espèces formées après réaction entre la MsrB<sub>ox</sub> et la Trx C35S sur un gel SDS-PAGE montre que peu de complexe MsrB-Trx est formé (environ 20% alors que pour la MsrA environ 90% de complexe MsrA/TrxC35S est formé) et que de nombreuses espèces de plus haut poids moléculaire sont générées issues probablement de réactions secondaires. Ainsi, la faible quantité de complexe MsrB-Trx purifié par filtration sur gel et analysé par spectrométrie de masse ne permet pas d'exclure l'existence de l'autre complexe. C'est pourquoi, j'ai mis en place une autre technique de purification du complexe MsrB/TrxC35S par électrophorèse SDS-PAGE. Le complexe a été digéré à la trypsine dans le gel et les peptides générés ont été extraits et analysés par spectrométrie de masse LC-MS. Les résultats obtenus dans ces conditions montrent que les deux complexes MsrBC63-Trx et MsrBC117-Trx sont formés, dans des proportions non déterminables par cette approche (Résultats non montrés).

Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : 1) soit la Cys32 de la Trx peut former un pont disulfure intermoléculaire aussi bien avec la Cys63 qu'avec la Cys117, ce qui semble probable compte tenu du fait que la réaction d'échange de pont disulfure est rapide et doit faire intervenir la formation d'un complexe MsrB<sub>ox</sub>/Trx<sub>réd</sub> dans lequel la Cys32 de la Trx doit être correctement positionnée pour attaquer une seule des deux Cys ; 2) soit la formation observée des deux ponts disulfures est liée à l'utilisation d'un mutant monocystéinique de la Trx qui conduit à l'accumulation d'un complexe MsrB/Trx instable en équilibre avec les formes libres. La réaction de formation du complexe étant faite sur des temps longs (de l'ordre de la dizaine de minutes), largement supérieurs au temps nécessaire à la réduction de la Msr<sub>ox</sub> par la Trx<sub>réd</sub>, il est possible qu'elle soit soumise à un contrôle thermodynamique plutôt qu'à un contrôle cinétique. Ainsi, même si un seul complexe est favorisé cinétiquement, l'autre pourrait se former de façon artéfactuelle dans les conditions utilisées. Il serait donc intéressant de pouvoir étudier la formation du complexe entre la



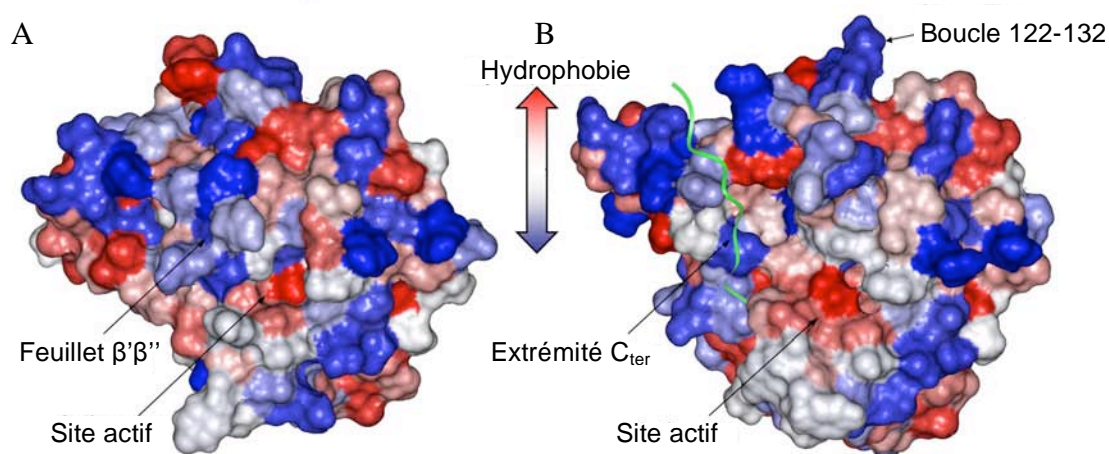
MsrB<sub>ox</sub> et la Trx C35S sur des temps plus courts et de quantifier la quantité de complexe MsrBC63-TrxC32 et MsrBC117-TrxC32 formé afin de voir si un des deux complexe est privilégié. Pour cela, le complexe formé en solution à différent temps va être analysé par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et la quantité de chaque complexe formé va être mesurée. Ces expériences sont actuellement en cours.

Comment expliquer qu'il y ait moins de complexe formé entre la Trx C35S et la MsrB qu'entre la Trx C35S et la MsrA ? Une explication serait l'existence d'un changement conformationnel associé à la formation du complexe MsrA/Trx C35S, qui n'existerait pas pour les MsrB. L'irréversibilité de cette étape de changement conformationnel, dans les conditions utilisées, permettrait de déplacer l'équilibre vers la formation du complexe. Cette hypothèse est confortée par l'analyse des données structurales qui montre 1) l'existence d'un changement conformationnel important entre la MsrA de *N. meningitidis* sous forme réduite et oxydée, caractérisé notamment par un rapprochement des deux résidus Cys dans la forme oxydée (distance de 8 Å dans la forme réduite), et 2) l'absence de changement conformationnel important entre la MsrB de *N. meningitidis* sous forme réduite et oxydée (la distance entre les deux Cys étant de 2,75 Å dans la forme réduite, Kaufmann *et al.*, résultats non publiés). Il est donc possible que l'accumulation du complexe MsrA/Trx soit due au changement conformationnel observé entre la forme oxydée et la forme réduite qui entraîne l'éloignement des Cys51 et Cys198 et empêche ainsi la réaction inverse de se faire, c'est-à-dire la formation de MsrA<sub>ox</sub> et de Trx C35S. Au contraire, la faible distance entre les Cys63 et Cys117 de la MsrB de *N. meningitidis* et le fait qu'aucun changement conformationnel n'intervienne entre la forme oxydée et la forme complexée avec le substrat pourrait permettre à la réaction inverse de se faire, c'est-à-dire la formation de MsrB<sub>ox</sub> et de Trx C35S. L'équilibre entre ces deux réactions serait tel que seulement 20% de complexe MsrB/Trx C35S serait formé. Cette hypothèse est confortée par le fait que 1) dans le cas de la MsrA de *B. subtilis* qui possède une Cys de régénération en position 54, donc proche de la Cys 51 catalytique, peu de complexe MsrA/Trx C35S est formé, et 2) l'introduction par génie génétique d'une Cys en position 54 dans un variant de la MsrA de *N. meningitidis* ne possédant plus la Cys de régénération en position 198, conduit à la formation de seulement 20% de complexe (Dr. Mathias Antoine, résultats non publiés).

Bien que peu de données existent concernant les interactions entre la Trx et ses cibles, des études de cristallographie et de RMN de complexes covalents formés entre la Trx et deux de ses cibles, ArsC et la PAPS réductase, ont montré que cette reconnaissance impliquait essentiellement des interactions de type hydrophobe (Chartron *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007).

## Discussion et Perspectives

Les études menées par RMN sur la MsrA d'*E. coli* et par RX sur la MsrA de *N. meningitidis* montrent toutes les deux l'existence d'un basculement du segment 121-132 dans la forme pont disulfure de la MsrA. Ce basculement découvre une surface hydrophobe proche du site actif qui, ainsi exposée, pourrait permettre l'établissement d'interactions hydrophobes et la formation du complexe avec la Trx<sub>réd</sub> lors de l'étape de régénération de l'activité réductase (Figure 66). La nature du pont disulfure intermoléculaire ayant été déterminée pour la MsrA de *N. meningitidis*, impliquant la Cys de régénération, la détermination par radiocristallographie ou par RMN de la structure tridimensionnelle d'un complexe covalent entre la MsrA C51S et la Trx C35S va pouvoir être entreprise afin de caractériser les zones spécifiques d'interaction, même si le modèle MsrA de *N. meningitidis* n'est peut-être pas le meilleur modèle. En effet, la Cys198 se trouvant dans l'extrémité C-terminale peu structurée, il est possible que le positionnement relatif entre les deux partenaires dans le complexe covalent MsrA C51S / Trx C35S ne soit pas représentatif de celui formé lors de l'échange de pont disulfure entre la MsrA<sub>ox</sub> et la Trx<sub>réd</sub>.



**Figure 66 : Représentation des surfaces moléculaires de la MsrA d'*E. coli* sous forme réduite et oxydée à l'état pont disulfure Cys51-Cys198 (d'après Coudeville *et al.*, 2006).**

La surface moléculaire est colorée en fonction de l'hydrophobie des chaînes latérales la composant. A) Surface de la MsrA réduite. B) Surface de la MsrA oxydée à l'état pont disulfure C51-C198.

## Partie V : Les disulfure oxydoréductases périplasmiques de *N. meningitidis*

Comme décrit dans la partie Résultats, afin de pouvoir identifier les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la sélectivité de cibles du domaine N-ter de PilB et des DsbE, il était nécessaire d'identifier et de caractériser au préalable la DsbE de *N. meningitidis* impliquée dans la maturation des cytochromes *c*.

Deux des trois DsbE putatives de *N. meningitidis* ont été surproduites sous forme soluble chez *E. coli* et purifiées à homogénéité. Leur caractérisation biochimique et enzymatique, bien qu'elle ne soit que préliminaire, montre que 1) la DsbE1 présente une séquence plus proche de celle de la CcmG d'*E. coli* que la DsbE2, 2) les signatures CXXC des DsbE1 et DsbE2 correspondent à un centre disulfure redox avec un potentiel redox respectivement de  $-0,230$  et  $-0,237$  V, proche de celui des Trx, 3) les Cys catalytiques de la DsbE1 et DsbE2 ne sont pas activées dans les formes libres, 4) la protéine nDsbD de *N. meningitidis* est capable de recycler la DsbE1 et la DsbE2, 5) la DsbE1 ne réduit pas l'apocytochrome *c'* oxydé de *N. meningitidis* produit sous forme soluble, et 6) la DsbE1 est capable de compléter partiellement une souche de *B. pertussis* déficiente en DsbE.

Les DsbE1 et DsbE2 sont donc bien des disulfure oxydoréductases avec un caractère réducteur comparable à celui de la Trx. De plus, les pK<sub>app</sub> des deux Cys des DsbE1 et DsbE2 présentent des valeurs élevées dans les formes libres. Ces résultats sont comparables à ceux précédemment obtenus sur la protéine ResA de *B. subtilis* ainsi que sur la protéine CcmH d'*E. coli* (Lewin *et al.*, 2006 ; Stirnimann *et al.*, 2006, Di Matteo *et al.*, 2007). De plus, dans le cas du domaine C-terminal de la protéine DsbD, la Cys catalytique possède également un pK<sub>a</sub> élevé de 9,3. Au contraire, dans la Trx 1 d'*E. coli*, les pK<sub>a</sub> des deux Cys ont des valeurs différentes l'une de l'autre, la Cys catalytique ayant un pK<sub>a</sub> compris entre 6,7 et 7,5 et la Cys de régénération un pK<sub>a</sub> plus élevé compris entre 8,5 et 9 (Chivers *et al.*, 1997). Ainsi, bien que préliminaires, les résultats montrent que les DsbE1 et DsbE2 présentent toutes les deux des propriétés comparables à celles des DsbE décrites. Cependant, les DsbE1 et DsbE2 réduisent l'insuline (résultats non montrés) alors qu'il a été montré que les protéines CcmG d'*E. coli*, CycY de *B. japonicum* et AtCcmH ne réduisent pas l'insuline (Fabianek *et al.*, 1997, Meyer *et al.*, 2005).

Reste posée la question du rôle *in vivo* des DsbE1 et DsbE2, et notamment de leur capacité à intervenir dans la réduction des Cys des apocytochromes *c* nécessaire à l'attachement covalent de l'hème. Les tests réalisés en utilisant de l'apocytochrome *c'* oxydé de *N. meningitidis*, produit sous forme apo soluble dans le cytoplasme d'*E. coli* et purifié à homogénéité, montrent que la DsbE1 ne le réduit pas. Ces résultats suggèrent que soit la DsbE1 ne joue pas ce rôle, soit le modèle utilisé *in vitro* n'est pas adapté, ou soit que la DsbE dans le système II n'interagit pas directement sur l'apocytochrome *c* *in vivo*. La DsbE1 étant capable de réduire la cystine, il est probable que dans l'apocytochrome *c'* le pont disulfure ne soit pas accessible à la DsbE1. Se posent alors plusieurs questions : est-ce que la structuration tridimensionnelle de l'apocytochrome *c'* purifié est identique à celle retrouvée *in vivo* ? Est-ce

## ***Discussion et Perspectives***

spécifique à l'apocytochrome *c'* ou aurait-on le même résultat avec un autre apocytochrome *c* ? En effet, l'apocytochrome *c'* purifié est structuré alors que d'autres études montrent que les apocytochrome *c* sont peu ou pas structurés (Fisher *et al.*, 1972 ; Daltrop *et al.*, 2002). Le cytochrome *c'* de *N. meningitidis* a été choisi pour cette étude car il appartient à la famille des cytochromes *c* et est impliqué dans la résistance de ces bactéries pathogènes vis-à-vis du NO produit par les macrophages de l'hôte (Stevanin *et al.*, 2005)

Aucune étude décrivant la réduction d'un apocytochrome *c* oxydé sous forme pont disulfure par une « DsbE-like » n'a été décrite dans la littérature. Cependant, des études précédentes ont montré que 1) l'élément important et suffisant pour l'interaction entre ces deux partenaires est la présence de l'His du motif conservé CXXCH des cytochromes de type *c* (Braun *et al.*, 2004 ; Allen *et al.*, 2005), et 2) la protéine ResA est capable de réduire un peptide mimant un cytochrome *c550* sous forme oxydée (Colbert *et al.*, 2006). Il sera donc intéressant de tester la réduction par la DsbE1 1) d'un peptide oxydé correspondant au site de fixation de l'hème, et 2) d'un autre apocytochrome *c* comme par exemple l'apocytochrome *c550* de *B. japonicum*. D'autre part, il faudra mettre au point une méthode permettant de suivre l'oxydation ou la réduction de la DsbE2. En effet, les résultats montrent que la différence de fluorescence existant entre les formes réduites et oxydées de la DsbE2 ne permet pas de suivre la réduction de la DsbE2 par la nDsbD. L'introduction d'un résidu Trp supplémentaire par génie génétique pourrait peut être permettre d'obtenir une différence d'intensité de fluorescence entre les deux formes suffisante pour pouvoir suivre la réaction.

En parallèle, le rôle de ces DsbE devra être testé directement *in vivo* chez *N. meningitidis* par délétion des gènes correspondants. Cependant, *N. meningitidis* ne possédant qu'une seule cytochrome oxydase, la délétion du gène codant la DsbE devrait donc être létale. Des expériences préliminaires de délétion du gène *dsbE1* chez *N. meningitidis* semblent effectivement indiquer que ce phénotype est létale (résultats non montrés).

En ce qui concerne les mécanismes de réduction d'un apocytochrome *c* oxydé dans le système de maturation des cytochromes *c* de type II, les seules données connues le sont sur la base d'études *in vivo* par délétion de gène ainsi que par l'étude de la protéine ResA de *B. subtilis*. Des questions restent posées et notamment : est-ce que cette réduction nécessite l'intervention d'un autre partenaire ou la formation d'un complexe avec le système d'export de l'hème ? Jusqu'ici, les seules données disponibles dans la littérature concernent le système I. Dans le système I, la protéine DsbE a été montrée être essentielle à la maturation des cytochromes *c* par des études par délétion de gène et l'hypothèse de son rôle dans la réduction de l'apocytochrome oxydé en présence de CcmH a été émise. Or, des études récentes

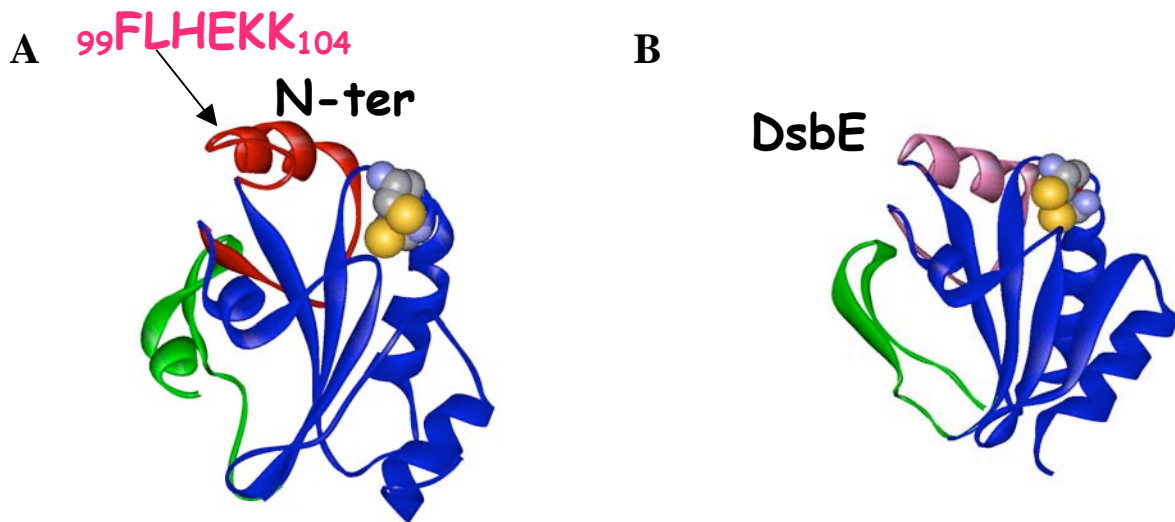
suggèrent que c'est plutôt CcmH qui réduirait directement l'apocytochrome *c*. La protéine CcmG pourrait alors jouer un rôle dans la réduction de la protéine CcmH. Ainsi, il a été montré que la protéine CcmH de *P. aeruginosa* était capable d'interagir avec un peptide correspondant à la séquence de fixation de l'hème de l'apocytochrome *c551* de *P. aeruginosa* (Di Matteo *et al.*, 2007). Il a également été montré que la protéine AtCcmH, qui est une protéine homologue à CcmH chez *A. thaliana* est capable de réduire un peptide mimant le site de fixation de l'hème d'un cytochrome *c* d'*A. thaliana* (Meyer *et al.*, 2005). Aucune interaction directe entre CcmG et un apocytochrome *c*, ni aucune réduction d'un peptide correspondant à la séquence de fixation de l'hème d'un apocytochrome *c* par la protéine CcmG n'ont été jusqu'ici mises en évidence. Pourtant chez les organismes qui possèdent un système de maturation des cytochromes *c* de type II, aucune protéine homologue à CcmH n'est retrouvée et il a été montré que la protéine ResA de *B. subtilis* était capable de réduire directement un peptide mimétique du site de fixation de l'hème d'un cytochrome *c550* (Colbert *et al.*, 2006). Dans ce système, il semblerait donc que ce soit bien les DsbE qui réduisent directement l'apocytochrome *c*.

Bien que préliminaires, les résultats montrent clairement que 1) la DsbE1 est réduite efficacement par le domaine nDsbD, aussi efficacement que la protéine CcmG d'*E. coli* par la nDsbD d'*E. coli* ( $3.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) (Stirnemann *et al.*, 2005), et 2) la DsbE1 est capable de compléter, certes partiellement, une souche de *B. pertussis* déficiente en DsbE. Ces résultats, qui demandent à être confortés, suggèrent que la DsbE1 de *N. meningitidis* est bien la DsbE impliquée dans le système de maturation des cytochromes *c*. Quel est alors le rôle des DsbE2 et DsbE3 ? En effet, trois protéines homologues à CcmG sont retrouvées dans le génome de *N. meningitidis*. Or jusqu'à présent, tous les organismes étudiés ne possèdent qu'une seule protéine de type DsbE impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. Parmi les trois DsbE putatives, une seule doit donc être impliquée dans la maturation des cytochromes *c*. Reste à savoir quel est le rôle des deux autres protéines. Chez *B. japonicum*, deux protéines homologues à CcmG ont été décrites : la protéine CycY et la protéine TlpA. Il a été montré que CycY était impliquée dans la maturation des cytochromes *c* alors que TlpA était impliquée dans la maturation des cytochromes *aa3* (Capitani *et al.*, 2001). Il se pourrait donc que parmi les trois DsbE, l'une puisse jouer un rôle similaire à celui de la protéine TlpA.

Une question importante qui reste posée concerne la nature des déterminants moléculaires ou structuraux impliqués dans la reconnaissance spécifique entre les « DsbE-like » et leurs partenaires. Ainsi, au moins trois « DsbE-like » pourraient être présentes dans le périplasme de *N. meningitidis* : le domaine N-ter de PilB, la DsbE1 et la DsbE2. Toutes les

## Discussion et Perspectives

trois sont réduites par le domaine nDsbD, par contre elles réduisent à priori des cibles différentes (domaines Msr de PilB pour le N-ter, apocytochrome oxydé pour DsbE1 ou DsbE2). Ceci implique qu'il doit exister des facteurs moléculaires et structuraux permettant des reconnaissances sélectives, bien que les structures 3D soient très proches. Ainsi, le domaine N-ter de la protéine PilB de *N. meningitidis* possède un repliement de type DsbE, mais avec une insertion supplémentaire. Cette insertion est une boucle située au niveau de l'insertion centrale du repliement DsbE (résidus 99 à 102) et qui est constituée des résidus FLHEKK (Figure 67).



**Figure 67 :** Structures tridimensionnelles du domaine N-ter de PilB de *N. meningitidis* (A) et de ResA de *B. subtilis* (B).

Le repliement de type Trx est représenté en bleu, l'extension N-terminale en vert et l'insertion centrale en rouge. La boucle FLHE supplémentaire du domaine N-ter est indiquée par une flèche. Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel PyMol à partir des fichiers PDB 1SU9 pour la protéine ResA de *B. subtilis* et 2FYU pour le domaine N-ter de la protéine PilB de *N. meningitidis*.

Cette boucle pourrait être responsable de la spécificité de reconnaissance du domaine N-ter vis-à-vis des Msr. Les données structurales obtenues par la résolution des structures tridimensionnelles des DsbE1 et DsbE2, ainsi que de complexes covalents avec la nDsbD, devraient permettre d'expliquer au niveau moléculaire ces différences de sélectivité de cibles.

# Annexes





## **Annexe 1**

**B. Balta, G. Monard, M.F. Ruiz-López, M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller, G. Branlant (2006)** Theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols. *J. Phys. Chem. A*, **110**, 7628-36.

Pages 134 à 142

## **Annexe 2**

**S. Boschi-Muller, A. Gand, G. Branlant (2008)** The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophys.*, sous presse.

Pages 143 à 150

## Theoretical Study of the Reduction Mechanism of Sulfoxides by Thiols

B. Balta, G. Monard, and M. F. Ruiz-López\*

UMR CNRS-UHP 7565, Equipe de Chimie et Biochimie Théoriques, Université Henri Poincaré - Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller, and G. Branlant\*

UMR CNRS-UHP 7567, Equipe Enzymologie Moléculaire, Université Henri Poincaré - Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received: December 14, 2005; In Final Form: April 6, 2006

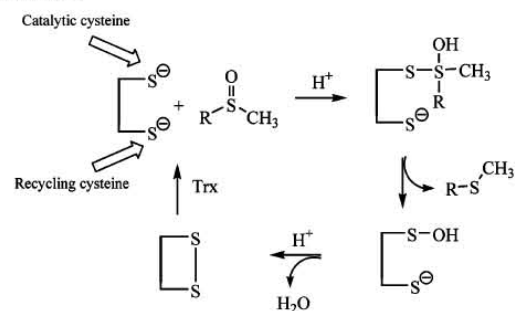
Theoretical computations have been carried out to investigate the reaction mechanism of the sulfoxide reduction by thiols in solution. This reaction is a suitable model for enzymatic processes involving methionine sulfoxide reductases (Msrs). Recent investigations on the Msr mechanism have clearly shown that a sulfenic acid intermediate is formed on the catalytic cysteine of the active site concomitantly to the methionine product. In contrast, experimental studies for the reaction of a number of thiols and sulfoxides in solution did not observe sulfenic acid formation. Only, a disulfide was identified as the final product of the process. The present study has been carried out at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p)//B3LYP/6-311G(d,p) level of theory. The solvent effect in DMSO has been incorporated using a discrete-continuum model. The calculations provide a basic mechanistic framework that allows discussion on the apparent discrepancy existing between experimental data in solution and in the enzymes. They show that, in the early steps of the process in solution, a sulfurane intermediate is formed the rate of which is limiting. Then, a proton transfer from a second thiol molecule to the sulfurane leads to the formation of either a sulfenic acid or a disulfide though the latter is much more stable than the former. If a sulfenic acid is formed in solution, it should react with a thiol molecule making its experimental detection difficult or even unfeasible.

## Introduction

The reduction reaction of sulfoxides by thiols is of considerable biochemical interest because it can be viewed as the simplest model for enzymatic reactions involving the methionine sulfoxide reductases (Msr).<sup>1-17</sup> Msrs are repair enzymes that reduce free or protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) oxidized by reactive oxygen or nitrogen species. The enzymatic reaction mechanism has recently been investigated. The overall reaction is depicted in Scheme 1.<sup>4,17</sup> The catalytic cysteine reacts with MetSO to yield a sulfenic acid intermediate which has been evidenced by chemical and spectroscopic methods.<sup>4,8</sup> At this stage, the reduced substrate is released. Then, the enzymatic reaction proceeds through formation of an intra-disulfide bond upon the attack of the recycling cysteine to the sulfenic acid intermediate. Finally, the oxidized form of Msrs is recycled by thioredoxin. In some Msrs, like MsrA in *E. coli*, a third cysteine could be involved in the recycling process.<sup>17</sup> In all Msrs studied so far, the limiting step is associated to the thioredoxin-recycling process, whereas the rate of formation of the intra-disulfide bond is governed by that of the sulfenic acid intermediate.<sup>17</sup>

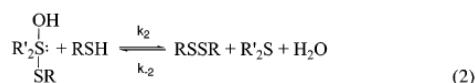
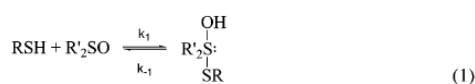
The reduction of sulfoxides by thiols is also interesting from the point of view of synthetic chemistry. It has attracted attention

## SCHEME 1



since many decades because of high yields, mild experimental conditions, the ease of purification and the use of the sulfoxide (namely, dimethyl sulfoxide, DMSO) also as the solvent.<sup>21-28</sup> Both acids and bases, in particular aliphatic amines, catalyze the reaction.<sup>24,26</sup> Catalytic effects by halogen-hydrogen halides,<sup>26</sup> metals,<sup>29-31</sup> and alumina<sup>32</sup> have also been investigated. Early kinetic studies by Wallace<sup>22</sup> and Wallace and Mahon<sup>23</sup> indicated that the activation energy correlated with the  $pK_a$  of the thiol. Moreover, while the reaction was found to be overall second order, in the excess of one of the reagents, pseudo-first-order kinetics was observed. On the basis of these findings, the authors proposed a reaction mechanism that involves initial formation of a thiol-sulfoxide adduct of sulfurane type followed by reaction of this intermediate with a second thiol molecule according to eqs 1-2.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manuel.Ruiz@cbt.uhp-nancy.fr (M.R.); Guy.Branlant@maem.uhp-nancy.fr (G.B.). Phone: +33 383684378 (M.R.); +33 383684304 (G.B.). Fax: +33 383684371 (M.R.); +33 383684307 (G.B.).



It was also shown that  $k_{-2}$  is negligible and that  $k_2 \gg k_1$ .

The proposed mechanism raises questions since (1) the assignment of a sulfurane intermediate was based on kinetic studies but not on direct structural information, and (2) it excludes the formation of a sulfenic acid intermediate in contrast to recent conclusions derived from enzymatic reaction studies.

Sulfenic acid intermediate, if formed, should react with methanethiol in the medium making their experimental detection difficult. Indeed, sulfenic acids<sup>33–39</sup> are highly reactive species and only a few sulfenic acids could be isolated and identified. In particular, they can be detected when they are part of a large molecule,<sup>38,39</sup> such as a protein,<sup>40,41</sup> which hinders their accessibility. Sulfenic acids may however be stabilized in a number of ways (see for instance ref 42), namely, by conversion into a sulfenate or a thiosulfinate, after reacting with another sulfenic acid.

To get a deeper insight on the mechanism of this reaction, quantum chemistry calculations may be particularly useful. The aim of the present work is to make such a theoretical investigation for a model process in DMSO solution. Specifically, this paper considers the following aspects: (1) the potential energy surface of the chemical system is explored in deep detail, (2) the structures of possible reaction intermediates and transition structures are described, (3) the energetics of all possible reaction pathways are compared, and (4) the role of the solvent is analyzed. Though the mechanisms of acid-, base-, and enzyme-catalyzed reactions have not been considered in this study, the results reported for model compounds in DMSO solution provide a basic framework to interpret experimental data. For the sake of clarity, the nomenclature of sulfur compounds is summarized in a glossary at the end of the manuscript.

### Computations, Methods, and Models

To keep the computational time within reasonable limits, we have investigated the model reaction methanethiol + DMSO in DMSO solution. Though there is no available experimental data for methanethiol, comparison with experiment can be made with thiols exhibiting a similar  $\text{p}K_{\text{a}}$  value since this property is well correlated with the reaction kinetic constant.<sup>23</sup> In particular, methanethiol and  $\alpha$ -toluenethiol, for which experimental results are available, have close  $\text{p}K_{\text{a}}$ s in water (10.3 and 10.5, respectively).<sup>23,43</sup>

The solvent has been modeled using a discrete–continuum model. The initial chemical system consists of one thiol molecule and two solvent molecules. Explicit inclusion of two DMSO solvent molecules was found to be important because the solvent can form strong hydrogen bonds with some reaction intermediates influencing in a crucial way their chemical properties. Moreover, being a proton acceptor, DMSO can participate to the reaction coordinate in proton-transfer processes. In the course of the reaction, a further thiol molecule has been incorporated to the system (see below). The polarizable continuum method developed in our laboratory<sup>44–47</sup> has been used (dielectric constant  $\epsilon = 46.7$ ). We assume a molecular-shaped cavity and a multicentric multipole development of the reaction-field potential (up to 4th order). The cavity is defined by a scaled van der Waals surface with Bondi radii multiplied

by a factor 1.308. All the geometries have been fully optimized at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.<sup>48,49</sup> Harmonic frequencies have been computed at the same level for identifying the stationary points as minima or transition structures (TS). Besides, minima connected by the TSs have been verified via intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations. Zero-point energies, thermal contributions to the enthalpy, and entropic terms have been computed in the usual way using the ideal gas approximation. Gibbs free energies are given relative to the initial complex after adding an empirical correction, as explained below.

To improve the accuracy on computed electronic energies, we have carried out MP2 single-point energy calculations on B3LYP optimized geometries. In that case, we use the extended basis set 6-311+G(3d2f,2df,2p) that is employed in the MP2 step of the CBS-QB3 method.<sup>50</sup> Unfortunately, in a few cases, this large basis set leads to solvation energy convergence problems. To avoid this difficulty and for the sake of homogeneity, MP2 calculations in solution have been done at the MP2/6-311G(d,p) level corrected by computations in gas phase at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) level according to

$$E_{\text{s}}(\text{B}) = E_{\text{s}}(\text{A}) + [E_{\text{g}}(\text{B}) - E_{\text{g}}(\text{A})] \quad (3)$$

where  $E_{\text{g}}$  ( $E_{\text{s}}$ ) represents the electronic energy in gas-phase (solution) and A or B means MP2/6-311G(d,p) or MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) levels. This approximation has been tested in the case of the sulfurane intermediate described below, which plays a main role in the process, and shows the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energy to be very close to the approximated value obtained from eq 3 (difference 1 kcal/mol).

The approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies are used along the text and figures, unless otherwise stated. Corrections for basis set superposition error (BSSE) are not included in the energies presented below because with such a large basis set; BSSE has been found to represent a minor correction.

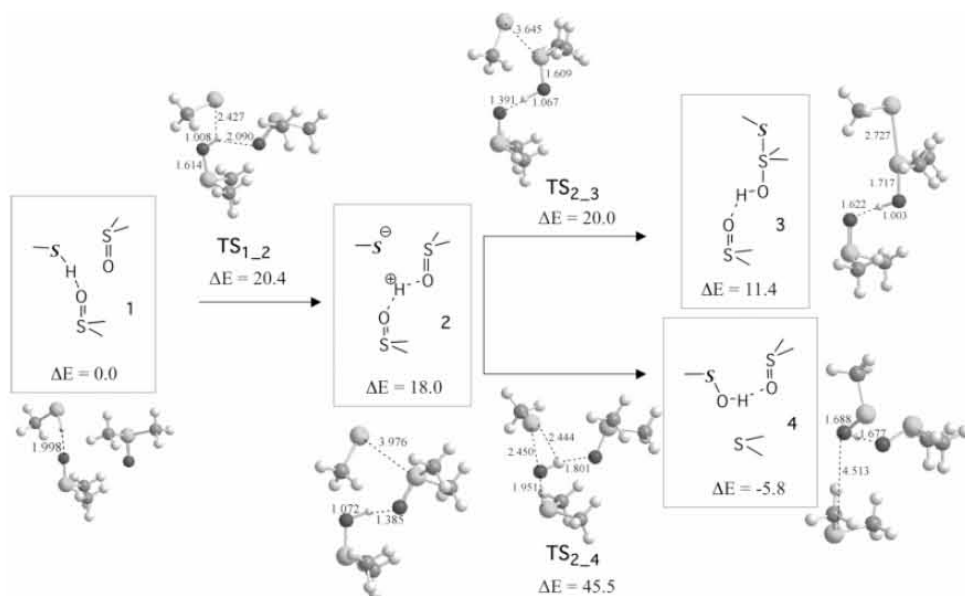
Electronic populations have been described in terms of a natural population analysis (NPA)<sup>51</sup> and Mayer bond orders.<sup>52</sup> All the calculations have been carried out using the Gaussian98 package.<sup>53</sup>

### Results

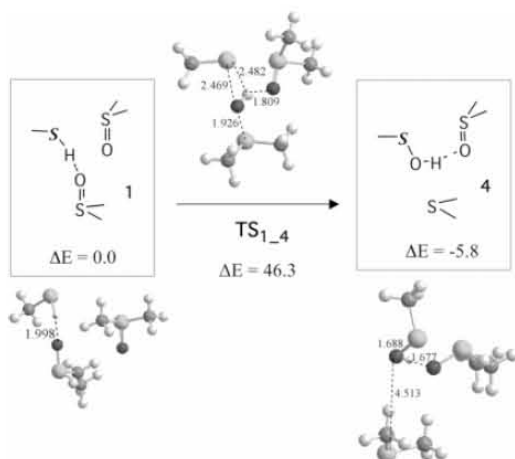
As mentioned above, Wallace and Mahon<sup>23</sup> showed that the reaction in DMSO is pseudo-first order in thiol concentration. Since the whole process, as it is proposed, involves two thiol molecules, one may conclude that each thiol molecule concerns a different reaction step. This has been assumed in our calculations. For clarity of the presentation, the results will be separated in four parts devoted to: (1) the reaction of a thiol molecule with DMSO and the formation of a sulfurane reaction intermediate, (2) the analysis of the properties of the sulfurane intermediate, (3) the activation of the reaction intermediate OH group by a second thiol molecule, and (4) the formation of the products.

Only a few geometrical parameters for the main structures will be presented below. Cartesian coordinates are available as Supporting Information as well as a full description of the transition vectors in transition structures.

**Methanethiol Reaction with DMSO.** Though experimental measurements suggest that a sulfurane intermediate is formed at this reaction step, we have envisaged the formation of both a sulfurane and a sulfenic acid. In principle, these compounds might be obtained through concerted or stepwise processes. In



**Figure 1.** Schematic representation of the chemical species involved in stepwise reactions of methanethiol and DMSO and optimized structures at the B3LYP/6-311G\*\* level (reactants, intermediates, transition structures) and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies in DMSO solution.  $\Delta E$  includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to complex 1. Values are in angstroms and kcal/mol.



**Figure 2.** Schematic representation of the chemical species involved in the concerted reaction of methanethiol and DMSO to yield a sulfenic acid and optimized structures at the B3LYP/6-311G\*\* level (reactants, intermediates, transition structures) and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) energies in DMSO solution.  $\Delta E$  includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to complex 1. Values are in angstroms and kcal/mol.

the stepwise process, an ion pair should initially be formed through proton transfer from the thiol to DMSO. In our computations, the reactants are described by a hydrogen-bonded complex involving methanethiol and two DMSO molecules. We then explore the potential energy surface of the complex looking for stationary points. Stepwise processes leading to either the sulfurane or the sulfenic acid have been obtained and are shown in Figure 1. A concerted process leading to sulfenic acid has also been identified and is represented in Figure 2. However, any transition structure for a direct formation of a sulfurane intermediate 3 from 1 could be located. Figures 1 and 2 include some optimized geometrical parameters as well as the predicted values for relative energies. Note that various conformations for the ion pair 2 have been obtained lying in a narrow energy range. For simplicity, we do not describe them in detail.

The predicted energies clearly suggest that formation of the sulfenic acid at this reaction step is very unlikely, the energies of  $TS_{1-4}$  or  $TS_{2-4}$  being quite high (both TSs exhibit similar energies). Rather, the sulfurane intermediate should be formed in a stepwise process  $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$  that involves an activation energy of 20.4 kcal/mol in the first step and a fast recombination of the ions in 2 to form the adduct 3.

Since polar species are present, one may expect the solvent to play a crucial role in the process. Indeed, long-range electrostatic interactions are fundamental to stabilize the ion pair. Moreover, the analysis of the results shows that hydrogen bonds with the discrete DMSO molecule are very important too. This can be illustrated by looking at the geometries of intermediates 2, 3, and 4 in Figure 1. Structure 2 shows that the hydrogen bond distance between the transferred proton and the oxygen atom of the solvating DMSO is very short (1.385 Å) in agreement with the work by Fu et al.<sup>54</sup> Hydrogen-bond distances in 3 and 4 are larger (1.622 and 1.677 Å, respectively) but still correspond to strong interactions.

Hydrogen bonds in transition structures are also noticeable.  $TS_{1-2}$  merits some specific comments. As shown, proton transfer has already taken place in this transition structure. IRC calculations confirm that the reaction coordinate at the TS basically corresponds to a rearrangement of the DMSO solvent molecule that is necessary to stabilize the charge separation. Another interesting result concerns the reaction  $1 \rightarrow 3$ . A TS may be located in gas phase, whereas in solution, computations systematically lead to  $TS_{1-2}$  and show that, to a large extent, this is due to interactions with the explicit solvent DMSO molecule.

**Properties of the Sulfurane Reaction Intermediate.** We describe here some properties of the sulfurane molecule  $CH_3S-S(CH_3)_2-OH$ , which is present in complex 3. For the sake of comparison, we have carried out further calculations for the sulfurane species in gas phase. Results in solution correspond to the discrete-continuum model.

Sulfuranones<sup>55-76</sup> are intermediates in various oxidation-reduction reactions of sulfur compounds.<sup>28,55,56,68</sup> They bear a

tetravalent sulfur in the center of a trigonal bipyramidal structure with the more electronegative ligands at the apical positions.<sup>59–62</sup> The simplest sulfurane  $\text{SH}_4$  seems to be an exception, calculations predicting a square pyramidal geometry.<sup>63</sup> The electronic structure of sulfuranes has been the subject of a number of theoretical studies.<sup>64–66,75</sup> In a very simplified approach, the S atom is supposed to be  $\text{sp}^2$  hybridized. The remaining p orbital and the orbitals of the apical ligands combine to give an occupied bonding, an occupied nonbonding, and an empty antibonding molecular orbitals. Sulfur d orbitals are not needed for a qualitative description of the bonding, but their inclusion improves the results (e.g., bond orders<sup>72,76</sup>).

In the case of  $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$ , d orbitals have a significant influence on the results. For instance, when full geometry optimization is carried out without d orbitals, the apical bond lengths become significantly longer (by about 0.15 Å). Indeed, in that case, the electronic structure agrees with a 3-center 4-electron bonding scheme. The apical ligands are, as expected, the most electronegative ones, i.e.,  $-\text{OH}$  and  $-\text{SCH}_3$ . Other arrangements of the sulfurane ligands have been envisaged. In most cases, geometry optimization leads either to the most stable structure or to system dissociation. Only one energy minimum involving an exchange between the apical  $-\text{SCH}_3$  and the equatorial  $-\text{CH}_3$  groups has been obtained though it is much less stable than 3 (by 21.2 kcal/mol).

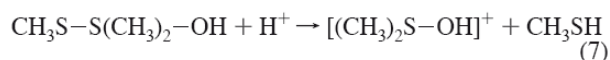
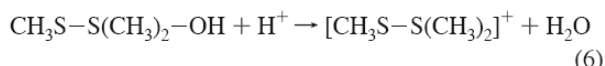
It is noteworthy that solvent effects on the geometry of the sulfurane are quite large. The computed S–O and S–S distances in the gas phase are 1.905 and 2.410 Å, respectively. In DMSO solution, the S–O bond shortens to 1.717 Å and the S–S bond lengthens to 2.727 Å, indicating a marked tendency of the solvent to favor dissociation of 3 into  $(\text{OH})(\text{CH}_3)_2\text{S}^+$  and  $\text{CH}_3\text{S}^-$ . This is confirmed by the analysis of net atomic charges and bond orders in Table 1.

The S–S bond order is much weaker than the S–O bond, especially in solution. Most of the reactions of sulfuranes involves the cleavage of an apical bond yielding a sulfonium cation,  $\text{RR}'\text{R}''\text{S}^+$ .<sup>61,69,71</sup> In the case of  $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$ , departure of the apical thiolate ligand seems more plausible than departure of the hydroxyl one. Indeed, if one compares the two dissociation processes



the second one is found to be favored by about 14 kcal/mol in DMSO solution (reaction free energies are 16.9 and 2.7 kcal/mol, respectively, using the discrete–continuum model and assuming the DMSO discrete solvent molecule interacting with the cations).

However, this scheme may be reversed when interactions with a proton donor are allowed due to the larger basicity of the hydroxyl compared to that of the thiolate. Thus, if one compares the processes

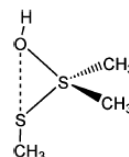


one finds that the first one is preferred by about 7 kcal/mol (reaction free energies are  $-21.3$  and  $-14.1$  kcal/mol, respectively, using the discrete–continuum model and the experi-

**TABLE 1: NPA Atomic Charges ( $q$ ) and Mayer Bond Orders ( $B$ ) Computed for the Sulfurane  $\text{CH}_3\text{S}-\text{S}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$  at the MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) level**

	gas	DMSO solution
$q_{\text{S(central)}}$	0.885	1.085
$q_{\text{O}}$	$-0.974$	$-0.929$
$q_{\text{S(apical)}}$	$-0.214$	$-0.586$
$B_{\text{S-O}}$	0.931	1.243
$B_{\text{S-S}}$	0.628	0.220

**SCHEME 2**



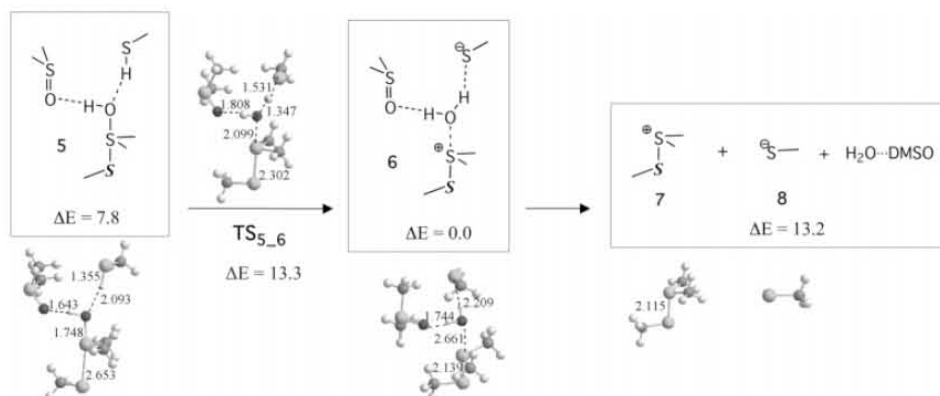
mental<sup>43</sup> solvation energy of a proton in DMSO; besides the DMSO discrete solvent molecule is assumed to interact with the cations).

According to these results, one can expect a marked pH influence on the sulfurane intermediate stability. Here, we are assuming a neutral medium, but proton transfer from a thiol molecule to the sulfurane is likely to occur and therefore such a process will be considered below. One should keep in mind however that in the process catalyzed by Msr enzymes, sulfenic acid formation occurs prior to participation of a second cysteine residue (see Scheme 1). The involvement of other residues able to stabilize the leaving hydroxyl group cannot be excluded but needs further investigation. In this paper, we have envisaged the possibility for the sulfurane species to lead to a sulfenic acid directly, i.e., without protonation of the hydroxyl group. Examination of the potential energy surface for structures of the type shown in Scheme 2 leads to location of a transition state exhibiting high activation energy (40.6 kcal/mol above intermediate 3). Thus, it is likely not operative in the chemical process.

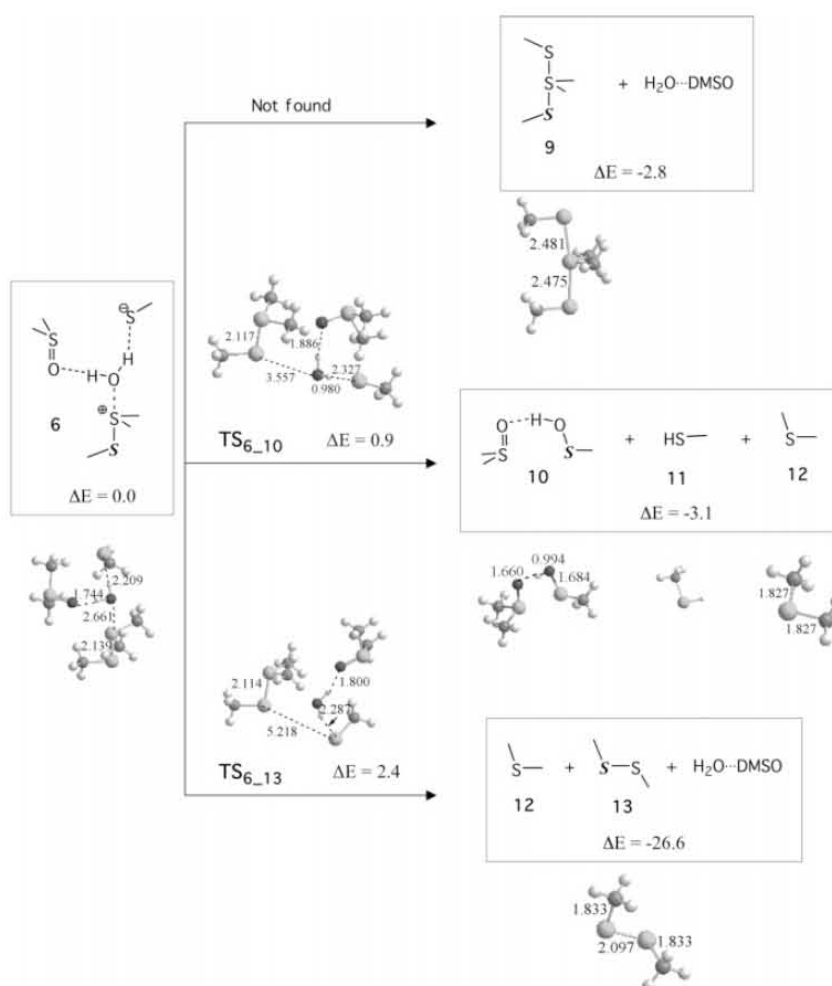
**Activation of the Sulfurane OH Group by a Second Methanethiol Molecule.** Reaction of a second thiol molecule with the sulfurane is schematized in Figure 3. The pre-reactive hydrogen-bonded complex **5** formed by **3**, and  $\text{CH}_3\text{SH}$  is slightly bound. From **5**, the reaction proceeds by a low-barrier proton transfer from methanethiol to the sulfurane  $-\text{OH}$  group. This activates the cleavage of the sulfurane S–O bond, leading to the ion-pair complex **6**. The latter may dissociate to the separated ions, thiosulfonium **7** and thiolate **8**, plus a water molecule but, as shown in the next section, the ions may also react prior to dissociation. We have not tried to locate transition structures for the association/dissociation processes  $3 + \text{CH}_3\text{SH} \rightarrow 5$  and  $6 \rightarrow 7 + 8 + \text{H}_2\text{O}$  since the continuum model is not well adapted for such calculations. The hypothetical TSs are expected not to play a significant role anyway.

**Formation of Products.** The envisaged processes from **6** are summarized in Figure 4. In the products of these reactions, the explicit solvent DMSO molecule is assumed to interact with the water molecule or with the sulfenic acid because these species form the strongest hydrogen bonds.

Compound **9** (top reaction in Figure 4) is easily formed by the attack of the negatively charged sulfur atom of the thiolate on the positively charged sulfur atom of the thiosulfonium. We have not been able to locate the TS for this reaction. Indeed, our calculations suggest that the ion-pair complex **6** is metastable with the water molecule stabilizing the charge separation. A small perturbation of the system provokes the anion–cation



**Figure 3.** Schematic representation of the chemical species involved in the reaction of methanethiol with 3 and optimized structures (reactants, intermediates, transition structures) at the B3LYP/6-311G\*\* level in DMSO solution and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies.  $\Delta E$  includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to separated 1 + CH<sub>3</sub>SH. Values are in angstroms and kcal/mol.

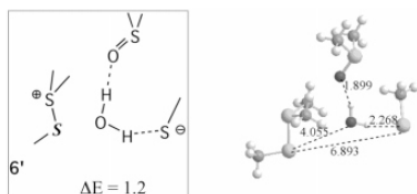


**Figure 4.** Schematic representation of the chemical species involved in various possible reactions of the thiolate, thiosulfonium ion and water and optimized structures at the B3LYP/6-311G\*\* level in DMSO solution and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies.  $\Delta E$  includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to separated 1 + CH<sub>3</sub>SH. Values are in angstroms and kcal/mol.

reaction and the formation of the sulfuranone 9. The structure of 9 is similar to that of 3 and simply differs from it by a hydroxyl/thiolate group exchange. Experimentally, it is known that if a sulfuranone has an alkoxy ligand, it can be exchanged readily with the alkoxy group of an alcohol.<sup>57,61</sup> Our results indicate that such a rapid exchange can also take place between -OH and

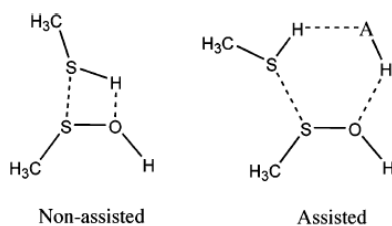
-SR ligands in the presence of thiols. Sulfuranone 9 should undergo further processes similar to those of sulfuranone 3, and therefore it is not expected to be a final product of the reaction.

In another reaction mechanism (middle reaction in Figure 4), complex 6 leads to formation of a sulfenic acid 10, a thiol 11, and a thioether 12 by crossing the transition structure TS<sub>6-10</sub>.



**Figure 5.** Structure 6' is formed from reorientation of the species in 6 and is appropriate for the formation of a sulfenic acid 10, a thiol 11, and a thioether 12 shown in Figure 4 (middle reaction) and optimized structures at the B3LYP/6-311G\*\* level in DMSO solution and approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies.  $\Delta E$  includes the electrostatic free energy of solvation in the dielectric continuum and is given relative to  $1 + \text{CH}_3\text{SH}$ . Values are in angstroms and kcal/mol.

### SCHEME 3



Note however that IRC calculations have shown that this TS cannot be directly attained from 6. Some preliminary reorganization is needed so that: (1) the water molecule can donate a proton to the thiolate anion and (2) the forming  $\text{OH}^-$  can attack the neutral sulfur atom of the thiosulfonium cation in a  $\text{S}_{\text{N}}2$  type reaction. A structure of this type (6') is displayed in Figure 5. It lies at 1.2 kcal/mol above 6. The arrangement shown is not the only possible one, but we have not made a systematic search in this case. Neither the cleavage of the S–S bond nor the proton transfer from the water to the thiolate has started at  $\text{TS}_{6 \rightarrow 10}$ . Both initiate spontaneously after crossing this TS, as detailed examination of the potential energy surface and IRC computations have revealed.

Sulfenic acids are rather reactive compounds. Thus, if a sulfenic acid is formed during the sulfoxide reduction reaction, it would rapidly disappear to form the disulfide product that is the experimentally observed species. In principle, one can imagine a condensation reaction with a thiol going through transition structures as indicated in Scheme 3. The process may undergo bifunctional catalysis in the presence of ancillary AH species, such as water or a second thiol molecule. Calculations for the nonassisted process in solution (using, as before, the discrete–continuum model) leads to a rather high activation energy ( $\Delta E = 39.3$  kcal/mol with respect to a separated thiol and DMSO–sulfenic acid complex). Calculations for the assisted reaction show also that assistance by a second thiol molecule is not very efficient whereas assistance by water molecules may considerably reduce the barrier. Indeed, when a linear water trimer is considered as the ancillary AH species, the activation barrier is drastically reduced to 1.2 kcal/mol (relative to the separated species; neither zero-point energy nor thermal corrections are included in this value). Reactions involving more than one sulfenic acid molecule could be invoked too. For instance, computations show that two sulfenic acid molecules may react to give  $(\text{CH}_3)_2\text{S}-\text{O}-\text{S}-(\text{CH}_3)$  in the presence of a third sulfenic acid with an extremely low energy barrier ( $\Delta E = 0.1$  kcal/mol). A detailed analysis of these processes is beyond the objectives of the present work and will not be considered further.

The third process in Figure 4 (bottom reaction) is of the  $\text{S}_{\text{N}}2$  type and leads to the disulfide 13 and the thioether 12. Again, the transition structure  $\text{TS}_{6 \rightarrow 13}$  corresponds to a rearrangement of the complex 6 (actually, IRC calculations from this TS lead to conformation 6' rather than 6). In the present case, it puts the sulfur atom of the thiolate in a suitable position for a nucleophilic attack on the neutral sulfur atom of the thiosulfonium cation. Bond cleavage and bond formation take place immediately after  $\text{TS}_{6 \rightarrow 13}$  crossing without any further energy barrier.

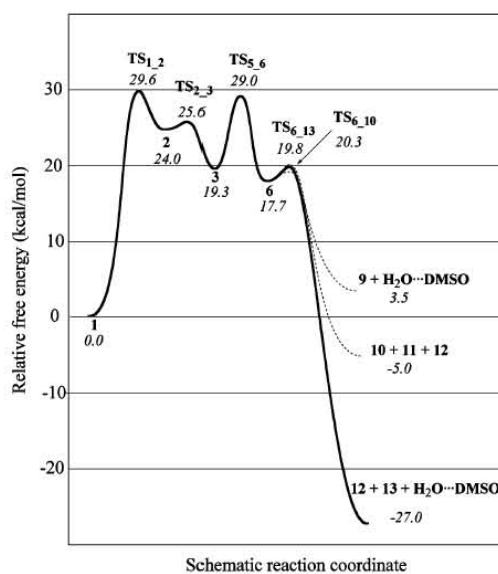
The transition structures  $\text{TS}_{6 \rightarrow 10}$  and  $\text{TS}_{6 \rightarrow 13}$  are only slightly above the complex 6. Therefore, the corresponding reactions are expected to be extremely fast and competing. This finding is in agreement with previous studies in the literature<sup>77–81</sup> on  $\text{S}_{\text{N}}2$  reactions for compounds containing S–S bonds. When the leaving group is neutral, the cleavage of the S–S bond is very easy.

### Discussion

**Free-Energy Profile.** As said in the computational section, complex 1 is taken as a free-energy reference. Analysis of translational, rotational, and vibrational contributions suggested however that  $G$  must be corrected for this complex due in particular to significant underestimation of the entropy. Indeed, computing accurate  $G$  values of low-bound complexes is a difficult task that would require ad hoc statistical mechanics simulations. In the present work, we have rather adopted a pragmatic approach using an empirical correction that has been obtained as follows. We first compute the free energy for the ionization process  $1 \rightarrow \text{CH}_3\text{S}^- + \text{H}^+(\text{DMSO})_2$  in DMSO solution (assuming the ions separated at infinite). By use of standard techniques, the free energy of this model reaction amounts 15.3 kcal/mol that is expected to be smaller than the experimental ionization energy. The experimental  $\text{pK}_{\text{a}}$  of methanethiol in DMSO is not available, but it may be estimated from the reported value for  $\alpha$ -toluenethiol, 15.3.<sup>54</sup> The corresponding free energy of ionization is 20.9 kcal/mol. The difference (5.6 kcal/mol) may basically be ascribed to the computational error for the entropy of complex 1. For the other structures, no correction has been added but one should note that for those species displaying weak interactions with the solvent DMSO molecule (like 5, 6, and  $\text{TS}_{5 \rightarrow 6}$ ), the computed free-energy values might be a little overestimated.

With this correction, the free-energy profile (at 298 K) for the whole reaction path is schematized in Figure 6. Let us summarize the process. Initially, proton transfer occurs from the thiol to the sulfoxide generating an ion-pair complex stabilized by the solvent. The ions recombine to form the sulfurane 3. This intermediate can accept a proton from a second thiol molecule, and the process leads to the formation of a sulfonium cation, a thiolate anion, and a water molecule. The latter reacts quite easily to form, depending on the relative orientation of the species, a new sulfurane compound, a sulfenic acid, or a disulfide. As shown, the calculations predict that the first step should be the rate-limiting one since the corresponding transition state is the highest one along the reaction path (29.6 kcal/mol). The activation energies of all the steps following the first one are substantially smaller. Note however that the transition state for the third step ( $\text{TS}_{5 \rightarrow 6}$ ) lies only slightly below the highest TS (29.0 vs 29.6 kcal/mol).

The larger stability predicted for the disulfide is consistent with the experimental fact that it is the only observed product in the case of the reaction in solution. The sulfurane 9 and the sulfenic acid 10 are shown in Figure 6 for comparison. Though



**Figure 6.** Free-energy profile for the reduction of DMSO by methanethiol in DMSO solution. The  $x$ -axis represents a schematic reaction path combining several coordinates for individual steps. Approximate MP2/6-311+G(3d2f,2df,2p) relative energies (in italics, in kcal/mol) using optimized structures at the B3LYP/6-311G\*\* level and eq 3. The hydrogen-bonded structure 5 ( $\Delta G = 23.7$  kcal/mol) is not included for simplicity. It lies between 3 and  $TS_{5-6}$ .

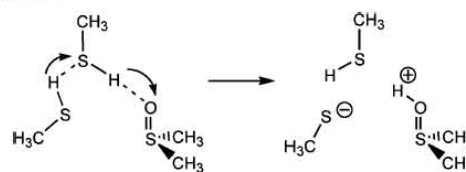
our theoretical study suggests that these intermediates could be formed in the process, they should rapidly react making their experimental detection in solution difficult or even unfeasible.

**Comparison with Experimental Data in Solution.** Kinetic studies by Wallace and Mahon<sup>23</sup> proposed the reaction mechanism summarized in eqs 1 and 2. The authors deduced a negligible value for  $k_{-2}$  and obtained  $k_2 \gg k_1$ . Qualitatively, our calculations are in very good agreement with these experimental findings. We show however that the formation of the intermediate 3 (eq 1) actually involves two steps, ionization, which is rate-determining, and ion recombination, which is a fast reaction.

Experimental data for methanethiol was not reported, but as noted in the Introduction, results for  $\alpha$ -toluenethiol should be a good approximation. The measured pseudo-first-order rate constant,  $k'$ , at 100 °C with DMSO being the reagent in excess was  $4.03 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .<sup>23</sup> Since the reaction was shown to be first order in DMSO concentration, the true kinetic constant  $k$  corresponding to the second-order reaction is derived from  $k' = k \cdot [\text{DMSO}]$ . Taking  $[\text{DMSO}]$  as the concentration of the pure liquid ( $[\text{DMSO}] = 14.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) and using transition state theory, the experimental free energy of activation is estimated to be 31.4 kcal/mol for  $\alpha$ -toluenethiol, which is in satisfactory agreement with our computed value 29.6 kcal/mol for methanethiol considering the different approximations made. Note also that these values correspond to different temperatures. An estimation of the free energy of activation at 100 °C gives 30.5 kcal/mol (assuming the same dielectric constant and empirical correction to free energy that the one used above).

Let us now consider the products of the reaction. Our study predicts the formation of sulfenic acid 10 and disulfide 13 in competing reactions. The disulfide is the most stable species, and if thermodynamic control would apply, only this species should be observed. However, the sulfenic acid is substantially more stable than 6 and backward reaction appears to be unlikely. In the experimental work of Wallace and Mahon,<sup>23</sup> the only reported product was the disulfide although it is not clear

**SCHEME 4**



whether the authors tried to identify a sulfenic acid or not. Hence, the calculations agree with experimental data in predicting 13 as the major reaction product but points out to a possible formation of a secondary product 10.

**Proton Relay Mechanism, Bifunctional Catalysis.** The rate-determining step in the sulfoxide reduction reaction involves the ionization of the system through a proton transfer process from the thiol to the sulfoxide. This process may substantially be favored by proton relay mechanisms and bifunctional catalysis. A typical process is illustrated in Scheme 4, where we assume that two methanethiol molecules are involved in DMSO protonation. The structures of the complex and of the proton-transfer TS have been optimized. The computed activation energy is 19.6 kcal/mol that may be compared with the corresponding value for the nonassisted process in Figure 1, 20.4 kcal/mol. Computation of the activation free energy in solution is not straightforward for the same reasons as those presented above for the nonassisted ionization mechanism. However, one may obtain a rough evaluation of the bifunctional catalytic effect by computing the quantity

$$\delta\Delta G^\ddagger = G(\text{TS}_{\text{Ass}}) - G(\text{TS}_{1-2}) - G(\text{CH}_3\text{SH}) + G(\text{DMSO})$$

where  $\text{TS}_{\text{Ass}}$  and  $\text{TS}_{1-2}$  represent the transition structures for the assisted proton-relay (Scheme 4) and nonassisted (Figure 1) mechanisms, respectively. The expression is rigorous in the gas phase provided the molecules are assumed to be separated at infinity in the reactant state and can be considered to be a reasonably good approximation for the process in solution. Our computations lead to a free energy barrier decrease of  $\delta\Delta G = -1.7$  kcal/mol. A comparable effect may be expected if water molecules or other chemical species bearing bifunctional groups are present in the reaction medium.

We shall not describe here the details of the subsequent steps for the assisted reduction reaction. In principle, one could expect the formed ions to recombine and form a sulfuran intermediate, as in the nonassisted process above. Our calculations show sulfuran formation from the ions in Scheme 4 to be a feasible reaction though it requires a larger activation free energy than sulfuran formation from the ions in 2. In the latter structure, the explicit solvent DMSO molecule provides a significant stabilization effect. Such an interaction is absent in the system shown in Scheme 4 where it is replaced by the interaction of the ions with an extra thiol molecule. Thus, an increase in thiol concentration may lead to a change of the reduction process kinetics due to two main factors: (1) decrease of the activation entropy associated to the proton relay mechanisms and (2) modification of the solute–solvent intermolecular interactions. Obtaining quantitative results for a given  $[\text{DMSO}]/[\text{methanethiol}]$  ratio would need taking into account the interactions with the solvent in a more rigorous way although due to increasing system complexity such a study might also require to combine quantum mechanical calculations with statistical simulations.

## Conclusions

The calculations carried out in this work confirm the experimental result that the reduction of sulfoxides by thiols in



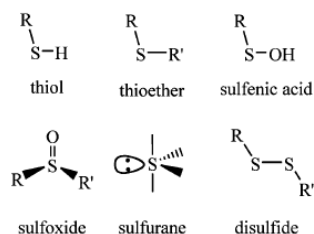
DMSO solution basically involves the slow formation of a sulfurane intermediate followed by a fast decay of this intermediate into the products. The computed activation free energy for the model reaction methanethiol + DMSO (29.6 kcal/mol) is close to the experimental value for the reaction of DMSO with  $\alpha$ -toluenethiol (31.4 kcal/mol, deduced here from reported kinetic constants at 100 °C). Nevertheless, our study provides further insight in the reaction mechanism that appears to be more complicated. First, the sulfurane intermediate is formed in a stepwise reaction after ionization of the thiol-sulfoxide system, proton transfer being rate determining. Once formed, the sulfurane rapidly reacts with another thiol molecule. Sulfonium and thiolate ions are formed at this step that recombine to form sulfenic acid or disulfide, the latter being much more stable than the former.

In the catalytic mechanism of Msrs, a sulfenic acid intermediate has clearly been shown to be formed. Therefore, it is probable that the sulfenic acid was not reported in the experimental chemical study because it undergoes a fast decay into a disulfide species due to the presence of thiol. In that context, comparison of enzymatic and in solution processes is not straightforward. For instance, it is not clear which chemical group in the enzymatic process could play the activation role postulated for the second thiol molecule in the solution process (Figure 3). What is certain is that the recycling cysteine is not involved since the sulfenic acid intermediate is efficiently formed in its absence. Hence, understanding the mechanism in the active site of Msr enzymes deserves further investigation.

## Glossary

Scheme 5 summarizes the nomenclature of sulfur compounds appearing in this study.

## SCHEME 5



**Acknowledgment.** B. B. acknowledges postdoctoral positions from Tubitak and from the University of Nancy 1. The authors thank the CNRS, the University of Nancy 1, the PRST “Bioingénierie”, and the French Ministry of Research (ACI IMPBio program, project SIRE) for financial support.

**Supporting Information Available:** Cartesian coordinates of all the optimized structures and transition vectors in transition structures are available as Supporting Information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References and Notes

- Moskovitz, J.; Poston, J. M.; Berlett, B. S.; Nosworthy, N. J.; Szczepanowski, R.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14167–14172.
- Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Honek, J. F.; Matthews, B. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 6463–6468.
- Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Matthews, B. W. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13307–13312.
- Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Sanglier-Cianferani, S.; Talfournier, F.; Van Dorsselaar, A.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35908–35913.
- Tête-Favier, F.; Cobessi, D.; Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. *Struct. Fold. Des.* **2000**, *8*, 1167–1178.
- Boschi-Muller, S.; Azza, S.; Branlant, G. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2272–2279.
- Grimaud, R.; Ezraty, B.; Mitchell, J. K.; Lafitte, D.; Briand, C.; Derrick, P. J.; Barras, F. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48915–48920.
- Kumar, R. A.; Koc, A.; Cerny, R. L.; Gladyshev, V. N. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37527–37535.
- Lowther, W. T.; Weissbach, H.; Etienne, F.; Brot, N.; Matthews, B. W. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 348–352.
- Olry, A.; Boschi-Muller, S.; Marraud, M.; Sanglier-Cianferani, S.; van Dorsselaar, A.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12016–12022.
- Taylor, A. B.; Benglis, D. M., Jr.; Dhandayuthapani, S.; Hart, P. J. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 4119–4126.
- Antoine, M.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45352–45357.
- Kim, H.-Y.; Gladyshev, V. N. *Mol. Biol. Cell.* **2004**, *15*, 1055–1064.
- Olry, A.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G. *Biochem.* **2004**, *43*, 11616–11622.
- Coudeville, N.; Thureau, A.; Azza, S.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Cung, M.-T. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 363–364.
- Thureau, A.; Olry, A.; Coudeville, N.; Azza, S.; Boschi-Muller, S.; Branlant, G.; Cung, M.-T. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 223–224.
- Boschi-Muller, S.; Olry, A.; Antoine, M.; Branlant, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 231–238.
- Lipton, S. H.; Bodwell, C. E. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 235–237.
- Otaka, A.; Koide, T.; Shide, A.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1223–1226.
- Akaji, K.; Tatsumi, T.; Yoshida, M.; Kimura, T.; Fujiwara, Y.; Kiso, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4137–4143.
- Yiannios, C. N.; Karabinos, J. V. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3246–3248.
- Wallace, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2018–2021.
- Wallace, T. J.; Mahon, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4099–4103.
- Wallace, T. J.; Mahon, J. J. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1502–1506.
- Epstein, W. W.; Sweat, F. W. *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 247–260.
- Lowe, O. G. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2096–2098.
- Lowe, O. G. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2061–2064.
- Madesclaire, M. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6537–6580.
- Arterburn, J. B.; Perry, M. C.; Nelson, S. L.; Dible, B. R.; Holguin, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9309–9310.
- Abu-Omar, M. M.; Khan, S. I. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4979–4985.
- Arnáiz, F. J.; Aguado, R.; Pedrosa, M. R.; De Cian, A. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *347*, 33–40.
- Hirano, M.; Yakabe, S.; Monobe, H.; Morimoto, T. *J. Chem. Res.* **1998**, 472–473.
- Davis, F. A.; Rizvi, S. Q. A.; Ardecky, R.; Gosciniak, D. J.; Friedman, A. J.; Yocklovich, S. G. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1650–1653.
- Davis, F. A.; Jenkins Jr, R. H.; Rizvi, S. Q. A.; Yocklovich, S. G. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3467–3474.
- Davis, F. A.; Billmers, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7016–1018.
- Davis, F. A.; Billmers, R. L. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2593–2595.
- Davis, F. A.; Jenkins, L. A.; Billmers, R. L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1033–1040.
- Goto, K.; Holler, M.; Okazaki, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1460–1461.
- Ishii, A.; Komiya, K.; Nakayama, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12836–12837.
- Allison, W. S. *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 293–299.
- Claiborne, A.; Yeh, J. I.; Mallett, T. C.; Luba, J.; Crane, E. J., III; Charrier, V.; Parsonage, D. *Biochem.* **1999**, *38*, 15407–15416.
- Poole, L. B.; Karplus, P. A.; Claiborne, A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 325–347.
- Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 1622–1627.
- Rivail, J.-L.; Rinaldi, D. *Chem. Phys.* **1976**, *18*, 233–242.
- Rinaldi, D.; Ruiz-López, M. F.; Rivail, J.-L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 834–838.
- Dillet, V.; Rinaldi, D.; Rivail, J.-L. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5034–5039.
- Rinaldi, D.; Bouchy, A.; Rivail, J.-L.; Dillet, V. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 2343–2350.
- Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- Montgomery, J. A., Jr.; Frisch, M. J.; Ochterski, J. W.; Petersson, G. A. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 2822–2827.
- Reed, A. E.; Weinstock, R. B.; Weinhold, F. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735–746.
- Mayer, I. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *97*, 270–277.

## Annexe 1

- (53) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Rega, N.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.11.3; Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2002.
- (54) Fu, Y.; Liu, L.; Li, R.-Q.; Liu, R.; Guo, Q.-X. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 814–822.
- (55) Johnson, C. R.; Rigau, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5398–5399.
- (56) Owsley, D. C.; Helmkamp, G. K.; Rettig, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5239–5242.
- (57) Martin, J. C.; Arhart, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2339–2341.
- (58) Martin, J. C.; Arhart, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2341–2342.
- (59) Tolles, M. W.; Gwinn, W. D. *J. Chem. Phys.* **1962**, *36*, 1119–1121.
- (60) Paul, I. C.; Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5010–5017.
- (61) Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *Science* **1976**, *191*, 154–159.
- (62) Downs, A. J.; McGrady, G. S.; Barnfield, E. A.; Rankin, D. W. H.; Robertson, H. E.; Boggs, J. E.; Dobbs, K. D. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3286–3292.
- (63) Yoshioka, Y.; Goddard, J. D.; Schaefer III, H. F. *J. Chem. Phys.* **1981**, *74*, 1855–1863.
- (64) Koutecký, V. B.; Musher, J. I. *Theor. Chim. Acta* **1974**, *33*, 227–238.
- (65) Schwenzer, G. M.; Schaefer, H. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1393–1397.
- (66) Chen, M. M. L.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1647–1653.
- (67) Martin, L. D.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3511–3513.
- (68) Young, P. R.; Hsieh, L.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7121–7122.
- (69) Young, P. R.; McMahon, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7572–7577.
- (70) Kaplan, L. J.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 793–798.
- (71) Martin, J. C.; Perozzi, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3155–3168.
- (72) Ángyán, J. G. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 61–67.
- (73) Loos, M.; Rivail, J.-L.; Kucsman, Á.; Csizmadia, I. G. *J. Mol. Struct.* **1991**, *230*, 143–153.
- (74) Eggers, M. D.; Livant, P. D.; McKee, M. L. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 69–84.
- (75) Volatron, F. *J. Mol. Struct.* **1989**, *186*, 167–184.
- (76) Ángyán, J. G.; Bonnelle, C.; Daudel, R.; Kucsman, Á.; Csizmadia, I. G. *J. Mol. Struct.* **1988**, *165*, 273–287.
- (77) Kice, J. L. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 58–64.
- (78) Pappas, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2926–2930.
- (79) Pappas, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 561–567.
- (80) Loos, M.; Rivail, J.-L.; Csizmadia, I. G. *J. Chim. Phys.* **1991**, *88*, 2465–2472.
- (81) Császár, P.; Csizmadia, I. G.; Viviani, W.; Loos, M.; Rivail, J.-L.; Perczel, A. *J. Mol. Struct.* **1998**, *455*, 107–122.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Archives of Biochemistry and Biophysics xxx (2008) xxx–xxx

[www.elsevier.com/locate/yabbi](http://www.elsevier.com/locate/yabbi)

Review

## The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities

Sandrine Boschi-Muller\*, Adeline Gand, Guy Branlant\*

UMR 7567 CNRS-UHP—Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Nancy Université, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received 30 November 2007, and in revised form 5 February 2008

### Abstract

Oxidation of Met residues in proteins leads to the formation of methionine sulfoxides (MetSO). Methionine sulfoxide reductases (Msr) are ubiquitous enzymes, which catalyze the reduction of the sulfoxide function of the oxidized methionine residues. *In vivo*, the role of Msrs is described as essential in protecting cells against oxidative damages and to play a role in infection of cells by pathogenic bacteria. There exist two structurally-unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB, with opposite stereoselectivity towards the *S* and *R* isomers of the sulfoxide function, respectively. Both Msrs present a similar three-step catalytic mechanism. The first step, called the reductase step, leads to the formation of a sulfenic acid on the catalytic Cys with the concomitant release of Met. In recent years, significant efforts have been made to characterize structural and molecular factors involved in the catalysis, in particular of the reductase step, and in structural specificities.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Msr; Sulfenic acid; Chemical catalysis; Acid/base catalyst; Sulfoxide; Thiol activation; Substrate specificity; Hydrophobic pocket; Thioredoxin; DsbE

Various reactive oxygen and nitrogen species are produced during aerobic metabolism and can accumulate under stress conditions. Oxidative damage to proteins has been involved in a variety of diseases and the aging process. Methionine is one of the amino acids in proteins that are the most sensitive to activated oxygen and nitrogen species. It is converted into methionine sulfoxide (MetSO<sup>1</sup>) as a mixture of two epimers at the sulfur atom, i.e. Met-*S*-SO and Met-*R*-SO [1]. Formation of MetSO may impair the biological function of the oxidized proteins, depending on the location of the MetSO in the protein [2]. Therefore, it is essential for cells to possess enzymes that reduce MetSO

back to Met. This is the role of methionine sulfoxide reductases (Msr), which catalyze the reduction of the sulfoxide function of the oxidized methionine residues. Msrs are described to exert various biological functions *in vivo*. They protect organisms from oxidative damages, are essential regulators of longevity in animal species and can play a role as physiological virulence determinant of some bacterial pathogens [3–6].

Two structurally-unrelated classes of Msrs have been described so far. MsrAs are stereospecific towards the *S* isomer on the sulfur of the sulfoxide function whereas MsrBs are specific towards the *R* isomer. MsrA was the first Msr discovered 27 years ago, whereas the first report concerning MsrB was only published in 2001 [7,8]. In the recent past, Msrs have been the subject of several investigations focusing on their biological functions, structures and mechanism [5,9–12]. Crystal structures for MsrAs from *Escherichia coli*, *Bos taurus*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Populus trichocarpa* have been reported whereas for MsrB, only the structure of the enzyme from *Neisseria*

\* Corresponding authors. Fax: +33 3 83 68 43 07.

E-mail addresses: [sandrine.boschi@maem.uhp-nancy.fr](mailto:sandrine.boschi@maem.uhp-nancy.fr) (S. Boschi-Muller), [guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr](mailto:guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr) (G. Branlant).<sup>1</sup> Abbreviations used: MetSO, methionine sulfoxide; Msr, methionine sulfoxide reductase; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMSOR, dimethyl sulfoxide reductase; Trx, thioredoxin; AcMetSONHMe, Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe; AcMetNHMe, Ac-L-Met-NHMe.

*gonorrhoeae* has been solved [13–17]. Both Msrs characterized to date present a similar three-step catalytic mechanism (Fig. 1) [18,19]. The first step, called the reductase step, leads to the formation of a sulfenic acid on the catalytic Cys with the concomitant release of Met. Then, an intra-disulfide bond is formed, *via* the attack of a second Cys (called the recycling Cys) on the sulfenic acid intermediate and the concomitant release of a water molecule. Finally, the disulfide bond is reduced by thioredoxin (Trx) in the last step. For both classes of Msrs, the rate-limiting step is associated with the Trx-recycling process, whereas the rate of formation of the intra-disulfide bond is governed by that of formation of the sulfenic acid intermediate, the rate of which is fast [20–22].

In the present review, recent chemical, structural and enzymatic data related to MsrA and MsrB catalytic mechanism, in particular of the reductase step and substrate specificities towards MetSO and Trx or Trx-like proteins are presented and discussed in terms of evolution.

### Chemical mechanism of the sulfoxide reduction by thiols

To discuss and interpret the reductase mechanism of Msrs, which has been recently characterized, a brief review of what is known on the electronic structure of the sulfoxide function and on the chemical mechanism of reduction of sulfoxides by thiols has to be introduced.

The electronic structure of the sulfoxide function has been subject to extensive studies. The S–O bond is not a  $p$ - $\pi$  double-bond. Indeed, in addition to the  $\sigma$  bond, a  $\pi$  bond can be formed through the interaction of an unshared electron pair from oxygen and the vacant sulfur d orbitals, resulting in a  $p$ - $d$  double-bond. Moreover, the S–O bond distances deduced from X-ray structures, the values of the IR stretching frequencies and of the dipole moment of the S–O bond determined on chemical models, and theoretical chemical studies on sulfoxide models support a S–O bond with a highly polarized double-bond character

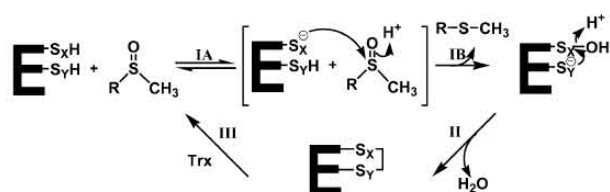


Fig. 1. The three-step mechanism of Msrs (adapted from [12]). In step I, a Michaelis complex is formed between Msr and MetSO (step IA), which precedes the nucleophilic attack of Cys-X on the sulfur atom of the sulfoxide function of MetSO leading to the formation of a sulfenic acid intermediate on Cys-X with a concomitant release of 1 mol of Met per mol of enzyme (step IB). In step II, nucleophilic attack of Cys-Y on the sulfur atom of the sulfenic acid leads to formation of a Cys-X/Cys-Y disulfide bond and a release of a water molecule. In step III, return of the active site to a fully reduced state proceeds *via* reduction of the Msr disulfide bond by reduced Trx. RSOCH<sub>3</sub> and RSCH<sub>3</sub> represent MetSO and Met, respectively. For *N. meningitidis* MsrA, Cys-X = C51 and Cys-Y = C198, for *N. meningitidis* MsrB, Cys-X = C117 and Cys-Y = C63.

[23–27]. In that context, it is important to note that average S–O bond distances, deduced from X-ray studies, increase from 1.492 Å for a free sulfoxide to 1.513 Å for an H-bonding sulfoxide and 1.587 Å for a protonated sulfoxide [28]. Altogether, these data support the S–O bond as a polarized single  $\sigma$  bond with its strength depending mainly on its electrostatic environment and, at least a partially positive and negative charge on the S and O atoms, respectively.

The chemical reduction of sulfoxides by thiols was studied 40 years ago [29,30]. The reaction products were characterized as disulfides and sulfides. The mechanism was shown to proceed through the rate-determining formation of an unstable sulfoxide–thiol adduct of sulfurane type, which is rapidly consumed by reaction with another molecule of thiol (Fig. 2). From kinetic studies, it was also proposed that the reaction proceeds through the protonation of the sulfoxide *via* general acid/base catalysis. No sulfenic acid intermediate was observed under the experimental conditions used in contrast to what was observed in Msrs in which the recycling Cys was substituted by a Ser residue [12,18,19,22]. Recently, quantum chemistry calculations have however shown the possible implication of a sulfenic acid in the chemical reaction in solution [31]. They showed that first, a sulfurane intermediate is formed whose rate is limiting in the overall reduction process. Then, a proton transfer from a second thiol molecule to the sulfurane leads to the formation of either a sulfenic acid or a disulfide though the latter is much more stable than the former in solution. Therefore, the formation of a sulfenic acid intermediate was probably not reported in the experimental chemical study because of its fast decay into a disulfide species due to the presence of thiols.

### Catalysis of the reductase step of Msrs

The rate of the reductase step of both Msrs has been shown to be fast [20,21]. This implies the presence of an acid catalyst to increase the electrophilic character of the sulfur atom of the sulfoxide substrate in order to facilitate the nucleophilic attack of the thiolate of the catalytic Cys and the formation of a sulfurane type transition state. Examination of the available 3D structures of MsrA and MsrB shows that the geometries of the active sites are different and that, except for the catalytic Cys residue, the invariant amino acids present are different (Fig. 3) [17,32]. However, inspection of the crystallographic struc-

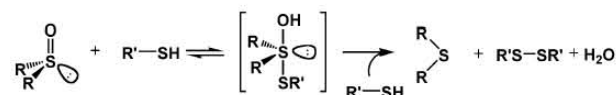


Fig. 2. The reduction of a sulfoxide function by thiols (adapted from [30]). An unstable sulfoxide–thiol adduct of sulfurane type is proposed to be formed. The sulfurane is rapidly consumed by reaction with another molecule of thiol. From kinetic studies, it was established that the rate-determining step is associated to the formation of the sulfurane, and that the reaction is subject to general acid/base catalysis.

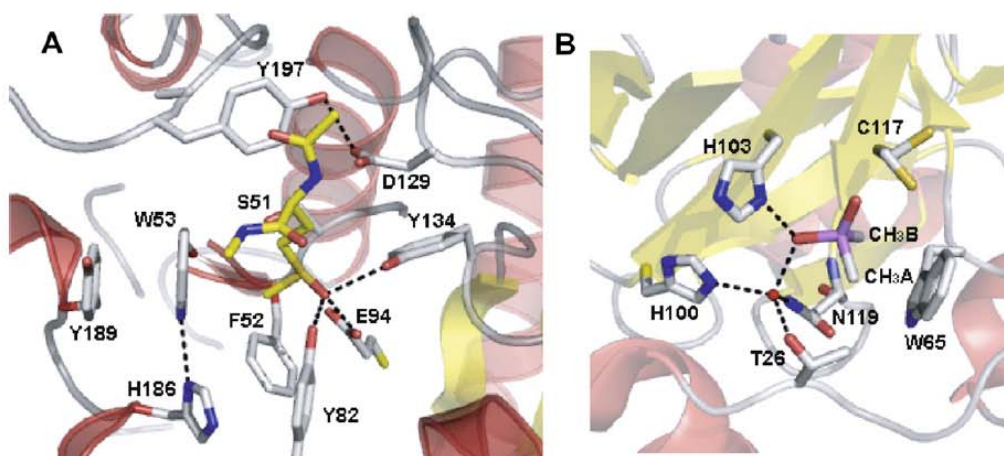


Fig. 3. Schematic representation of the active site of *N. meningitidis* MsrA in complex with AcMetSONHMe (A) and *N. gonorrhoeae* MsrB in complex with a cacodylate molecule (B). (A) Active site of inactive C51S MsrA occupied with a molecule of Ac-*L*-Met-S-SONHMe (Protein Data Bank code 3BQF [32]). The residues of the active site are shown in stick representation with gray carbon and the AcMetSONHMe molecule is shown in stick representation with yellow carbon. Hydrogen bonds are shown as black dashed lines. The  $\epsilon$ -methyl and  $\gamma$ -methylene groups of AcMetSONHMe are localized in a hydrophobic pocket composed by the side chains of Phe-52 and Trp-53. The indole ring of Trp-53 is stabilized *via* a hydrogen bond between the NH group and the N $\delta$  of His-186 (2.92 Å) and *via* a stacking interaction with the phenyl ring of Tyr-189. The oxygen atom of the sulfoxide function interacts by hydrogen bond with the hydroxyl group of Tyr-82 (2.69 Å), the hydroxyl group of Tyr-134 (2.76 Å) and the carboxylate function of Glu-94 (2.56 Å). One of the oxygen atoms of Asp-129 side chain interacts *via* a hydrogen bond with the hydroxyl group of Tyr-197 (2.98 Å). The monitored distance between the  $\epsilon$ -oxygen atom of Glu-94 and the  $\gamma$ -oxygen atom of Ser-51 (mimicking the S atom of the catalytic Cys-51) is 5.06 Å. (B) Active site of *N. gonorrhoeae* MsrB containing a molecule of cacodylate (Protein Data Bank code 1L1D [17]). The residues of the active site and the cacodylate molecule are shown in stick representation with gray carbon. The water molecule present in the active site of MsrB in the crystal structure is also represented by a red sphere and hydrogen bonds are shown as black dashed lines. The side chain of Cys-117 adopts two alternative conformations. The two methyl groups of the cacodylate molecule mimic the  $\epsilon$ -methyl (CH<sub>3</sub> A) and the  $\gamma$ -methylene group (CH<sub>3</sub> B) of the *L*-Met-*R*-SO substrate. The methyl A of cacodylate is localized in a hydrophobic pocket composed by the side chain of Cys-117 and the indole ring of Trp-65. One of the oxygen of cacodylate that represents the oxygen of the sulfoxide function of the substrate interacts through a network of hydrogen bonds, directly, with the N $\delta$  of His-103 (2.5 Å) and, indirectly, *via* a water molecule (2.6 Å) with the N $\epsilon$  of His-100 (2.9 Å), the amide group of Asn-119 (2.9 Å) and the hydroxyl group of Thr-26 (2.6 Å). The monitored distance between the  $\delta$ -nitrogen atom of His-103 and the  $\gamma$ -sulfur atom of the catalytic Cys-117 (for one of the two conformations) is  $\sim$ 6.9 Å. The figure was generated using the PyMol program (Delano Scientific LLC).

tures shows that both active sites possess a hydrophobic pocket, formed by Phe-52 and Trp-53 in MsrA and Trp-65 in MsrB that accommodates the methyl group of the sulfoxide moiety. Hydrogen-bond donors that interact with the oxygen of the sulfoxide, i.e. Glu-94, Tyr-82 and Tyr-134 for MsrA, and His-103 and a water molecule hydrogen-bonded to His-100, Asn-119 and Thr-26 for MsrB are also found (for details, see legend of Fig. 3).

Recently, the role of invariant amino acids of the MsrA and MsrB domain of the PilB protein of *Neisseria meningitidis*, which are involved in the chemical catalysis of the reductase step, has been investigated by comparing the kinetic properties of the wild-type enzyme to those of several Msrs variants [33,34]. The pH dependence of the rate constant of the reductase step for several engineered Msrs has also been determined and compared to that of the wild-type enzyme. Altogether, the kinetic and structural data have allowed us to propose a similar scenario for the MsrA and MsrB reductase step but with the intervention of different catalytic amino acids except for the catalytic Cys (see Fig. 4 and next paragraph). This common mechanism implies for both classes of Msrs (1) the activation of the catalytic Cys within the enzyme-substrate complex (the  $pK_{app}$  of the catalytic Cys is decreased by at least

2 pH units in the Michaelis complex compared to that in free Msr), (2) a proton transfer from the catalytic Cys to the oxygen of the sulfoxide function of substrate, (3) a major role of the protonated form of the sulfoxide function of the substrate in the stabilization of the thiolate form of the catalytic Cys, and (4) a stabilization of the polarized form of the sulfoxide function and of the transition state by active site amino acid residues.

Msrs constitute an interesting model of convergent evolution in which the chemistry imposes the same mechanism but with the intervention of different amino acid catalysts. Indeed, MsrA and MsrB present differences in: (1) the nature of the acid/base catalyst, which is His-103 in MsrB but, is likely, Glu-94 in MsrA, both residues participating to the hydrogen transfer from the catalytic Cys to the oxygen of the sulfoxide function, to the stabilization of the polarized form of the sulfoxide function and of the transition state, (2) the pH- $k_{obs\ max}$  curve, which exhibits a monosigmoidal profile for MsrA with assignment of the  $pK_{app}$  in the ascending limb to the catalytic Cys-51 while, apparently, Glu-94 is not titrable. On the contrary, the MsrB curve displays a bell-shaped profile corresponding to the titration of both Cys-117 and His-103, (3) the  $k_{obs\ max}$  value of the reductase step, which is 16-fold lower for MsrB than for

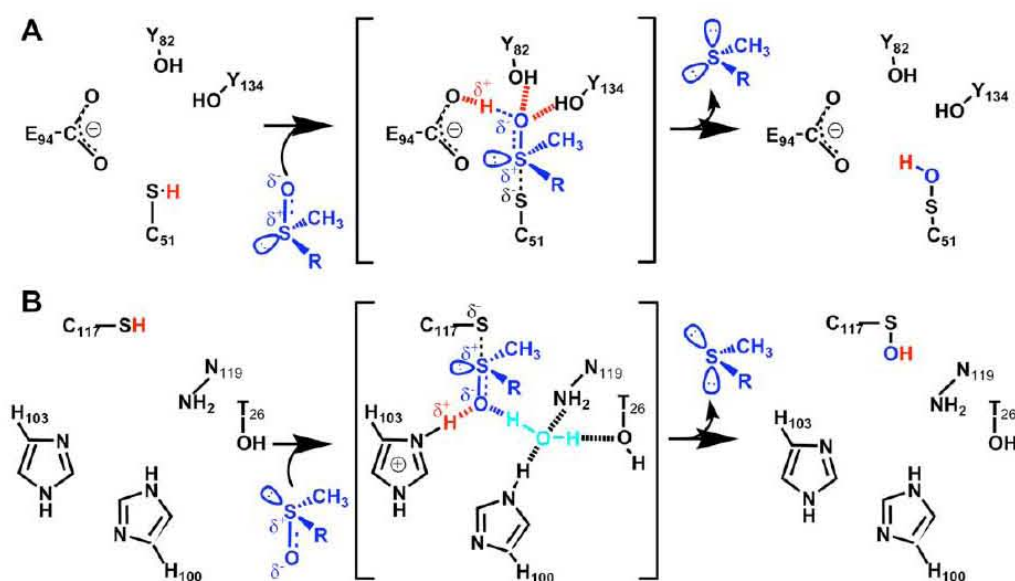


Fig. 4. Proposed catalytic mechanism of the reductase step of MsrA (A) and MsrB (B) from *N. meningitidis* (adapted from [33,34]). For each Msr (A and B), only the catalytic functional groups are represented, i.e. Cys-51, Glu-94, Tyr-82, and Tyr-134 for MsrA and Cys-117, His-100, His-103, Asn-119 and Thr-26 for MsrB. RSOCH<sub>3</sub> and RSCH<sub>3</sub> represent MetSO and Met, respectively. For both Msrs, the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized leading to the formation of a transition state compatible with the formation of a sulfuranone type transition state of bipyramidal geometry. In this transition state, the catalytic Cys is deprotonated. In the last step, the rearrangement of the transition state leads to the formation of a sulfenic acid intermediate on the catalytic Cys residue and of Met. The nature of this rearrangement remains to be determined.

MsrA, and (4) the nature of the other invariant amino acids that stabilize the polarized form of the sulfoxide function and the transition state, which are Tyr-82 and Tyr-134 for MsrA and Thr-26, His-100 and Asn-119 for MsrB (*via* a water molecule, see Fig. 3).

From an evolutionary point of view, it is also interesting to compare MsrA and MsrB to other sulfoxide reductases in terms of mechanism and catalysis. Indeed, a molybdenum oxotransferase named dimethylsulfoxide reductase (DMSOR) exists, which catalyzes the reduction of DMSO. Structural and spectroscopic studies have suggested that the oxygen atom of the substrate binds directly to the molybdenum of reduced (Mo<sup>IV</sup>) enzyme leading to a weakening of the S–O bond essential for the oxygen atom transfer to the molybdenum [35–38]. Altogether, these results bring to light two ways of reduction of sulfoxides held during the evolution. The first one is based on thiol reactivity coupled with the sulfenic acid chemistry and is used by Msrs. The second one is used by molybdenum-containing enzymes like DMSOR and is based on the redox properties of molybdenum. Anyway, both mechanisms of reduction have in common the activation of the sulfoxide function either *via* the protonation of the oxygen, or *via* its coordination to a molybdenum atom. In both cases, the sulfoxide function of the bound substrate is strongly polarized, facilitating the transfer of the oxygen atom and the reduction of the sulfoxide function.

However, further investigations on Msrs remain to be done to explain in particular how the sulfenic acid intermediate is formed from a sulfuranone transition state. The the-

oretical study of the DMSO reduction by thiols and the geometry of Msr active sites support a sulfuranone intermediate of trigonal bipyramidal geometry, with the sulfur of the thiol and the OH group in apical position and the two methyl groups and the lone pair in equatorial position [31]. However, such a geometry is not compatible with a direct shift of the OH group to the sulfur atom of the thiol. In this context, it is important to note that preliminary data suggest that the oxygen of the sulfenic acid intermediate comes from the sulfoxide function (Antoine et al. unpublished results). Another question concerns the reductase mechanism and catalysis of seleno-Msrs. Indeed, seleno-protein forms of MsrA and MsrB have been recently characterized [39–41]. All these seleno-Msrs are at least as efficient catalyst (as measured by the  $k_{cat}/K_M$  ratio) under steady-state conditions as the Cys-containing Msrs, but nothing is known concerning the catalytic efficiency of their reductase step. For instance, it is not known if the reductase step is also dependent of an acid/base catalyst? Taking into account the fact that a selenoCys has a low pK<sub>a</sub> value and is chemically more reactive than a Cys, one can hypothesize that substituting selenoCys for Cys will favor the rate of the reduction of the sulfoxide function, in particular of the nucleophilic attack on the sulfoxide function.

### Substrate specificity

Despite the distinct three-dimensional structures of MsrA and MsrB, both active sites can be represented as an open basin easily accessible to the sulfoxide substrate.

They display a mirror-like relationship essential to ensure the observed stereoselectivity of these enzymes (Fig. 3) [10,17]. Comparison of the catalytic constants determined under steady-state and pre-steady-state conditions with free MetSO and AcMetSONHMe, which is a good mimic of a MetSO included into a polypeptidic chain, showed that AcMetSONHMe is a more efficient substrate than free MetSO [12,19–21].

The three-dimensional structure of the *N. meningitidis* MsrA in complex with AcMetSONHMe has been recently obtained by X-ray crystallography [32]. This structure and that of *N. gonorrhoeae* MsrB in complex with a cacodylate molecule represent good models of the Michaelis complex [17]. Moreover, the role of invariant amino acids of the MsrA and MsrB domains of the PilB protein of *N. meningitidis* involved in the substrate recognition was recently investigated by comparing the kinetic properties of the wild-type Msrs to those of several mutated Msrs using AcMetSONHMe as a substrate and by characterizing the kinetic parameters of the reductase step [34,42]. Altogether, the kinetic and structural data show a similar binding mode of substrate for both Msrs with the presence of two sub-sites (Fig. 3). These sub-sites are composed of: (1) a hydrophobic pocket that accommodates *via* van der Waals interactions the  $\epsilon$ -methyl and the  $\gamma$ -methylene groups of the substrate, and (2) a hydrophilic pocket that stabilizes the protonated form of the oxygen atom of the S–O bond *via* hydrogen bonds. Whereas the hydrophilic pocket has no role in substrate recognition (but is essential in catalysis as described above), the hydrophobic pocket has been shown to be essential for substrate binding and catalytic efficiency of the reductase step by optimizing the position of the substrate in the active site relative to that of the catalytic amino acids. The distance and orientation between the  $\epsilon$ -methyl and the  $\beta$ -methylene groups and the indole ring of Trp are compatible with van der Waals stabilizing interactions for both Msrs. Moreover, the distance between the sulfur of the sulfoxide, which is for both Msrs largely positively charged in the Michaelis complex, and the indole ring is compatible with a cation/ $\pi$  interaction.

Once again, MsrA and MsrB present some differences. First, although the hydrophobic pocket of both Msrs is formed by the side chain of a Trp residue, they differ by the presence of the side chain of Cys-117 in MsrB, that is proposed to be a component of the pocket [17], while it is the side chain of a Phe-52 in MsrA. The position of the side chain of Trp-53 in MsrA is stabilized by: (i) a hydrogen bond between the NH group of the Trp-53 indole ring and the N $\delta$  of His-186 (distance of 2.9 Å), and ii) a  $\pi$ – $\pi$  stacking interaction of the Trp-53 indole ring with the phenyl ring of Tyr-189, the two aromatic rings being parallel to each other at a distance of 3.4 Å. Second, MsrA contains an additional binding sub-site absent in MsrB (Fig. 3). This sub-site contributes to the binding of the main chain nitrogen atom of the substrate, but to a lesser extent compared to the contribution of the hydrophobic pocket.

However, nothing from the inspection of the active sites explains the observed preference of Msrs for a MetSO engaged in amide bonds. For instance, although the side chains of invariant residues Asp-129 and Tyr-197 in MsrA are described to participate in the substrate binding [15], they are not discriminating in terms of binding between a MetSO either engaged in amide bonds or with amino and carboxyl groups free [42]. A possibility is that the selectivity of both Msrs for protein-bound MetSO results from a destabilizing effect due to repulsive interactions with the charges on the amino and/or carboxyl groups present in MetSO.

Recently, a list of potential protein substrates of Msrs has been reported and discussed in relationship to their physiological relevance [43]. Clearly, inspection of the three-dimensional structures of these proteins, when they are available, shows that a part of the Met residues oxidized into MetSO are not accessible to the active site of both classes of Msrs. Therefore, only oxidized proteins with MetSO located on their surface should be a substrate of Msrs unless oxidation of Met residues positioned within the three-dimensional structure provokes an unfolding of the protein, as recently shown for calmodulin [44].

Another point concerns the absence of a significant inhibitory effect of the reaction product up to 400 mM of AcMetNHMe (Antoine M. et al., unpublished results). Indeed, Msrs display low affinity for AcMetNHMe although the  $\epsilon$ -methyl and the  $\gamma$ -methylene groups are present. The most marked difference between substrate and product, except for the absence of the oxygen atom in the product, is the charge born by the sulfur atom. Indeed, the sulfur of the sulfoxide function bears a positive charge, or at least a partial charge, whereas the sulfur of AcMetNHMe is rather negatively charged [45,46]. Thus, a repulsive electrostatic interaction is expected to occur between the sulfur of the catalytic Cys, which has to be negatively charged during the reductase reaction, and the sulfur atom of AcMetNHMe. The consequence is either a higher rate of dissociation of the product and/or a lower rate of association of the product compared to AcMetSONHMe, explaining the low affinity of Msrs for AcMetNHMe.

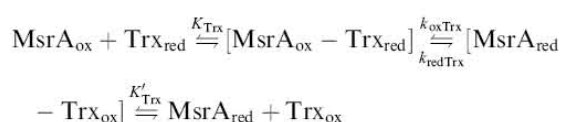
Recently, an enzyme strictly specific for the reduction of the free form of Met-*R*-SO has been characterized in *E. coli* and named fRMsr [47]. In fact, the crystal structure was determined three years ago without knowing its biochemical function [48]. Inspection of the X-ray structure suggests that: (1) fRMsr uses Cys residues for catalysis and (2) the active site is enclosed in a small cavity. This latter feature is most likely a key determinant of substrate specificity. Moreover, *E. coli* fRMsr is the first GAF<sup>2</sup> domain family

<sup>2</sup> The GAF domain family represents a large group of sensor domains typically found in tandem upstream of a variety of output domains. The GAF acronym comes from the names of the first three different classes of proteins identified to contain this structural domain: cGMP-specific and -regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase, Adenylyl cyclase, and *E. coli* transcription factor FhlA.

member to show enzymatic activity. Although speculative, the binding and reduction of free Met-*R*-SO by the fRMsr GAF domain may function as a key element in cell signaling in response to oxidative stress and nutrients. Additional structural and enzymatic studies are necessary to evaluate the binding mode of substrate and to determine the role of the active site residues during catalysis. It is clear, however, that part of the structural origins for the selectivity of fRMsr for free Met-*R*-SO against protein-bound MetSO, is due to the nature of the active site.

### Regeneration of the reductase activity of Msrs

Kinetic studies on the catalytic mechanism of the MsrA and MsrB from *N. meningitidis* have shown that the rate of the sulfenic acid intermediate formation is fast ( $790 \text{ s}^{-1}$  and  $85 \text{ s}^{-1}$  for MsrA and MsrB, respectively) and is rate-determining in the process leading to formation of the Msr disulfide bond. Furthermore, the overall rate-limiting step is associated with the Trx-recycling process, which behaves as an apparent irreversible process [20,21]. Finally, the rates of formation of oxidized Trx from oxidized Msr and reduced Trx, determined under single turn-over conditions, were  $50 \text{ s}^{-1}$  and  $5 \text{ s}^{-1}$  for MsrA and MsrB, respectively. These values are 15- and 5-fold higher than  $k_{\text{cat}}$  values determined under steady-state conditions for MsrA ( $3.4 \text{ s}^{-1}$ ) and MsrB ( $1.1 \text{ s}^{-1}$ ), respectively. These data support a rate-limiting step that takes place after the two-electron chemical exchange and is associated with the release of oxidized Trx. Altogether, these results suggest a similar general scheme for the Trx-recycling process of disulfide oxidized MsrA and MsrB involving first the formation of a productive oxidized Msr/reduced Trx complex, followed by the electron-transfer chemical step leading to the accumulation of the reduced Msr/oxidized Trx complex whose dissociation is rate-limiting.



Therefore, it is probable that productive interactions and thereby specific structural recognitions exist between oxidized Msrs and reduced Trx, which are likely a prerequisite for the oxido-reduction process to be efficient. This can probably be extended to all cytoplasmic Msrs.

The PilB protein of the *Neisseria* genus comprises three domains. Two forms have been recently reported to be produced *in vivo* [49]. One form, containing the three domains is secreted from the bacterial cytoplasm to the outer membrane. The second form, which is cytoplasmic, only contains the central and the C-terminal domains. The secreted form was shown to be involved in survival under oxidative conditions. While the central and the C-terminal domains display MsrA and MsrB activities, respectively, the N-terminal domain exhibits a disulfide reductase activity that is able to recycle the Msr domains [50]. In particu-

lar, the *N. meningitidis* MsrB activity is shown to be recycled with a catalytic efficiency similar to that observed with Trx1 from *E. coli*. Recently, the crystal structure of the N-terminal domain has been determined and has revealed additional features with respect to the canonical Trx-fold [51]. The N-terminal domain fold is rather similar to the DsbE subclass family involved in cytochrome *c* maturation process. However, a major difference is the presence of a unique  ${}^{99}\text{FLHE}^{105}$  loop absent in all Trx/DsbE proteins of known structure, which is stabilized within the structure by hydrogen bonds and covers one edge of the active site. This structural feature of the N-terminal domain of PilB could be important in defining its Trx-recycling selectivity compared to Trx1. An alternative role of the  ${}^{99}\text{FLHE}^{102}$  loop would be to promote selective interactions in the *Neisseria* periplasm with the recycling partner of the oxidized form of PilB that is likely the N-terminal domain of DsbD [52]. Moreover, the fact that the N-terminal domain displays a DsbE-like fold raises the question of its possible involvement in the cytochrome *c* maturation pathway.

In the X-ray structures solved so far, the active site of Msrs is always occupied by a molecule that is covalently or non-covalently bound to the catalytic Cys. In all these structures, the distance and orientation of the catalytic and recycling Cys are variable. For instance, while the recycling Cys is in position to form a disulfide bond in the MsrB from *N. gonorrhoeae*, it is not the case in the MsrA from *E. coli* or *Bos taurus* and probably not in the MsrB from *Xanthomonas campestris* [13,14,17,22]. These differences rely on the position of the recycling Cys, which has allowed the identification of different sub-classes of MsrA and MsrB [12], and argue for significant conformational changes of Msrs upon intra-disulfide bond formation. This was recently confirmed by the determination of the three-dimensional structure of oxidized disulfide form of *E. coli* and *N. meningitidis* MsrA [32,53], which show a significant conformational change that would be a prerequisite for the formation of the intra-disulfide bond and for the Trx-recycling process efficiency. In these structures, the active site is more exposed to the solvent than in reduced form. A hydrophobic patch is also present on the molecular surface. This solvent-exposed hydrophobic surface of the oxidized form likely plays a role in Trx interaction during the reduction step. Indeed, several studies have shown that the Trx active site exhibits large solvent-exposed hydrophobic surface [54,55], such a surface playing a key role during the interaction with other partners.

Moreover, the Trx-recycling process is specific of disulfide oxidized Msrs. Indeed, the sulfenic acid intermediate formed on the catalytic Cys can not be reduced by Trx [12]. Sequence comparisons of putative Msrs show that the catalytic Cys is almost conserved whereas about 25% of the Msrs have no putative recycling Cys. These monocysteine Msrs have been shown to display reductase activity ([40] and Neiers F. et al., unpublished results). These results argue for the generality of the sulfenic acid



mechanism, but, at the same time, raise the question of how the activity of these Msrs is recycled *in vivo*. Indeed, different reductants (i.e. glutaredoxin, thionein or seleno-compounds) were shown to be able to regenerate monocysteineic MsrB *in vitro* [56–59], but no evidence has been shown for their *in vivo* implication yet.

### Concluding remarks and open questions

During the past few years, the enzymology of Msrs has provided important insights into the chemical mechanism of sulfoxide reduction by thiols. This reaction implies the formation of a sulfenic acid intermediate by a substrate-assisted acidic catalysis mechanism. Indeed, for both classes of Msrs the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized, and participates *via* the—partial—positive charge borne by the sulfur atom of the sulfoxide to the stabilization of the catalytic Cys. However, several questions remain to be addressed. First, as already pointed out, the proton on the sulfoxide function likely comes from the catalytic Cys *via* Glu-94 and His-103 in MsrA and MsrB, respectively. However, the distances between the catalytic Cys and the acid/base catalysts, which are deduced from the inspection of the crystal structures are not compatible with a direct hydrogen transfer (Fig. 3). Second, the way by which the sulfenic acid intermediate is formed from a sulfurane-type transition state of trigonal bipyramidal geometry remains unknown. Third, the catalysis involved in the disulfide bond formation, which implies the protonation of the sulfenic acid and the activation of the recycling Cys, remains to be determined. Finally, nothing is known about the *in vivo* regeneration mechanism of the reductase activity of monocysteineic MsrB.

The secreted form of the PilB protein was shown to be bound to the outer membrane of *N. gonorrhoeae* and it was proposed to be involved in survival of the pathogen to the host's oxidative burst. Therefore, the question arises of whether and how the N-terminal domain in PilB is operative in recycling the MsrA and MsrB activities *in vivo*. For instance, is the recycling process of the Msr domains by the N-terminal domain intra- or intermolecular? Another point that has to be addressed concerns the nature of the proteins, which are repaired in the periplasm by PilB and the relationship with the pathogenic character of *Neisseria*.

### Acknowledgments

We thank the members of the Molecular Enzymology group (UMR 7567 CNRS-UHP), of the Biostructures group (UMR 7568 CNRS-INPL), of the Biocrystallography group (UMR 7036 CNRS-UHP) and of the CBT group (UMR 7565 CNRS-UHP) for fruitful discussions. Our research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Nancy Université, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 5436) and the

French Ministry of Research (ACI BCMS047, ACI IMP-Bio SIRE). Adeline Gand gratefully thanks the French Ministry of Research for financial support.

### References

- [1] C. Schoneich, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 111–119.
- [2] N. Brot, H. Weissbach, *Biopolymers* 55 (2000) 288–296.
- [3] J. Moskovitz, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 213–219.
- [4] E.R. Stadtman, H. Van Remmen, A. Richardson, N.B. Wehr, R.L. Levine, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 135–140.
- [5] H. Weissbach, L. Resnick, N. Brot, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 203–212.
- [6] B. Friguet, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2910–2916.
- [7] S.I. Ejiri, H. Weissbach, N. Brot, *J. Bacteriol.* 139 (1979) 161–164.
- [8] R. Grimaud, B. Ezraty, J.K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P.J. Derrick, F. Barras, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48915–48920.
- [9] B. Ezraty, L. Aussel, F. Barras, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 221–229.
- [10] B. Kauffmann, A. Aubry, F. Favier, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 249–260.
- [11] J.W. Lee, N.V. Gordiyenko, M. Marchetti, N. Tserentsoodol, D. Sagher, S. Alam, H. Weissbach, M. Kantorow, I.R. Rodriguez, *Exp. Eye Res.* 82 (2006) 816–827.
- [12] S. Boschi-Muller, A. Olry, M. Antoine, G. Branlant, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 231–238.
- [13] F. Tete-Favier, D. Cobessi, S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, A. Aubry, *Structure Fold. Des.* 8 (2000) 1167–1178.
- [14] W.T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, B.W. Matthews, *Biochemistry* 39 (2000) 13307–13312.
- [15] A.B. Taylor, D.M. Benglis Jr., S. Dhandayuthapani, P.J. Hart, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 4119–4126.
- [16] N. Rouhier, B. Kauffmann, F. Tete-Favier, P. Palladino, P. Gans, G. Branlant, J.P. Jacquot, S. Boschi-Muller, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3367–3378.
- [17] W.T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, B.W. Matthews, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 348–352.
- [18] S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselaar, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35908–35913.
- [19] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaar, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12016–12022.
- [20] M. Antoine, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45352–45357.
- [21] A. Olry, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *Biochemistry* 43 (2004) 11616–11622.
- [22] F. Neiers, A. Kriznik, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42462–42468.
- [23] J. Cioslowski, S.T. Mixon, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 3209–3216.
- [24] J.A. Dobado, H. Martinez-Garcia, J.M. Molina, M.R. Sundberg, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 3156–3164.
- [25] A.E. Reed, P.V. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 1434–1445.
- [26] J.A. Davies, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 24 (1981) 115.
- [27] H. Dreizler, G. Dendle, *Z. Naturforsch.* 19a (1964) 512–514.
- [28] M. Calligaris, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 351–375.
- [29] T.J. Wallace, J.J. Mahon, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 4099–4103.
- [30] T.J. Wallace, J.J. Mahon, *J. Org. Chem.* 30 (1965) 1502–1506.
- [31] B. Balta, G. Monard, M.F. Ruiz-Lopez, M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 7628–7636.
- [32] F.M. Ranaivoson, M. Antoine, B. Kauffmann, S. Boschi-Muller, A. Aubry, G. Branlant, F. Favier, *J. Mol. Biol.*, in press. Available online 16 January 2008.
- [33] M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 39062–39070.
- [34] F. Neiers, S. Sonkaria, A. Olry, S. Boschi-Muller, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* (2007) 32397–32405.
- [35] B.E. Schultz, R. Hille, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 827–828.

mechanism, but, at the same time, raise the question of how the activity of these Msrs is recycled *in vivo*. Indeed, different reductants (i.e. glutaredoxin, thionein or seleno-compounds) were shown to be able to regenerate monocy- steinic MsrB *in vitro* [56–59], but no evidence has been shown for their *in vivo* implication yet.

### Concluding remarks and open questions

During the past few years, the enzymology of Msrs has provided important insights into the chemical mechanism of sulfoxide reduction by thiols. This reaction implies the formation of a sulfenic acid intermediate by a substrate- assisted acidic catalysis mechanism. Indeed, for both clas- ses of Msrs the substrate binds to the active site with its sulfoxide function largely polarized, and participates *via* the—partial—positive charge borne by the sulfur atom of the sulfoxide to the stabilization of the catalytic Cys. How- ever, several questions remain to be addressed. First, as already pointed out, the proton on the sulfoxide function likely comes from the catalytic Cys *via* Glu-94 and His-

French Ministry of Research (ACI BCMS047, ACI IMP- Bio SIRE). Adeline Gand gratefully thanks the French Ministry of Research for financial support.

### References

- [1] C. Schoneich, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 111–119.
- [2] N. Brot, H. Weissbach, *Biopolymers* 55 (2000) 288–296.
- [3] J. Moskovitz, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 213–219.
- [4] E.R. Stadtman, H. Van Remmen, A. Richardson, N.B. Wehr, R.L. Levine, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 135–140.
- [5] H. Weissbach, L. Resnick, N. Brot, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 203–212.
- [6] B. Friguet, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2910–2916.
- [7] S.I. Ejiri, H. Weissbach, N. Brot, *J. Bacteriol.* 139 (1979) 161–164.
- [8] R. Grimaud, B. Ezraty, J.K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P.J. Derrick, F. Barras, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48915–48920.
- [9] B. Ezraty, L. Aussel, F. Barras, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 221–229.
- [10] B. Kauffmann, A. Aubry, F. Favier, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2005) 249–260.
- [11] J.W. Lee, N.V. Gordiyenko, M. Marchetti, N. Tserentsoodol, D. Sagher, S. Alam, H. Weissbach, M. Kantorow, I.R. Rodriguez, *Exp. Eye Res.* 82 (2006) 816–827.

# Matériels et Méthodes



## **I Matériel biologique et milieux de culture**

### **I.1 Souches bactériennes**

- *E. coli* DH5 $\alpha$  : *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique.

- *E. coli* BE002 : MG1655 *msrA* :: *spec* $\Omega$ , *msrB* ::  $\alpha$ 3*kan*. Cette souche est utilisée pour la production du type sauvage et des variants des MsrA de *N. meningitidis* et d'*E. coli*.

- *E. coli* BL21 (DE3) : F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*, *dcm*. Cette souche qui contient l'ORF codant l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lac* est utilisée pour la production de l'apocytochrome *c'* et de la protéine L7/L12.

- *E. coli* EC29 : MC1061 (*hsdR araD139*  $\Delta$ (*araABC-leu*) 7679 *galU galK*  $\Delta$ (*lac*)  $\Phi$ X74 *rpsL thi*)  $\Delta$ *ccmG*. Cette souche nous a été fournie par le Dr L. Thöny-Meyer (Institut für mikrobiologie, Zürich, Suisse) et est utilisée pour réaliser les tests de complémentation fonctionnelle.

- *E. coli* S17-1: RP4-2-Tc::Mu *aph*::Tn7 *recA* [Sm<sup>R</sup>]. Cette souche est utilisée pour les expériences de conjugaison de la souche *B. pertussis* BC39.

- *B. pertussis* BC39 : dérivée de la souche TohamaiIII, souche avirulente isolée d'un patient portant les résistances à la streptomycine et à l'acide nalidixique. Cette souche nous a été fournie par le Pr. Robert G. Kranz (Biology Department, St Louis, United states).

- *B. pertussis* RK102 : BC39  $\Delta$ *ccsX*. Cette souche nous a été fournie par le Pr. Robert G. Kranz (Biology Department, St Louis, United States). Cette souche est utilisée pour les tests de complémentation fonctionnelle.

Toutes ces souches sont conservées en glycérol 15% à -80°C.

## **I.2 Vecteurs plasmidiques**

- pSKPILBMsra : Phagemide recombinant pBluescript II SK (+) portant la séquence codante de la MsrA de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lac* (Olry *et al.*, 2002). Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline et est utilisé pour la production de MsrA sauvage ainsi que des différents variants de MsrA.
  
- pETDsbE1t : Phagemide recombinant pET-20b portant la séquence codante de la DsbE1t de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine et est utilisé pour la production de la DsbE1t.
  
- pETDsbE2t : Phagemide recombinant pET-20b portant la séquence codante de la DsbE2t de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine et est utilisé pour la production de la DsbE2t.
  
- pETapoc' : Phagemide recombinant pET-20b portant la séquence codante du cytochrome *c'* de *N. meningitidis*, tronqué de sa séquence d'export au périplasma, sous le contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine et est utilisé pour la production de l'apocytochrome *c'* dans le cytoplasme.
  
- pET-28b L7/L12 : Phagemide recombinant pET-28b portant la séquence codante de la protéine L7/L12 d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur *lac* permettant l'expression des protéines avec un Tag His du côté N-terminal. Ce vecteur porte un gène de résistance à la kanamycine et est utilisé pour la production de L7/L12.
  
- pEC210 CcmG : Vecteur pACYC184 dans lequel a été cloné la séquence codant la protéine CcmG d'*E. coli* (Fabianek *et al.*, 1998). Ce vecteur est utilisé pour réaliser la complémentation de souche d'*E. coli* délétées du gène *ccmG*.
  
- pRJ3290 : Vecteur pISC2 dans lequel a été cloné le gène *cycA*-His6 de *B. japonicum* (codant le cytochrome *c550*) (Ahuja et Thöny-Meyer, 2003). Ce vecteur est résistant à l'ampicilline et inductible à l'arabinose et est utilisé pour réaliser la complémentation de souche d'*E. coli* délétées du gène *ccmG*.

- pFUS2 : dérive du pQE30 (Qiagen, France). C'est un plasmide suicide utilisé pour l'inactivation de gènes par recombinaison homologue et la génération de fusion transcriptionnelle entre les gènes interrompus et le gène *lacZ* (Antoine *et al.*, 2000). Ce vecteur porte un gène de résistance à la gentamycine.

### **I.3 Milieux de culture bactérienne**

#### **I.3.1 Milieu riche LB**

Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH et le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/L de milieu de culture avant stérilisation. Les milieux sont autoclavés 20 min à 120 °C. Afin de sélectionner les clones recombinants, l'antibiotique approprié est ajouté après stérilisation. Ce milieu est utilisé pour la réalisation des minipréparations d'ADN plasmidique ainsi que pour la production des différentes protéines.

#### **I.3.2 Milieu riche SOC**

Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L), KCl (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), glucose (20 mM). Ce milieu est utilisé pour la transformation des bactéries compétentes.

#### **I.3.3 Milieu Bordet-Gengou**

Composition : Peptone (10 g/L), extrait de viande (10 g/L), sang de mouton défibrillé (100 mL/L), acide nicotinique (1 mg/L), amidon (10 g/L), cefalexine (40 mg/L), charbon (4 g/L), NaCl (5 g/L), Agar (12 g/L). Le pH est ajusté à 7,4. Ce milieu est utilisé pour cultiver les souches de *B. pertussis*.

#### **I.3.4 Milieu minimum pour culture en anaérobie et en présence de nitrites**

Composition : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10,5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g/L), nitrites (2 g/L), citrate de sodium (0,5 g/L), glycérol (4 g/L), milieu LB (100 mL/L), fumarate (6,4 g/L),

## **Matériels et Méthodes**

solution contenant des traces de métaux (FeCl<sub>3</sub> (4 g/L), CaCl<sub>2</sub> (1 g/L), MgCl<sub>2</sub> (82 g/L), MnCl<sub>2</sub> (10 g/L), 2 mL d'HCl concentré après avoir dissout tous les sels dans 1L d'H<sub>2</sub>O (2 mL/L), molybdate (0,01 mmol/L)).

Ce milieu est utilisé pour les tests de maturation des cytochromes *c* chez *E. coli*.

## **II Techniques de génie génétique**

### **II.1 Préparation de l'ADN plasmidique**

#### **II.1.1 La minipréparation**

La minipréparation d'ADN est utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN dans un but analytique, à partir de 5 ml de culture. Le protocole passe par la lyse alcaline des cellules grâce à une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1%. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 90%. Le culot ainsi obtenu est ensuite lavé à l'éthanol à 70% puis séché, repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, et finalement traité 1H à 37°C par la ribonucléase A (1 µg/ml).

#### **II.1.2 Préparation et transformation des bactéries compétentes**

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5α, BE002, BL21(DE3), EC29 et S17-1. Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 35 et 37°C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 30 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10<sup>ème</sup> du volume initial de solution TB, en présence de diméthyle sulfoxyde (7% final) et incubée 2H dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80°C (Inoue *et al.*, 1990).

La méthode classique de transformation des bactéries compétentes est utilisée (Sambrook *et al.*, 1989). La transformation est réalisée en mélangeant 1 ng de plasmide et 50



µl de bactéries compétentes. Après incubation dans la glace pendant 30 min, le mélange est soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis les cellules sont régénérées 1H à 37°C en milieu LB avant d'être étalées sur boîte LB avec l'antibiotique de résistance approprié au plasmide utilisé et incubées une nuit à 37°C.

## **II.2 Mutagenèse du matériel plasmidique**

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du Kit «QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit» commercialisé par Stratagene. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse.

Elle nécessite aussi un plasmide double brin superenroulé et deux oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, vont servir d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase, conduisant à un plasmide muté aux extrémités non reliées.

Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn I* (séquence cible 5'-Gm6ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, afin de digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. En effet, l'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *DpnI*. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et coupé, est utilisée pour transformer des bactéries DH5α compétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et l'amplifier. Après transformation de 50 µL de cellules DH5α compétentes par 1 à 5 µL de mélange de PCR, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide sélectif.

## **II.3 Clonage des ORF**

La technique de PCR permet de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADN génomique compris entre deux oligodésoxyribonucléotides, dont les séquences sont complémentaires aux bordures du fragment d'ADN à amplifier et permet également de créer les sites de restriction *NdeI* et *SacI*. L'ADN polymérase utilisée pour la réaction est la *Pfu*. La présence et la taille de l'ADN amplifié sont vérifiées par dépôt sur gel d'agarose 1%. Cet ADN est ensuite extrait du gel grâce au kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). Cette extraction

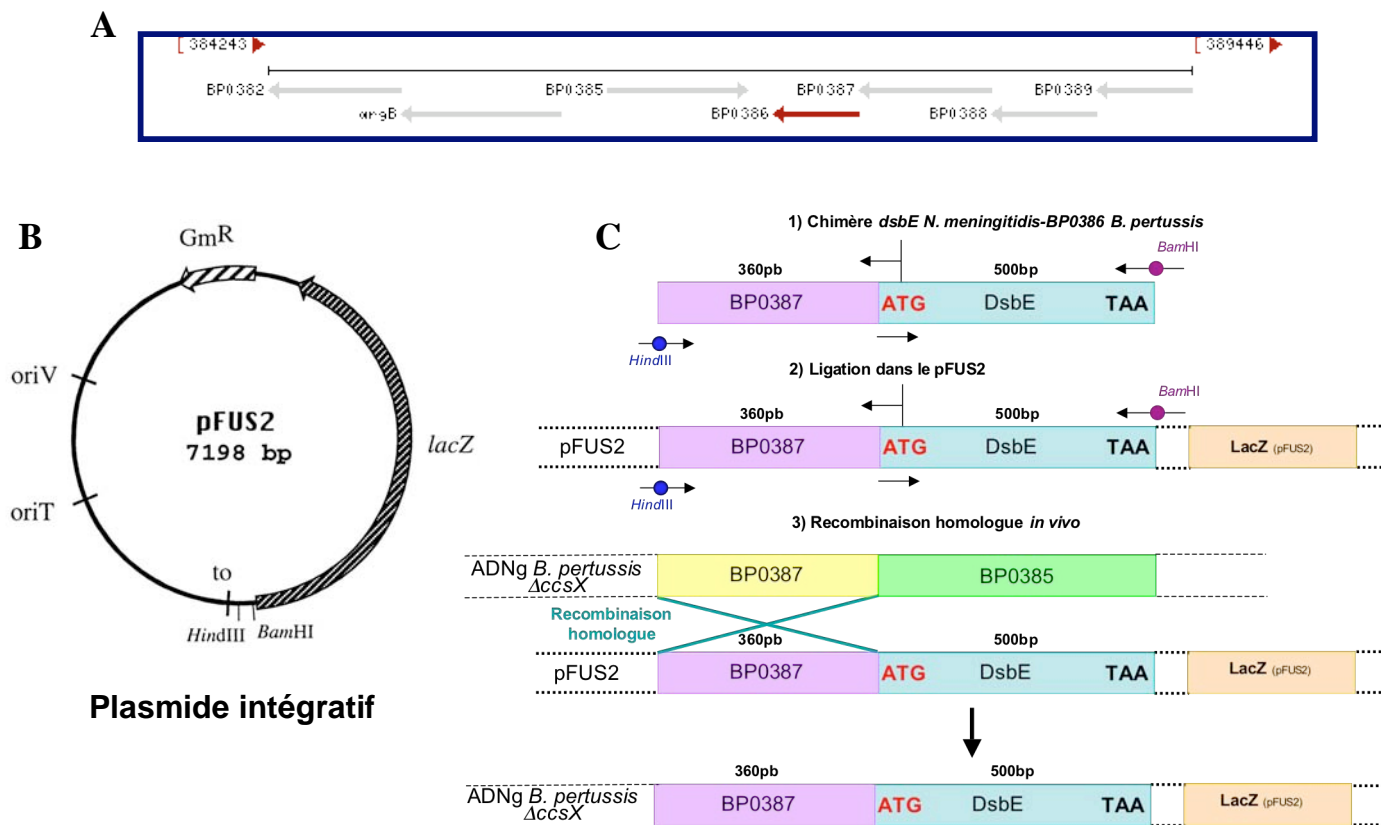
## ***Matériels et Méthodes***

est basée sur l'utilisation de colonnes échangeuses d'anions, l'ADN étant chargé négativement. Les vecteurs et les inserts sont ensuite digérés pendant 1h30 à 37°C par les enzymes de restriction *NdeI* et *SacI* à raison de 3 unités par µg d'ADN. La formation des liaisons phosphodiester entre les extrémités de l'insert et du vecteur est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4. La ligation se fait en présence d'un excès d'insert de 3 fois par rapport au vecteur linéarisé. Les mélanges de ligation sont placés dans un bain à 16°C pendant au moins 4H.

La présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonies en utilisant cette fois-ci la Dynazyme.

### **II.4 Construction d'une chimère *dsbE N. meningitidis-BP0387 B. pertussis***

Chez *B. pertussis*, le gène *BP0386* codant la protéine CcsX semble se trouver en opéron avec les gènes *BP0389*, *BP0388* et *BP0387*, nous avons donc réalisé une chimère *dsbE N. meningitidis-BP0387*. Cette chimère est ensuite clonée dans le plasmide suicide intégratif pFUS2. Ce plasmide est utilisé pour transformer des cellules S17-1 d'*E. coli* permettant la transformation du pFUS2 dans la souche RK102 par une technique de conjugaison, le plasmide va s'intégrer dans sa totalité à l'intérieur du génome de *B. pertussis* par recombinaison homologue (Figure 68).



**Figure 68** : Schéma de la stratégie de complémentation de *B. pertussis*.

(A) Représentation schématique de la région du génome de *B. pertussis* contenant le gène *ccsX*. Le gène *BP086*, représenté en rouge correspond au gène *ccsX*.

(B) Carte du plasmide intégratif pFUS2.

(C) Représentation schématique de la stratégie de complémentation utilisée.

### III Production et purification des différentes protéines

#### III.1 Production des protéines recombinantes

Les MsrA de *N. meningitidis*, sauvage et les différents variants générés, sont produits dans la souche d'*E. coli* BE002 transformée par le plasmide recombinant pSKPILBMsra portant l'ORF de la protéine à produire. Typiquement, quatre litres de LB sontensemencés au 1/50<sup>ème</sup> à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB. Les cultures sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C en milieu LB sous agitation avec comme antibiotique de résistance l'ampicilline (200 mg/l), la spectinomycine (25 mg/l) et la kanamycine (50 mg/l).

Les cultures des cellules d'*E. coli* BL21(DE3), transformées avec les vecteurs plasmidiques pETDsbE1t, pETDsbE2t, pETapoc' et pET28bL7/L12, permettant respectivement la surproduction des DsbE1t, DsbE2t et du cytochrome *c'* de *N. meningitidis*

## **Matériels et Méthodes**

et de la protéine L7/L12 d'*E. coli* sont ensemencées au 1/50<sup>ème</sup> à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB et incubées à 37°C. L'antibiotique de résistance est la kanamicyne (200 mg/ml). A une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,6 et 0,8, l'induction de la synthèse de l'ARN polymérase T7 est initiée par ajout de 1 mM d'IPTG et conduit à l'induction de la synthèse en grande quantité d'ARN messager correspondant à la protéine recombinante. La culture est arrêtée de 6 à 18H après induction et après 3H pour le cytochrome *c'* de *N. meningitidis*.

Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 g, sont lavées dans du tampon A (Saccharose 25%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) puis centrifugées et les culots cellulaires sont stockés à -20°C.

### **III.2 Désintégration des cellules**

Le culot cellulaire issu d'un litre de culture est repris dans 20 ml de tampon de purification puis les cellules sont désintégrées à une température de 4°C à l'aide d'un sonicateur ou d'un désintegrateur de cellules (Constant Cell Disruption Systems, Constantsystems). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 12000 g durant 45 min.

### **III.3 Purification**

#### **III.3.1 Purification de la MsrA et de la DsbE1t**

##### **III.3.1.1 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium**

Le surnageant de sonication est amené respectivement à 50% et 70% de saturation en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour la MsrA et la DsbE1t, et précipité 2H sous légère agitation à 4°C. A cette concentration en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ces deux protéines sont précipitées, elles sont récupérées dans le culot après centrifugation pendant 45 min à 12000 g.

##### **III.3.1.2 Filtration sur gel**

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2mM, pH 8,0) puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA54 (acrylamide 5%, agarose 4%, BIOSEPPA) dont le domaine de fractionnement se situe entre 5 et 70 kDa.

L'élution se fait grâce au tampon TE et est suivie par la mesure de la  $DO_{280nm}$ . L'analyse des fractions est effectuée par lecture de la  $DO_{280/260nm}$  et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE, 12,5%). Les fractions contenant la protéine sont ensuite rassemblées.

Cette étape permet d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes présentes dans le culot de précipitation et une grande quantité d'acides nucléiques.

### III.3.1.3 Chromatographie d'échange d'anions

La solution protéique issue de la filtration sur gel est filtrée puis injectée sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose (agarose 6% sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium, Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences). L'élution se fait par un gradient linéaire croissant de KCl de 0 à 200 mM pour les MsrA et de 0 à 1 M pour la DsbE1t sous un débit de 5 ml/min. Les MsrA de *N. meningitidis* sont éluées à environ 50 mM de KCl et la DsbE1t n'est pas retenue sur la colonne.

Cette étape permet d'éliminer des contaminants protéiques et surtout beaucoup d'acides nucléiques.

### III.3.1.4 Concentration et conservation des protéines

Les solutions enzymatiques pures sont finalement concentrées par ultra-filtration sous pression d'azote à l'aide d'une membrane Amicon YM10 jusqu'à une concentration de l'ordre de 20-25 DO/mL. Les protéines sont ensuite précipitées en présence de  $(NH_4)_2SO_4$  (50% de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservées à  $-20^\circ C$ . La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire théoriques déterminés par la méthode de Gill et Von Hippel (Gill et Von Hippel, 1989): MsrA de *N. meningitidis*  $\epsilon = 26200 \text{ cm}^{-1} \cdot M^{-1}$ , DsbE1t *N. meningitidis*  $\epsilon = 14770 \text{ cm}^{-1} \cdot M^{-1}$ , DsbE2t *N. meningitidis*  $\epsilon = 29700 \text{ cm}^{-1} \cdot M^{-1}$ , apocytochrome *c'* *N. meningitidis*  $\epsilon = 8500 \text{ cm}^{-1} \cdot M^{-1}$ . La protéine L7/L12 ne possédant pas de Trp, sa concentration est déterminée par dosage selon la méthode de Bradford.

### III.3.2 Purification de la DsbE2t

Le protocole utilisé est sensiblement le même que celui utilisé pour la DsbE1t, sauf que le tampon utilisé est un tampon TE, pH 8,5. La précipitation se fait à 65% en sulfate d'ammonium. La gel filtration se fait en tampon TE pH 8,5, 150 mM de KCl afin de réduire les interactions non spécifiques et l'échantillon est dilué deux fois avant injection sur Q-sépharose afin de diminuer la concentration en sels. Tout comme la DsbE1t, la DsbE2t ne se fixe pas sur Q-sépharose, la protéine est donc récupérée, concentrée et conservée à -20°C après précipitation au sulfate d'ammonium à 65%.

### III.3.3 Purification de l'apocytochrome *c'*

Le protocole de purification est sensiblement le même que celui utilisé pour les autres protéines. Dans ce cas, le tampon utilisé est un tampon TE pH 8,5, et la protéine est précipitée au sulfate d'ammonium à 60%. La protéine est ensuite déposée sur colonne gel-filtration toujours dans le même tampon. Les fractions contenant la protéine sont récupérées et injectées sur Q-sépharose. Comme pour les protéines DsbE1t et DsbE2t, l'apocytochrome *c'* ne se fixe pas sur la colonne. Après cette étape, la protéine n'est pas encore pure. Une étape supplémentaire de chromatographie hydrophobe est donc réalisée. Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la protéine sont amenées à une concentration finale de 1 M en sulfate d'ammonium. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl Sepharose (agarose 6% comprenant des groupements phényles, Amersham Biosciences) équilibrée en tampon TE pH 8,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M et couplée au système FPLC. L'enzyme est éluée par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La protéine est récupérée, concentrée et conservée à -20°C après précipitation au sulfate d'ammonium à 60%.

### III.3.4 Purification de la protéine L7/L12

#### III.3.4.1 Chromatographie d'affinité sur complexe Ni<sup>2+</sup> (IMAC)

La protéine est retenue sur la résine grâce à des interactions spécifiques entre les ions Ni<sup>2+</sup> fixés préalablement à la résine et la séquence His-Tag fusionnée du côté N-terminal. Ces interactions sont dues aux propriétés des His dont le noyau imidazole possède un doublet

d'électrons libres (à  $\text{pH} > \text{pKa}$ ), porté par un atome d'azote, pouvant former des complexes avec les ions métalliques divalents comme le  $\text{Cu}^{2+}$  ou le  $\text{Ni}^{2+}$ . Les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont fixés à la résine qui possède des groupements iodoacétamides, chélateurs d'ions.

Le surnageant obtenu après désintégration des cellules est filtré et injecté sur la colonne Ni Sepharose HP (5 mL, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC (Pharmacia), préalablement équilibrée avec le tampon start ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5) en présence de 50 mM d'imidazole. La présence d'imidazole dès le début de la chromatographie a pour but d'éliminer la fixation non spécifique des protéines cellulaires, tout en assurant la fixation de la totalité de L7/L12. La protéine est éluée grâce au tampon d'élution (tampon start, 1 M imidazole), l'imidazole entre en compétition avec les chaînes latérales des His de l'étiquette His de la protéine. L'élution est obtenue grâce à un palier d'imidazole à une concentration de 500 mM, et est suivie par la mesure de la  $\text{DO}_{280\text{nm}}$ .

#### III.3.4.2 Concentration et conservation des protéines

Les fractions contenant L7/L12 pure sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion 10 kDa). La protéine L7/L12 est dialysée contre du tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 afin d'éliminer l'imidazole. La protéine est enfin précipitée à 70% de sulfate d'ammonium et conservée à  $-20^\circ\text{C}$ .

### III.4 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées

#### III.4.1 Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

#### III.4.2 Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon débarrassé de toute trace de sels, 500  $\mu\text{g}$  de protéines sont dessalés sur une colonne de filtration sur gel (HiPrep 26/10 Desalting, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC, ou sur une colonne de

## ***Matériels et Méthodes***

filtration sur gel PD-10 (BioRad). L'élution est réalisée par un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 7,6 fraîchement préparé. La fraction la plus concentrée est récupérée puis lyophilisée.

Les masses moléculaires des protéines recombinantes ont été déterminées au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique de Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer. L'appareil utilisé est un spectromètre VG-Bio Q triple quadripole (Micromass).

## **IV Préparation des substrats sulfoxydes**

La synthèse du substrat doublement protégé Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe est décrite précisément dans la publication Olry *et al.*, 2004.

Le produit brut de synthèse est ensuite purifié au laboratoire. Une étape de chromatographie d'échange de cations sur une colonne SP-Sépharose couplée à un système FPLC (Amersham) a permis de se débarrasser du pyridinium, l'AcMetSONHMe et AcMetNHMe n'étant pas retenus sur la colonne. La colonne est préalablement équilibrée à pH 4,0. Après la sortie des composés non retenus, les contaminants fixés sur la colonne sont élués par un gradient rapide en KCl, pH 4,0, de 0 à 100 %. Le produit AcMetSONHMe a ensuite été isolé par HPLC en phase inverse préparative à l'aide d'une colonne DeltaPak C18 (Waters) couplée à une chaîne HPLC (Waters), comme décrit dans Olry *et al.*, 2004.

## **V Techniques d'étude enzymatique pour la MsrA de *N. meningitidis***

Toutes nos études ont été effectuées avec des préparations enzymatiques réduites préalablement par 50 mM de DTT pendant 30 min qui subissent ensuite deux dialyses contre le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 sous un flux d'azote. Cette procédure permet d'obtenir des enzymes à l'état réduit et sans trace de DTT.

Toutes les expériences faisant intervenir de la MetSO ont été réalisées avec de la *D,L*-Met-*R,S*-SO. Le terme MetSO fait donc référence à ce mélange des 4 diastéréoisomères. La majorité des études enzymatiques ont été réalisées avec le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe, les Msr présentant une meilleure affinité vis-à-vis de ce substrat. L'étude de la réduction de la protéine L7/L12 a nécessité la mise au point d'un protocole d'oxydation des 3 Met de cette protéine. L'oxydation se fait en présence de 50% d'acide acétique et 0,1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 2H à température ambiante. La protéine est ensuite dialysée en tampon Tris 50 mM, EDTA



2 mM, pH 8,0. L'oxydation des 3 Met de la protéine L7/L12 a été vérifiée par spectrométrie de masse en collaboration avec le groupe du Dr. A. Van Dorsselaer à Strasbourg.

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire théoriques déterminés par la méthode de Gill et Von Hippel (Gill et Von Hippel, 1989): MsrA de *N. meningitidis*  $\epsilon = 26200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

### **V.1 Dosage des groupements thiols libres par le 5, 5'-dinitrobis (2-nitro) benzoate (DTNB)**

Le contenu en thiols libres de l'échantillon protéique est déterminé après incubation ou non avec de la MetSO (100 mM, 10 min) et en absence de réducteur, en utilisant le DTNB dans des conditions non dénaturantes (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Le suivi de l'apparition du thionitrobenzoate libéré (TNB<sup>-</sup>) est mesuré à 412 nm. Les mesures sont effectuées à deux concentrations en enzyme (7,35 et 14,7  $\mu\text{M}$  correspondant respectivement à un  $\Delta\text{DO}_{412\text{nm}}/\text{SH}$  libre de 0,1 et 0,2) en présence de 300  $\mu\text{M}$  de DTNB. La quantité de TNB<sup>-</sup> formé est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $13600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  à 412 nm.

### **V.2 Récapitulatif des procédures décrites dans les publications et manuscrits**

Les procédures expérimentales suivantes sont explicitées en détail dans les publications Antoine *et al.*, 2006 et Gand *et al.*, 2007 :

- Détermination des paramètres cinétiques  $K_M$  et  $k_{\text{cat}}$  en présence du système réducteur Trx/Trx réductase/NADPH à l'état stationnaire
- Spectroscopie de fluorescence des formes réduites et oxydées de la MsrA de *N. meningitidis*.
- Mesure de la vitesse de formation du pont disulfure à l'état pré-stationnaire par spectroscopie de fluorescence résolue en temps.
- Cinétique d'apparition de l'Ac-L-Met-NHMe par mélange rapide résolu en temps.
- Vitesse de modification des Cys51 et 198 par le 2PDS en fonction du pH.
- Etude de la vitesse de l'étape réductase en fonction du pH.

## **VI Caractérisation biochimique des DsbE1t et DsbE2t**

Pour ces deux protéines, le même protocole que celui décrit pour les Msr est utilisé pour le dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB), pour les spectres de fluorescence des formes réduites et oxydées des DsbEt ainsi que pour déterminer la vitesse de modification des deux Cys des DsbEt par le 2PDS en fonction du pH.

### **VI.1 Détermination du potentiel rédox des DsbE1t et DsbE2t à l'équilibre avec les formes GSH/GSSG**

Le changement d'intensité de fluorescence (longueur d'excitation 284nm) est mesuré à la longueur d'onde maximale d'émission (320 nm) grâce à un fluorimètre Flx Safas. Les expériences sont réalisées dans un tampon KPi 100 mM, pH 7,0, 2 mM EDTA dégazé et purgé à l'He<sub>2</sub>. Les formes oxydées de la DsbE1t et de la DsbE2t (1 µM) sont incubées à 30 °C en présence de GSSG (0,1 mM) et de concentrations variables en glutathion réduit (GSH) (0-180 mM) durant 20 H avant de réaliser les spectres d'émission de fluorescence. Les concentrations à l'équilibre de GSH et de GSSG sont calculées suivant les équations 1, 2 et 3.

$$[\text{GSH}] = [\text{GSH}]_0 - 2R[\text{DsbEt}]_0 \text{ (Equation 1)}$$

$$[\text{GSSG}] = [\text{GSSG}]_0 + R[\text{DsbEt}]_0 \text{ (Equation 2)}$$

$$R = (F - F_{\text{ox}})/(F_{\text{red}} - F_{\text{ox}}) \text{ (Equation 3)}$$

$[\text{GSH}]_0$  et  $[\text{GSSG}]_0$  représentent respectivement les concentrations initiales en GSH et GSSG, R est la quantité relative de protéine sous forme réduite à l'équilibre,  $[\text{DsbEt}]_0$  est la concentration initiale en DsbEt sous forme oxydée, F représente l'intensité de fluorescence et  $F_{\text{ox}}$  et  $F_{\text{red}}$  les intensités de fluorescence des protéines sous forme totalement oxydée ou totalement réduite. La constante d'équilibre  $K_{\text{eq}}$  est estimée grâce à l'équation 4 par une analyse des résultats par une régression non-linéaire.

$$R = ([\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}])/(K_{\text{eq}} + [\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]) \text{ (Equation 4)}$$

A partir de la constante d'équilibre, et en utilisant le potentiel standard du ( $E'_0$  GSH/GSSG = -0,240 V), le potentiel rédox  $E'_0$  est calculé grâce à l'équation de Nernst (Equation 5).

$$E'_0 = E'_0\text{GSH/GSSG} - (RT/nF)\ln K_{\text{éq}} \text{ (Equation 5)}$$

F représente la constante de Faraday ( $23040,612 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{V}^{-1}$ ), n est le nombre d'électrons transférés (ici  $n = 2$ ) et RT est le produit entre la constante des gaz parfaits ( $1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) et la température absolue.

## **VI.2 Spectres de dichroïsme circulaire**

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés en utilisant un dichrographe CD6 Jobin Yvon, avec une vitesse de mesure de 2 nm/s. Les cuves en quartz utilisées présentent un trajet optique de 1 mm. Les échantillons contiennent 12,5  $\mu\text{M}$  de protéine en tampon Tris 10 mM, pH 8,0. La mesure du spectre dichroïque du tampon est réalisé en début d'expérience et les valeurs obtenues sont ensuite soustraites des données recueillies pour les échantillons. Deux spectres sont effectués pour chaque mesure et sont moyennés pour augmenter le rapport signal/bruit.

## **VII Etude du mécanisme des DsbE**

### **VII.1 Test de réduction de l'apocytochrome *c'* oxydé et de la cystine**

L'oxydation de l'apocytochrome *c'* se fait avec un excès de 2PDS (100  $\mu\text{M}$  d'apocytochrome *c'* pour 300  $\mu\text{M}$  de 2PDS) en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. L'excès de 2PDS ainsi que la dithiopyridine formée sont éliminés par passage sur colonne de dessalage EconoPac 10 DG (Biorad).

La réduction de l'apocytochrome *c'* oxydé par les DsbE est suivie grâce à une technique basée sur la différence d'amplitude d'émission de fluorescence entre les DsbE sous forme réduite et oxydée. Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R (Leatherhead, UK) (Stopped-flow) ainsi qu'à l'aide d'un fluorimètre Flx (SAFAS). Dans tous les cas, la concentration en DsbE est de 10  $\mu\text{M}$  et la concentration en apocytochrome *c'* oxydé varie de 50 à 200  $\mu\text{M}$  et la concentration en cystine varie de 100 à 500  $\mu\text{M}$ . Les mesures se font en tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 à 25°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm et un filtre permet de ne mesurer que l'émission de fluorescence que l'émission de fluorescence de longueur d'onde supérieure

## **Matériels et Méthodes**

à 320 nm sur l'appareil de cinétique rapide et l'émission de fluorescence est mesurée à 340 nm sur le fluorimètre.

Les traces expérimentales obtenues sont ajustées à l'équation d'une exponentielle afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes.

### **VII.2 Test de réduction des DsbE oxydées par la protéine nDsbD**

L'oxydation des DsbE se fait par ajout d'un excès de DTNB (100  $\mu$ M de DsbE pour 300  $\mu$ M de DTNB) en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0, pendant 20 min à température ambiante. L'excès de DTNB ainsi que TNB- formé est éliminé par passage sur colonne de dessalage EconoPac 10DG (Biorad).

La réduction des DsbE est suivie grâce à une technique basée sur la différence d'amplitude d'émission de fluorescence entre les DsbE sous forme réduite et oxydée. Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R (Leatherhead, UK) (Stopped-flow). La concentration en DsbE est de 10  $\mu$ M et la concentration en nDsbD varie de 50 à 400  $\mu$ M. Les mesures sont réalisées en tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 à 25°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 284 nm et un filtre permet de ne mesurer que l'émission de fluorescence que l'émission de fluorescence de longueur d'onde supérieure à 320 nm.

Les traces expérimentales obtenues sont ajustées sur une équation à une exponentielle afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes.

Pour la DsbE2t, une technique supplémentaire a été utilisée : la DsbE2t oxydée (50  $\mu$ M) est incubée avec la protéine nDsbD réduite (150  $\mu$ M) en tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 durant 10 min à température ambiante. Les deux protéines sont ensuite séparées par chromatographie échangeuse d'anions, et les groupements thiols libres sont titrés au DTNB.

## **VIII Tests de complémentation fonctionnelle bactérienne**

### **VIII.1 Complémentation chez *E. coli***

Pour cette étude, la souche d'*E. coli* EC29 délétée du gène codant la CcmG est utilisée. Cette souche a été transformée par les plasmides pRJ3290, contenant l'ORF codant pour le cytochrome *c550* de *B. japonicum*, et pEC210, contenant les ORF codant pour la

CcmG d'*E. coli* ou une des trois DsbE putative de *N. meningitidis*. Ces cellules sont cultivées en milieu minimum contenant des nitrites (voir paragraphe I.3.4, page 153) et en anaérobiose. Lorsque la  $DO_{600nm}$  atteint 0,1 DO, les cultures sont induites avec 0,2% d'arabinose, ce qui permet la transcription de l'ORF portée par le plasmide pRJ3290. Les cultures sont ensuite incubées durant 24 H à 37°C puis centrifugées à 4000 g pendant 20 min.

#### VIII.1.1 Fractionnement subcellulaire

Ce fractionnement subcellulaire est réalisé afin de ne récupérer que la fraction périplasmique. Les culots cellulaires sont dans un premier temps lavés avec du tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, puis repris dans 5 mL de tampon SET (Sucrose 0,5 M, Tris-HCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3). Ensuite, 15 mg de lysozyme sont ajoutés et le tout est incubé pendant 30 min à 37°C. La fraction périplasmique est récupérée après centrifugation à 9000 g pendant 30 min.

#### VIII.1.2 Technique de coloration de l'hème

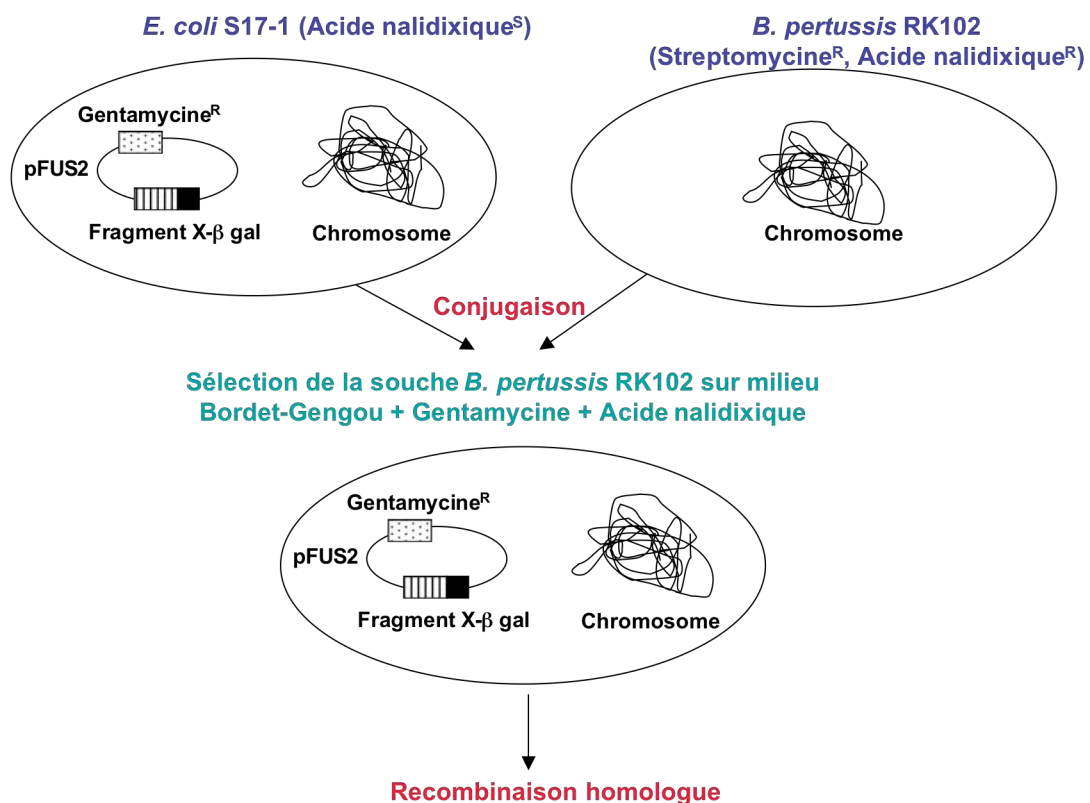
La concentration de protéine périplasmique est déterminée par un dosage avec le réactif de Bradford. 20 µg de protéines sont déposés sur un gel SDS-PAGE à 15%. Après migration, le gel est incubé pendant 10 min dans une solution de TCA 10% puis lavé abondamment à l'eau. La coloration de l'hème se fait grâce au réactif o-dianisidine : 20 mg d'o-dianisidine sont dissous dans du méthanol auxquels sont ajoutés 20 mL de tampon trisodium citrate 50 mM, pH 4,4. Le tout est incubé durant 20 min dans le noir. La révélation se fait par l'ajout de 0,7% d' $H_2O_2$  pendant 1 H.

### VIII.2 Complémentation chez *B. pertussis*

Pour cette étude, la souche RK102 de *B. pertussis*, délétée du gène codant la CcsX est utilisée. Les souches de *B. pertussis* sont cultivées sur des boîtes Bordet-Gengou au sang. Pour réaliser les tests de complémentation chez *B. pertussis*, nous avons utilisé une approche basée sur la recombinaison homologe. Pour permettre la recombinaison homologe, il est nécessaire de réaliser une construction chimérique en fusionnant au gène codant la DsbE de *N. meningitidis* une partie de l'ADN génomique de *B. pertussis* (paragraphe II.4 page 155). Cette construction chimérique est clonée dans le plasmide intégratif pFUS2. Les cellules S17-

## Matériels et Méthodes

1 d'*E. coli* sont transformées par ce plasmide (Figure 69). Ces cellules sont utilisées pour réaliser l'étape de conjugaison avec les cellules RK102 de *B. pertussis*. La conjugaison se fait sur milieu Bordet-Gengou au sang contenant 10 mM de MgCl<sub>2</sub> sans antibiotique. La moitié d'une nappe de *B. pertussis* est prélevée à l'aide d'une öse stérile et étalée sur la boîte Bordet-Gengou, 10 mM MgCl<sub>2</sub> dans un cercle de 3-4 cm de diamètre afin de former un « patch ». Environ 10 colonies de cellules S17-1 sont mélangées au « patch » de *B. pertussis* (respecter les proportions d'environ trois fois plus de cellules réceptrices que de cellules acceptrices). Après environ 5 H d'incubation, 1/3 du « patch » est prélevé et étalé sur milieu Bordet-Gengou contenant de la gentamycine (15 µg/mL), pour sélectionner le plasmide pFUS2, et de l'acide nalidixique (50 µg/mL) permettant d'éliminer les cellules S17-1 d'*E. coli* et de ne sélectionner que les cellules RK102 de *B. pertussis*. Les colonies apparues sont étalées sur milieu Bordet-Gengou contenant de la gentamycine (15 µg/mL) et de l'acide nalidixique (50 µg/mL) et l'insertion du plasmide dans le génome de *B. pertussis* est vérifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorce (pFUS2/DsbE).



**Figure 69** : Représentation schématique du protocole de conjugaison entre les cellules d'*E. coli* et des cellules de *B. pertussis*.

L'activité oxydase est testée grâce au réactif TMPD sur des colonies striées sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane est ensuite trempée dans une solution de TMPD 1% pendant environ 1 min. Si une coloration bleue apparaît, alors le test oxydase est positif.

# Bibliographie





**Ahuja, U., Thöny-Meyer, L.** (2003) Dynamic features of a heme delivery system for cytochrome *c* maturation. *J. Biol. Chem.* **278**, 52061-70.

**Ahuja, U., Thöny-Meyer, L.** (2005) CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J. Biol. Chem.* **280**, 236-43.

**Allen, J.W., Leach, N., Ferguson, S.J.** (2005) The histidine of the *c*-type cytochrome CXXCH haem-binding motif is essential for haem attachment by the *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation (Ccm) apparatus. *Biochem. J.* **389**, 587-92.

**Antoine, M., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45352-7.

**Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2006) Characterization of the amino acids from *Neisseria meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step. *J. Biol. Chem.* **281**, 39062-70.

**Anthony, C.** (1992) The *c*-type cytochromes of methylotrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1099**, 1-15.

**Aslund, F., Berndt, K. D., Holmgren, A.** (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* **272**, 30780-6.

**B** adger, J., Sauder, J.M., Adams, J.M., Antonysamy, S., Bain, K., Bergseid, M.G., Buchanan, S.G., Buchanan, M.D., Batiyenko, Y., Christopher, J.A. (2005) Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins.* **60**, 787-796.

**Balog, E. M., Norton, L. E., Thomas, D. D., et Fruen, B. R.** (2006) Role of calmodulin methionine residues in mediating productive association with cardiac ryanodine receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H794-9.

**Barrett EL, Clark MA.** (1987) Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiol. Rev.* **51**, 192-205.

**Beckett, C.S., Loughman, J.A., Karberg, K.A., Donato, G.M., Goldman, W.E., Kranz, R.G.** (2000) Four genes are required for the system II cytochrome *c* biogenesis pathway in *Bordetella pertussis*, a unique bacterial model. *Mol. Microbiol.* **38**, 465-81.

**Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., et Holmgren, A.** (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 29382-4.

**Bocharov, E. V., Sobol, A. G., Pavlov, K. V., Korzhnev, D. M., Jaravine, V. A., Gudkov, A. T., Arseniev, A. S.** (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J. Biol. Chem.* **279**, 17697-706.

**Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., et Branlant, G.** (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 35908-13.

## Bibliographie

**Boschi-Muller, S., Azza, S., et Branlant, G.** (2001) *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci.* **10**, 2272-9.

**Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., et Branlant, G.** (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 231-8.

**Braun, M., Rubio, I.G., Thöny-Meyer, L.** (2005) A heme tag for *in vivo* synthesis of artificial cytochromes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 234-9.

**Brot, N., Caldwell, P., Weissbach, H.** (1980) Autogenous control of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77**, 2592-5.

**Brot, N., Collet, J.F., Johnson, L.C., Jönsson, T.J., Weissbach, H., Lowther, W.T.** (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* **281**, 32668-75.

**Caldwell, P., Luk, D. C., Weissbach, H., Brot, N.** (1978) Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 5349-52.

**Calligaris, M.** (2004) Structure and bonding in metal sulfoxide complexes: an update. *Coordination Chem. Rev.* **248**, 351-375.

**Capitani, G., Rossmann, R., Sargent, D.F., Grütter, M.G., Richmond, T.J., Hennecke, H.** (2001) Structure of the soluble domain of a membrane-anchored thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum* reveals unusual properties. *J. Mol. Biol.* **311**, 1037-48.

**Carroll, K. S., Gao, H., Chen, H., Stout, C. D., Leary, J. A., Bertozzi, C. R.** (2005) A conserved mechanism for sulfonucleotide reduction. *PLoS Biol.* **3**, e250.

**Chang, T.S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S., Rhee, S.G.** (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J. Biol. Chem.* **279**, 50994-1001.

**Chartron, J., Shiau, C., Stout, C. D., Carroll, K. S.** (2007) 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase in complex with thioredoxin: a structural snapshot in the catalytic cycle. *Biochemistry* **46**, 3942-51.

**Chivers, P. T., Prehoda, K. E., Volkman, B. F., Kim, B. M., Markley, J. L., et Raines, R. T.** (1997) Microscopic pKa values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**, 14985-91.

**Chivers, P. T., et Raines, R. T.** (1997) General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**, 15810-6.

**Chu, J. W., Trout, B. L.** (2003) On the mechanisms of oxidation of organic sulfides by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 900-908.

**Cioslowski, J., Mixon, S. T.** (1993) Rigorous Interpretation of Electronic Wave-Functions .2. Electronic-Structures of Selected Phosphorus, Sulfur, and Chlorine Fluorides and Oxides. *Inorg. Chem.* **32**, 3209-3216.

**Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N., et Hoshi, T.** (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 9932-7.

**Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N., et Hoshi, T.** (1999) Regulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS. Lett.* **442**, 48-52.

**Colbert, C.L., Wu, Q., Erbel, P.J., Gardner, K.H., Deisenhofer, J.** (2006) Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome *c* maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 4410-5.

**Coudeville, N., Antoine, M., Bouguet-Bonnet, S., Mutzenhardt, P., Boschi-Muller, S., Branlant, G., et Cung, M. T.** (2006) Solution Structure and Backbone Dynamics of the Reduced Form and an Oxidized Form of *E. coli* Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA): Structural Insight of the MsrA Catalytic Cycle. *J. Mol. Biol.*

**Cross, R., Aish, J., Paston, S.J., Poole, R.K., Moir, J.W.** (2000) Cytochrome *c'* from *Rhodobacter capsulatus* confers increased resistance to nitric oxide. *J. Bact.* **182**, 1442-7.

**Cross, R., Lloyd, D., Poole, R.K., Moir, J.W.** (2001) Enzymatic removal of nitric oxide catalyzed by cytochrome *c'* in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bact.* **183**, 3050-4.

**Crow, A., Acheson, R.M., Le Brun, N.E., Oubrie, A.** (2004) Structural basis of Redox-coupled protein substrate selection by the cytochrome *c* biosynthesis protein ResA. *J. Biol. Chem.* **279**, 23654-60.

**Daltrop, O., Allen, J.W., Willis, A.C., Ferguson, S.J.** (2002) In vitro formation of a c-type cytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 7872-6.

**Davis, F. A., Billmers, R. L.** (1981) Chemistry of Sulfenic Acids .4. The 1st Direct Evidence for the Involvement of Sulfenic Acids in the Oxidation of Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7016-7018.

**Deeudom, M., Rock, J., Moir, J.** (2005) Organization of the respiratory chain of *Neisseria meningitidis*. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 139-42.

**Di Matteo, A., Gianni, S., Schinà, M.E., Giorgi, A., Altieri, F., Calosci, N., Brunori, M., Travaglini-Allocatelli, C.** (2007) A strategic protein in cytochrome *c* maturation: three-dimensional structure of CcmH and binding to apocytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **282**, 27012-9.

**Dobado, J. A., Martinez-Garcia, H., Molina, J. M., et Sundberg, M. R.** (1999) Chemical Bonding in Hypervalent Molecules Revised. 2. Application of the Atoms in Molecules Theory to Y<sub>2</sub>XZ and Y<sub>2</sub>XZ<sub>2</sub> (Y = H, F, CH<sub>3</sub>; X = O, S, Se; Z = O, S) Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3156-3164.

**Douglas, T., Daniel, D. S., Parida, B. K., Jagannath, C., et Dhandayuthapani, S.** (2004) Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages. *J. Bacteriol.* **186**, 3590-8.

**Dreizler, H., Dendle, G.** (1964) *Z. Naturforsch.* **19a**, 512.

## Bibliographie

**Dumont, M.E., Ernst, J.F., Sherman, F.** (1988) Coupling of heme attachment to import of cytochrome *c* into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes *c*. *J. Biol. Chem.* **263**, 15928-37.

**Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., Sherman, F.** (1991) Role of cytochrome *c* heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5487-96.

**E****deling, M.A., Guddat, L.W., Fabianek, R.A., Thöny-Meyer, L., Martin, J.L.** (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure* **10**, 973-9.

**El Hassouni, M., Henrissat, B., Chippaux, M., Barras, F.** (1992) Nucleotide sequences of the *arb* genes, which control beta-glucoside utilization in *Erwinia chrysanthemi*: comparison with the *Escherichia coli* *bgl* operon and evidence for a new beta-glycohydrolase family including enzymes from eubacteria, archaeobacteria, and humans. *J. Bacteriol.* **174**, 765-77.

**Ezraty, B., Grimaud, R., Hassouni, M. E., Moinier, D., et Barras, F.** (2004) Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **23**, 1868-77.

**Ezraty, B., Bos, J., Barras, F., et Aussel, L.** (2005) Methionine sulfoxide reduction and assimilation in *Escherichia coli*: new role for the biotin sulfoxide reductase BisC. *J. Bacteriol.* **187**, 231-7.

**F****abianek, R.A., Hennecke, H., Thöny-Meyer, L.** (2000) Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 303-16.

**Fabianek, R.A., Hennecke, H., Thöny-Meyer, L.** (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome *c* maturation in vivo. *J. Bacteriol.* **180**, 1947-50.

**Fabianek, R. A., M. Huber-Wunderlich, R. Glockshuber, P. Künzler, H. Hennecke, Thöny-Meyer, L.** (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4467-4473.

**Fisher, W.R., Taniuchi, H., Anfinsen, C.B.** (1972) On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **248**, 3188-95.

**G****and, A., Antoine, M., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2007) Characterization of the amino-acids involved in substrate specificity of methionine sulfoxide reductase A. *J. Biol. Chem.*

**Gao, J., Yin, D. H., Yao, Y., Sun, H., Qin, Z., Schoneich, C., Williams, T. D., et Squier, T. C.** (1998) Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys. J.* **74**, 1115-34.

**Gao, J., Yao, Y., et Squier, T. C.** (2001) Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex. *Biophys. J.* **80**, 1791-801.

- Garton, S. D., Hilton, J., Oku, H., Crouse, B. R., Rajagopalan, K. V., et Johnson, M. K.** (1997) Active site structure and catalytic mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* Dimethyl Sulfoxide Reductase as revealed by Resonance Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12906-12916.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Rauegi, G., Ramponi, G., Chiarugi, P.** (2005) Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6391-403.
- Giegé, P., Grinenberger, J.M., Bonnard, G.** (2007) Cytochrome *c* biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion*. **8**, 61-73.
- Gill, S. C., et Hippel, P. H. v.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* **182**, 319-326.
- Gitlin, G., Tsarbopoulos, A., Patel, S. T., Sydor, W., Pramanik, B. N., Jacobs, S., Westreich, L., Mittelman, S., et Bausch, J. N.** (1996) Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. *Pharm. Res.* **13**, 762-9.
- Glaser, C. B., Yamin, G., Uversky, V. N., et Fink, A. L.** (2005) Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 157-69.
- Goldman, B.S., Gabbert, K.K., Kranz, R.G.** (1996) Use of heme reporters for studies of cytochrome biosynthesis and heme transport. *J. Bact.* **178**, 6338-47.
- Goldman, B.S., Beckman, D.L., Bali, A., Monika, E.M., Gabbert, K.K., Kranz, R.G.** (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. *J. Mol. Biol.* **268**, 724-38.
- Goldman, B.S., Beck, D.L., Monika, E.M., Kranz, R.G.** (1998) Transmembrane heme delivery systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 5003-8.
- Gonzalez Porque, P., Baldesten, A., et Reichard, P.** (1970) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.* **245**, 2371-4.
- Gordon, E.H., Page, M.D., Willis, A.C., Ferguson, S.J.** (2000) *Escherichia coli* DipZ: anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Mol. Microbiol.* **35**, 1360-74.
- Goulding, C.W., Sawaya, M.R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D., Missiakas, D.** (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry.* **41**, 6920-7.
- Goulding, C.W., Apostol, M.I., Gleiter, S., Parseghian, A., Bardwell, J., Gennaro, M., Eisenberg, D.** (2004) Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 3516-24.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., et Barras, F.** (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.* **276**, 48915-20.

## Bibliographie

**Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., Craik, D. J.** (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 455-64.

**H**aebel, P.W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J., Metcalf, P. (2002) The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD complex. *EMBO J.* **21**, 4774-84.

**Hansel, A., Jung, S., Hoshi, T., et Heinemann, S. H.** (2003) A second human methionine sulfoxide reductase (hMSRB2) reducing methionine-R-sulfoxide displays a tissue expression pattern distinct from hMSRB1. *Redox Rep.* **8**, 384-8.

**Holmgren, A.** (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73**, 2275-9.

**Huston, W.M., Lowe, E.C., Butler, C.S., Moir, J.W.** (2005) Purification and characterization of cytochrome c' from *Neisseria meningitidis*. *Biochem Soc Trans.* 2005 Feb;33(Pt 1):187-9.

**Hsu, Y. R., Narhi, L. O., Spahr, C., Langley, K. E., et 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**, 1165-73.

**I**noe, K., Hoshijima, K., Sakamoto, H., et Shimura, Y. (1990) Binding of the Drosophila sex-lethal gene product to the alternative splice site of transformer primary transcript. *Nature* **344**, 461-3.

**J**ung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T., et Heinemann, S. H. (2002) Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Lett.* **527**, 91-4.

**K**adokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 111-35.

**Kantorow, M., Hawse, J. R., Cowell, T. L., Benhamed, S., Pizarro, G. O., Reddy, V. N., et Hejtmancik, J. F.** (2004) Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 9654-9.

**Katzen, F., Beckwith, J.** (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell.* **103**, 769-79.

**Khor, H. K., Fisher, M. T., Schoneich, C.** (2004) Potential role of methionine sulfoxide in the inactivation of the chaperone GroEL by hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite (ONOO-). *J. Biol. Chem.* **279**, 19486-93.

**Kim, H. Y., et Gladyshev, V. N.** (2004a) Characterization of mouse endoplasmic reticulum methionine-R-sulfoxide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1277-83.

**Kim, H. Y., et Gladyshev, V. N.** (2005) Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. *PLoS Biol.* **3**, e375.

**Kim, H. Y., Fomenko, D. E., Yoon, Y. E., et Gladyshev, V. N.** (2006) Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases. *Biochemistry* **45**, 13697-704.

**Kranz, R.G., Beckett, C.S., Goldman, B.S.** (2002) Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome *c* assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome *c* biogenesis pathway. *Res. Microbiol.* **153**, 1-6.

**Krause, G., Lundstrom, J., Barea, J. L., Pueyo de la Cuesta, C., Holmgren, A.** (1991) Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **266**, 9494-500.

**Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z., et Gladyshev, V. N.** (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 4245-50.

**Kuschel, L., Hansel, A., Schonherr, R., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T., et Heinemann, S. H.** (1999) Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS Lett.* **456**, 17-21.

**L** Laurent, T. C., Moore, E. C., et Reichard, P. (1964) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. *J. Biol. Chem.* **239**, 3436-44.

**Le Brun, N.E., Bengtsson, J., Hederstedt, L.** (2000) Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **36**, 638-50.

**Lennon, B. W., Williams Jr., C. H., Ludwig, M. L.** (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* **289**, 1190-1194.

**Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., et Krol, A.** (1999) Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 38147-54.

**Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., et Stadtman, E. R.** (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 15036-40.

**Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., et Stadtman, E. R.** (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* **107**, 323-32.

**Lewin, A., Crow, A., Oubrie, A., Le Brun, N.E.** (2006) Molecular basis for specificity of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *J. Biol. Chem.* **281**, 35467-77.

**Li, Y., Hu, Y., Zhang, X., Xu, H., Lescop, E., Xia, B., et Jin, C.** (2007) Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **282**, 11078-83.

**Lin, Z., Johnson, L. C., Weissbach, H., Brot, N., Lively, M. O., et Lowther, W. T.** (2007) Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 9597-602.

## Bibliographie

**Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., et Matthews, B. W.** (2000) Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry* **39**, 13307-12.

**Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., et Matthews, B. W.** (2002) The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 348-52.

**M****archal, S., Branlant, G.** (1999) Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*. **38**, 12950-8.

**Marchetti, M. A., Pizarro, G. O., Sagher, D., Deamicis, C., Brot, N., Hejtmancik, J. F., Weissbach, H., et Kantorow, M.** (2005) Methionine sulfoxide reductases B1, B2, and B3 are present in the human lens and confer oxidative stress resistance to lens cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2107-12.

**Marchetti, M. A., Lee, W., Cowell, T. L., Wells, T. M., Weissbach, H., et Kantorow, M.** (2006) Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells. *Exp. Eye Res.* **83**, 1281-6.

**Messens, J., Collet, J. F.** (2006) Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **38**, 1050-62.

**Messens, J., et Silver, S.** (2006) Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J. Mol. Biol.* **362**, 1-17.

**Meyer, E.H., Giegé, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thöny-Meyer, L., Grienenberger, J.M., Bonnard, G.** (2005) AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 16113-8.

**Miller, B. L., Kuczera, K., Schoneich, C.** (1998) One-electron photooxidation of N-methionyl peptides. Mechanism of sulfoxide and azasulfonium diastereomer formation through reaction of sulfide radical cation complexes with oxygen or superoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3345-3356.

**Moskovitz, J., Rahman, M. A., Strassman, J., Yancey, S. O., Kushner, S. R., Brot, N., et Weissbach, H.** (1995) *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J. Bacteriol.* **177**, 502-7.

**Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S., et Stadtman, E. R.** (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 12920-5.

**N****akamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K., et Yodoi, J.** (1994) Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol. Lett.* **42**, 75-80.



**Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S., Branlant, G.** (2004) Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. *J. Biol. Chem.* **279**, 42462-8.

**Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G., et Stadtman, E. R.** (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15315-21.

**Oblong, J. E., Berggren, M., Gasdaska, P. Y., et Powis, G.** (1994) Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **269**, 11714-20.

**Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., et Branlant, G.** (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12016-22.

**Olry, A., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2004) Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* **43**, 11616-22.

**Olry, A., Boschi-Muller, S., Yu, H., Burnel, D., et Branlant, G.** (2005) Insights into the role of the metal binding site in methionine-R-sulfoxide reductases B. *Protein Sci.* **14**, 2828-37.

**Ouyang, N., Gao, Y.G., Hu, H.Y., Xia, Z.X.** (2006) Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal beta-sheet and the fingerprint region. *Proteins.* **65**, 1021-31.

**Page, M.D., Pearce, D.A., Norris, H.A., Ferguson, S.J.** (1997) The *Paracoccus denitrificans* ccmA, B and C genes: cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- *c*-type cytochrome transporter. *Microbiol.* **143**, 563-76

**Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., et Spyrou, G.** (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 16296-301.

**Perrin, D., Koppenol, W. H.** (2000) The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **377** 266-72.

**Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M., et Friguet, B.** (2001) Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem. J.* **355**, 819-25.

**Picot, C. R., Perichon, M., Cintrat, J. C., Friguet, B., Petropoulos, I.** (2004) The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.* **558**, 74-8.

**Price, C. C., et Oae, S.** (1962) *Sulfur bonding*; Ronald Press: New York.

**Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R., et Gronenborn, A. M.** (1995) Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B. *Structure* **3**, 289-97.

## Bibliographie

**Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Kuszewski, J., et Gronenborn, A. M.** (1996) The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure* **4**, 613-20.

**Racker, E.** (1955) Glutathione-homocystine transhydrogenase. *J. Biol. Chem.* **217**, 867-74.

**Ranaivoson, M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjekar, S., Aubry, A., Branlant, G., Favier, F.** (2006) The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J. Mol. Biol.* **358**, 443-54.

**Ranaivoson, M., Antoine, M., Kauffmann, B., Boschi-Muller, S., Panjekar, S., Aubry, A., Branlant, G., Favier, F.** (2008) A structural analysis of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **377**, 268-80.

**Reed, A. E., Schleyer, P. V.** (1990) Chemical Bonding in Hypervalent Molecules - the Dominance of Ionic Bonding and Negative Hyperconjugation over D-Orbital Participation. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1434-1445.

**Reid, E., Cole, J., Eaves, D.J.** (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem. J.* **355**, 51-8.

**Ritz, D., et Beckwith, J.** (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 21-48.

**Rock, J.D., Mahnane, M.R., Anjum, M.F., Shaw, J.G., Read, R.C., Moir, J.W.** (2005) The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolic levels. *Mol. Microbiol.* **58**, 800-9.

**Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J. P., et Boschi-Muller, S.** (2007) Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* **282**, 3367-78.

**Rozhkova A, Stirnimann CU, Frei P, Grauschopf U, Brunisholz R, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R.** (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* **23**, 1709-19.

**Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M. L., Joiner, M. L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Iverson, L., Wu, C. F., et Hoshi, T.** (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 2748-53.

**Sacksteder, C. A., Whittier, J. E., Xiong, Y., Li, J., Galeva, N. A., Jacoby, M. E., Purvine, S. O., Williams, T. D., Rechsteiner, M. C., Bigelow, D. J., Squier, T. C.** (2006) Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionine145 in calmodulin promotes targeted proteasomal degradation. *Biophys. J.* **91**, 1480-93.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., et Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual."

**Schechter, Y., Burstein, Y., Patchornik, A.** (1975) Proceedings: Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Isr. J. Med. Sci.* **11**, 1171.

- Schoneich, C., Bobrowski, K.** (1994) Reaction of Hydroxysulfuranyl Radical with Molecular-Oxygen - Electron-Transfer Vs Addition. *J. Phys. Chem.* **98**, 12613-12620.
- Schoneich, C.** (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 111-9.
- Schulz, H., Fabianek, R.A., Pelliccioli, E.C., Hennecke, H., Thöny-Meyer, L.** (1999) Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 6462-7.
- Seib, K. L., Tseng, H. J., McEwan, A. G., Apicella, M. A., et Jennings, M. P.** (2004) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. *J. Infect. Dis.* **190**, 136-47.
- Seib, K. L., Wu, H. J., Kidd, S. P., Apicella, M. A., Jennings, M. P., et McEwan, A. G.** (2006) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 344-61.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., et Rhee, S. G.** (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* **275**, 20346-54.
- Shao, B., Belaouaj, A., Verlinde, C. L., Fu, X., Heinecke, J. W.** (2005) Methionine sulfoxide and proteolytic cleavage contribute to the inactivation of cathepsin G by hypochlorous acid: an oxidative mechanism for regulation of serine proteinases by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **280**, 29311-21.
- Singh, V. K., Moskovitz, J.** (2003) Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiol.* **149**, 2739-47.
- Singh, S. V., Srivastava, S. K., Choi, S., Lew, K. L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S. C., Johnson, C. S., Trump, D. L., Lee, Y. J., Xiao, H., Herman-Antosiewicz, A.** (2005) Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **280**, 19911-24.
- Sinha, S., Langford, P.R., Kroll, J.S.** (2004) Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* **150**, 2993-3000.
- Skaar, E. P., Tobiason, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., et Seifert, H. S.** (2002) The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 10108-13.
- Stevanin, T. M., Moir, J. W., et Read, R. C.** (2005) Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect. Immun.* **73**, 3322-9.
- Stirnemann, C.U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Grütter, M.G., Glockshuber, R., Capitani, G.** (2005) Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome *c* maturation. *Structure.* **13**, 985-93.

## Bibliographie

**Stirnemann, C.U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Böckmann, R.A., Glockshuber, R., Capitani, G., Grütter, M.G.** (2006) High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J. Mol. Biol.* **358**, 829-45.

**Stewart, E.J., Katzen, F., Beckwith, J.** (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 5963-71.

**Su, Z., Limberis, J., Martin, R.L., Xu, R., Kolbe, K., Heinemann, S.H., Hoshi, T., Cox, B.F., Gintant, G.A.** (2007) Functional consequences of methionine oxidation of hERG potassium channels. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 702-11.

**Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D., Hulett, F.M.** (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 1374-85.

**Sun, H., Gao, J., Ferrington, D. A., Biesiada, H., Williams, T. D., et Squier, T. C.** (1999) Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* **38**, 105-12.

**Taha, M. K., Morand, P. C., Pereira, Y., Eugene, E., Giorgini, D., Larribe, M., et Nassif, X.** (1998) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol. Microbiol.* **28**, 1153-63.

**Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., et Hart, P. J.** (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. *J. Bacteriol.* **185**, 4119-26.

**Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., et Aubry, A.** (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold. Des.* **8**, 1167-78.

**Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Künzler, P., Ritz, D., Hennecke, H.** (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *J. Bacteriol.* **177**, 4321-6.

**Thöny-Meyer, L.** (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 337-76.

**Tinsley, C.R., Voulhoux, R., Beretti, J.L., Tommassen, J., Nassif, X.** (2004) Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem.* **279**, 27078-87.

**Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., et Nikaido, T.** (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 35809-15.

**Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., Brennicke, A.** (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* **15**, 57-61.

**W** akasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J., et Tursz, T.

(1990) Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 8282-6.

**Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., Rhee, S.G.** (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **280**, 3125-8.

**Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* **280**, 12344-50.

**X**iong, Y., Chen, B., Smallwood, H.S., Urbauer, R.J., Markille, L.M., Galeva, N., Williams,

**T.D., Squier, T.C.** (2006) High-affinity and cooperative binding of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase. *Biochemistry.* **45**, 14642-54.

**Y**ermolaieva, O., Xu, R., Schinstock, C., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Hoshi, T. (2004) Methionine sulfoxide reductase A protects neuronal cells against brief hypoxia/reoxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 1159-64.

**Yu, H., et Schreiber, S. L.** (1995) Cloning, Zn<sup>2+</sup> binding, and structural characterization of the guanine nucleotide exchange factor human Mss4. *Biochemistry* **34**, 9103-10.

**Z**hu, Z., Dumas, J. J., Lietzke, S. E., et Lambright, D. G. (2001) A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release. *Biochemistry* **40**, 3027-36.

