



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Analyse Structurale par RMN des Interactions de la MsrB de *Neisseria meningitidis* avec ses Partenaires Biologiques.

THÈSE

Soutenue publiquement le 20 Octobre 2005

pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

(spécialité Génie des Procédés)

par

Aurélien Thureau

Membres du jury

Président : Professeur Jean-Pierre Girault

Rapporteurs : Docteur Muriel Delepierre,
Professeur Christian Roumestand

Examineurs : Professeur Sandrine Boschi-Muller,
Professeur Guy Branlant,
Professeur Jean-Pierre Girault,
Docteur Manh-Thong Cung

Mis en page avec la classe thloria.

*A mes amis,
ma famille,
et pour toi Julie . . .*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Pr. Édith Dellacherie, Directrice de l'UMR 7568 CNRS-INPL pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Manh Thông Cung, Directeur de recherche CNRS et directeur de cette thèse. Je le remercie de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Ses connaissances en RMN, sa curiosité et son expérience, qu'il m'a en partie transmises, m'ont permis de mener à bien ce projet. Je le remercie également de m'avoir fait confiance en me laissant toute liberté au cours de mes recherches.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Muriel Delepierre, Directeur de recherche CNRS et au Professeur Christian Roumestand qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je remercie vivement Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller et messieurs les Professeurs Jean-Pierre Girault et Guy Branlant d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Dans le cadre de la collaboration avec Madame Sandrine Boschi-Muller et Monsieur Guy Branlant sur les MsrB, leurs remarques m'ont énormément apportées et m'ont permis de comprendre le rôle des Msr dans son ensemble. Pour leurs conseils avisés, je leur en suis très reconnaissant.

J'exprime aussi mes vifs remerciements à Éric Guittet, Directeur de recherche CNRS et au Dr. Nikolas Bilirakis qui m'ont autorisé à utiliser le spectromètre de 800 MHz présent au laboratoire de RMN de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif sur Yvette. Sans eux la MsrB oxydée n'aurait pas vu le jour.

Je n'oublie pas le Dr. Alexandre Olry, qui fut tout d'abord un collaborateur et rapidement un ami. Nos discussions lors de nos chevauchés le long de la Pep' nous ont permis d'allier la détente et quelques fois la science. Merci également à AlexK et Christophe pour m'avoir aidé dans les délicates opérations de purification de la MsrB, Fabrice pour les mutants et Matthias pour le «bonjour Dr. Thureau» dès le début de ma thèse.

Je ne saurais oublier les membres anciens, actuels et futurs du laboratoire. Mr Marraud, pour ses définitions à couper le souffle, Marie-Christine, pour ses conseils et sa bonne

humeur, Guy pour sa lecture approfondie de ma thèse, Régis pour l'organisation des nombreux repas de labo et ses citations célèbres, Christine, pour m'avoir initié à la RMN, Jean-Marie, pour l'informatique, Fat, la courageuse à qui je souhaite bonne chance, Axelle, la maman des d'jeunes, Oliv', le monsieur reumeuneu du LCPM sans oublier AnnSof, la madame barbeuc', Isa, la Tanguy de Nancy, Chrystel, pour avoir mis de la couleur au labo, Nico, pour les bons moments passés ensemble, Marco pour avoir lu ma thèse et décider de commencer la même galère que moi, merci à vous tous !

Le LSGC n'échappera pas aux remerciements avec Cédric, Guillain, Steffi, Maud, Marie, Delph, Fred, Mamar, JeanJean . . .

Enfin je voudrais remercier tous ceux qui, de près ou de loin, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé et soutenu pour l'élaboration de cette thèse. A tous ceux qui m'ont dit : «Alors t'en es où ?», merci !

Pour ceux qui ne sont pas cités, excusez moi d'avance.

Table des matières

Liste des Abréviations	ix
Introduction	1
Chapitre 1	
Les Méthionine Sulfoxyde Réductases	
1.1 Oxydation des protéines	6
1.1.1 Formes activées de l'oxygène	6
1.1.2 Conséquences sur les protéines	7
1.1.3 La méthionine	9
1.2 Les Méthionine Sulfoxyde Réductases	12
1.2.1 Propriétés et organisation des Msr	13
1.2.2 Fonctions des Msr	14
1.2.3 Conséquences du fonctionnement des Msr	16
1.3 La Méthionine sulfoxyde réductase B	17
1.3.1 Caractérisation des MsrB	17
1.3.2 Études structurales	19
1.3.3 Mécanisme catalytique	22
1.4 Conclusion	23
Bibliographie	25

Chapitre 2**Étude des protéines par RMN**

2.1	RMN des protéines	37
2.1.1	Introduction à la RMN	37
2.1.2	Avancées technologiques	39
2.2	Processus d'études d'une protéine	44
2.2.1	Production de l'échantillon	44
2.2.2	Attribution des raies de résonance du squelette peptidique	47
2.2.3	Études supplémentaires	51
2.3	Études des interactions	57
2.3.1	Phénomènes d'échanges	58
2.3.2	Détermination des interfaces d'interaction	62
2.3.3	Détermination de contraintes géométriques	66
2.4	Conclusion	71
	Bibliographie	73

Chapitre 3**Étude de la MsrB réduite de *N. meningitidis***

3.1	Production et purification	84
3.1.1	Production en milieu minimum	84
3.1.2	Purification	85
3.2	Caractérisation structurale	87
3.2.1	Méthodes bio-informatiques	87
3.2.2	Dichroïsme circulaire	88
3.2.3	RMN bidimensionnelle hétéronucléaire	90
3.3	Étude RMN de la MsrB réduite	92
3.3.1	Attribution des atomes de la MsrB réduite	92
3.3.2	Note d'attribution : J. Biomol. NMR	96
3.3.3	Prédiction des structures secondaires	98
3.3.4	Expériences NOESY	99
3.4	Conclusion	100
	Bibliographie	102

Chapitre 4

Études des interactions

4.1	Interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde	109
4.1.1	Étude du mutant C117S	109
4.1.2	Cartographie des déplacements chimiques perturbés	112
4.1.3	Études du pKa des histidines 100 et 103	118
4.1.4	Discussion	120
4.2	Intermédiaire acide sulfénique	125
4.2.1	Le mutant C63S	125
4.2.2	Étude de la formation de l'acide sulfénique	129
4.2.3	Discussion	132
4.3	MsrB oxydée	134
4.3.1	Préparation de l'échantillon	134
4.3.2	Échantillon doublement marqué	135
4.3.3	Échantillon triplement marqué	137
4.3.4	Discussion	143
4.4	Interaction de la MsrB oxydée avec la thiorédoxine	146
4.4.1	Rôle de la thiorédoxine vis-à-vis des Msr	146
4.4.2	Résultats	148
4.4.3	Discussion	151
	Bibliographie	154

Discussion générale et conclusion**157**

Liste des Abréviations

CaM	Calmoduline
CDR	Couplage Dipolaire Résiduel
COSY	CORrelation SpectroscopY
CSA	Anisotropie de déplacement chimique
CSI	Chemical Shift Index
DC	Dichroïsme Circulaire
DTT	DiThioThréitol : $C_4H_{10}O_2S_2$
FAO	Formes Actives de l'Oxygène
FID	Free Induction Decay
HADDOCK	High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing
hnOe	paramètre de relaxation croisé hétéronucléaire nOe
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
MAEM	laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire
MetSO	Méthionine sulfoxyde : $L-[R,S]Met(O)$
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PDB	Protein Data Bank
RHS	Reactive Halogen Species
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNS	Reactive Nitrogen Species

ROESY Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ROS Reactive Oxygen Species

STD Saturation Transfert Difference

TALOS Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity

TOCSY TOtal Correlation Spectroscopy

TR-NOE Expérience NOESY Transféré

TROSY Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy

Trx Thiorédoxine

Introduction

Les formes activées de l'oxygène et de l'azote produites au cours du métabolisme cellulaire ou lors d'un stress oxydant, modifient de nombreuses cibles biologiques dont les protéines. La méthionine est l'un des principaux acides aminés qui peut être oxydé. Son oxydation en méthionine sulfoxyde modifie la flexibilité de sa chaîne latérale et son hydrophobicité. Lorsque cette modification se situe sur des méthionines incluses au sein de protéines, cela peut entraîner des modifications conformationnelles de ces dernières et ainsi modifier leur activité. Ce phénomène d'oxydation est souvent associé au vieillissement. Afin de pallier ce problème, les cellules produisent des enzymes capables de réduire les méthionines sulfoxyde en méthionines : les méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Ces enzymes ont donc un rôle de protection contre le stress oxydant. De par leur rôle de réparation, elles sont essentielles au maintien de la fonction de nombreuses protéines et par conséquent avoir un rôle bénéfique pour la cellule. Le rôle de ces Msr est principalement étudié dans le cas de maladies liées au vieillissement. Par contre les bactéries pathogènes utilisent également ces protéines pour augmenter leur résistance aux entités oxygénées produites par les systèmes de défense de l'hôte infecté. C'est le cas des bactéries du genre *Neisseria* dont deux espèces en particulier sont pathogènes pour l'homme : *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. L'oxydation des méthionines au niveau du soufre de leur chaîne latérale conduit à la formation des deux diastéréoisomères, la méthionine-*S*-sulfoxyde et la méthionine-*R*-sulfoxyde, qui sont réduites respectivement par les méthionine sulfoxyde réductases de type A et de type B (MsrA et MsrB). Ces deux familles de Msr ne présentent aucune similitude de structure primaire et lorsque nous avons démarré l'étude de la MsrB, aucune donnée structurale n'était connue pour cette dernière. Depuis, une structure RX de MsrB a été publiée et il a été montré aucune similitude structurale entre ces deux familles. Les Msr présentent un mécanisme original de réduction du sulfoxyde par des thiolates. Le mécanisme proposé par l'équipe du Professeur Guy Branlant du MAEM de l'Université Henri Poincaré Nancy I comprend trois étapes : 1) la formation d'un intermédiaire acide sulfénique avec relargage d'une molécule de méthionine ; 2) la formation d'un intermédiaire pont disulfure intramoléculaire et enfin

3) la réduction du pont disulfure par la thiorédoxine. L'objectif de mon travail était de caractériser structuralement la MsrB de *N. meningitidis* sous sa forme réduite par RMN, en vue de définir, par une approche type relation structure/fonction, les acides aminés impliqués dans la catalyse, la spécificité structurale au niveau des méthionines sulfoxydes et au niveau de la thiorédoxine. Dès la mise en place du sujet, la structure cristallographique de la MsrB de *N. gonorrhoeae* a été publiée. Nous avons donc réorienté le sujet sur la caractérisation du mécanisme catalytique de réduction et de recyclage de la MsrB de *N. meningitidis* par des études d'interactions de la MsrB avec ses partenaires. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe Enzymologie dirigée par le Professeur Guy Branlant du laboratoire MAEM. Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire UMR-CNRS 7568 de l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, dans l'équipe Biostructure.

Le rôle des MsrB au sein des cellules sera traité dans le premier chapitre. Je présenterai ensuite dans un deuxième chapitre, les avancées scientifiques au niveau de la RMN des protéines qui ont fait de la RMN une technique indispensable pour l'étude des macromolécules en solution. Les résultats obtenus durant ma thèse seront développés dans les chapitres 3 et 4. Le chapitre 3 traitera des résultats préliminaires de la forme réduite de la MsrB qui m'ont permis de me familiariser avec la technique de la RMN appliquée aux protéines. L'interaction de la MsrB avec ses partenaires et son évolution conformationnelle sera traitée dans le chapitre 4.

Chapitre 1

Les Méthionine Sulfoxyde Réductases

Sommaire

1.1	Oxydation des protéines	6
1.1.1	Formes activées de l'oxygène	6
1.1.2	Conséquences sur les protéines	7
1.1.2.1	Cibles des agents oxydants	7
1.1.2.2	Oxydation et problèmes physio-pathologiques	9
1.1.3	La méthionine	9
1.1.3.1	Réactivité de la chaîne latérale	10
1.1.3.2	Conséquences et rôle de l'oxydation de la méthionine	11
1.1.3.3	Réduction chimique des MetSO	12
1.2	Les Méthionine Sulfoxyde Réductases	12
1.2.1	Propriétés et organisation des Msr	13
1.2.2	Fonctions des Msr	14
1.2.2.1	Rôle de défense et de détoxification	14
1.2.2.2	Régulation des protéines	15
1.2.3	Conséquences du fonctionnement des Msr	16
1.2.3.1	Msr et les maladies et le vieillissement	16
1.2.3.2	Bactéries pathogènes	17
1.3	La Méthionine sulfoxyde réductase B	17
1.3.1	Caractérisation des MsrB	17
1.3.1.1	Identification des MsrB	17
1.3.1.2	Alignement de séquences	18
1.3.2	Études structurales	19
1.3.2.1	Étude RMN	19

1.3.2.2	Étude cristallographique	20
1.3.3	Mécanisme catalytique	22
1.3.3.1	Les différents étapes du mécanisme	22
1.3.3.2	Les différents partenaires de la MsrB	22
1.4	Conclusion	23
	Bibliographie	25

L'apparition, il y a 2 à 3 milliards d'années, d'une quantité suffisante d'oxygène pour le développement d'une vie aérobie dans l'atmosphère terrestre coïncide avec la naissance des cyanobactéries. A partir de l'énergie lumineuse et grâce à la photosynthèse ces organismes pouvaient produire de l'énergie chimique (ATP et réducteurs) tout en rejetant de l'oxygène [1.1]. C'est à partir de cette période que des organismes ont commencé à utiliser l'oxygène comme source énergétique : ce sont les organismes aérobies. L'oxygène a pris une part importante dans la composition de l'atmosphère pour arriver, à l'heure actuelle, à une stabilité égale à 21 % en volume. Bien qu'étant un composant vital, il est cependant toxique pour de nombreuses cellules car, au contact de nombreux composés, cette molécule peut produire des formes activées de l'oxygène (FAO). La production de FAO peut être directement liée au fonctionnement de la cellule elle-même régulée par le biais d'agents extérieurs [1.2]. Ces espèces oxydantes peuvent altérer le fonctionnement des organismes en réagissant avec d'autres composants essentiels de la cellule comme les acides nucléiques, éléments de l'ADN, les lipides qui constituent les membranes cellulaires mais aussi les protéines. L'action des FAO sur certaines protéines entraînent des modifications post-traductionnelles qui sont liées, dans plusieurs dysfonctionnements, à l'accélération du vieillissement des cellules [1.3]. Afin de pallier les conséquences de ces attaques oxydatives, les organismes ont développé des systèmes de défense dont la plupart font intervenir également des protéines qui agissent à différents niveaux selon le mécanisme. Certaines interviennent au niveau de la régulation de la production des FAO comme la superoxyde dismutase, d'autres influent sur la dégradation des FAO comme les catalases ou interviennent dans la réparation des composés oxydés comme les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) [1.4]. Les Msr ont pour rôle de réduire les méthionines (Met) oxydées sous leurs formes méthionines sulfoxydes (MetSO), qu'elles fassent parties des protéines ou libres dans le milieu cellulaire [1.5]. Les méthionines sont des acides aminés sensibles aux FAO, cette sensibilité entraîne des dérèglements au sein des cellules. La présence des Msr conduit à la restauration de l'activité des protéines cibles oxydées et pourrait également avoir un rôle dans la régulation de certains mécanismes. L'oxydation des Met au niveau du soufre de leur chaîne latérale conduit à la formation des deux diastéréoisomères : la Met-*S*-SO et la Met-*R*-SO qui sont réduits respectivement par deux enzymes : la MsrA et la MsrB.

La première partie de ce chapitre traite du phénomène d'oxydation des protéines et de ses conséquences *in vivo*. Ensuite, nous nous attacherons plus particulièrement au rôle des Msr au niveau cellulaire et enfin nous présenterons plus particulièrement les Msr de classe B dans une troisième partie.

1.1 Oxydation des protéines

Dans cette partie, je présenterai une liste non exhaustive d'agents oxydants susceptibles de réagir sur les protéines. Ensuite nous verrons les conséquences de l'oxydation des protéines et je terminerai par une étude du rôle des méthionines dans les phénomènes d'oxydo-réduction.

1.1.1 Formes activées de l'oxygène

Les nombreux états physiologiques des cellules ainsi que l'environnement peuvent conduire à la production de FAO. Il existe 3 familles de FAO, les espèces réactives oxygénées (ROS pour *Reactive Oxygen Species*), les entités nitrées réactives (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*) et les entités halogénées réactives (RHS pour *Reactive Halogen Species*) (tableau 1.1) [1.6].

ROS	RNS	RHS
Radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$	Radical nitrosyle $\text{NO}\cdot$	Acide hypochloreux HOCl
Anion radical superoxyde O_2^-	Anion peroxy-nitrosyle ONOO^-	Acide hypobromeux HOBr
Radical peroxyde $\text{ROO}\cdot$	Cation nitronium NO_2^+	...
Radical Alcoxyle $\text{RO}\cdot$	$\text{O}=\text{NOCO}_2^-$	
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	$\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$	
Oxygène singulet O_2^*	Tétraoxyde d'azote N_2O_4	
Ozone O_3	...	
...		

Tableau 1.1 – Différents FAO présent au sein de la cellule.

Ces familles contiennent plusieurs catégories incluant les radicaux libres, possédant un électron libre non apparié, comme $\cdot\text{OH}$, O_2^- , $\text{ROO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, $\text{RS}\cdot$ ou $\text{RSOO}\cdot$, des dérivés non radicalaires comme H_2O_2 , O_2^* , O_3 , HOCl , ONOO^- , $\text{O}=\text{NOCO}_2^-$, $\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$, N_2O_4 , NO_2^+ ou HCO_4^- [1.7, 1.8] et enfin des dérivés lipidiques et des carbohydrates fortement réactifs [1.6, 1.9]. La concentration de ROS est conditionnée par le taux de certaines vitamines (A, C et E), de certains métabolites (l'acide urique, la bilirubine, ...) et de certains métaux (Mg^{2+} , Mn^{2+} , et Zn^{2+}) qui sont alors capables de piéger ou de faciliter la régénération des métabolites oxydés (figure 1.1, page suivante) [1.10].

Bien que les ROS soient des agents très puissants, ils ont une durée de vie ainsi qu'un rayon d'action très court. Par exemple, le radical $\cdot\text{OH}$ à une durée de vie de 2 ns et un rayon d'action de 2 nm [1.11]. Malgré leur action limitée dans le temps, les dégâts engendrés par les ROS sont nombreux et ont des conséquences variées. Par exemple, l'oxydation du

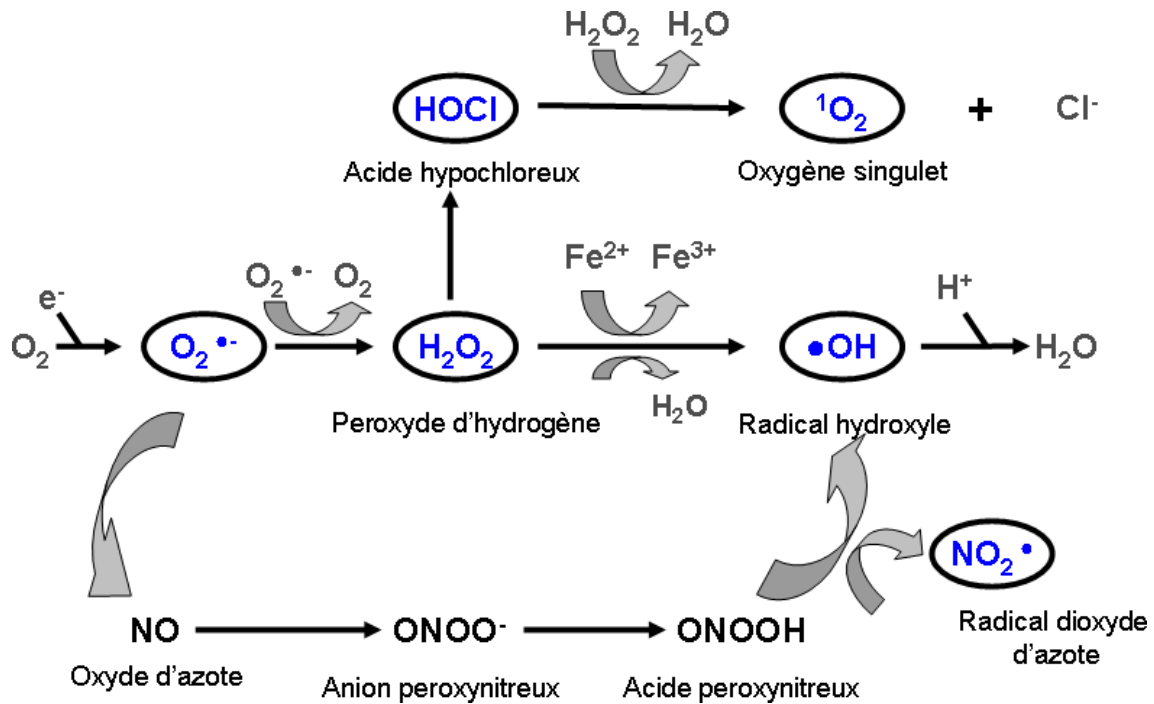


Figure 1.1 – Schéma de formation et de métabolisme des ROS et RNS.

cholestérol entraîne une peroxydation des lipides qui compromettent ainsi l'intégrité de la membrane cellulaire.

1.1.2 Conséquences sur les protéines

L'oxydation de l'ADN et des lipides peut entraîner la mort cellulaire ou une croissance cellulaire anormale. Il en est de même pour les protéines. Ce phénomène contribue au vieillissement et aux maladies dégénératives liées à la vieillesse [1.12]. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux effets des FAO sur les protéines.

1.1.2.1 Cibles des agents oxydants

Les acides aminés présents dans les protéines constituent une des cibles privilégiées pour les agents oxydants. L'attaque du squelette peptidique est initiée par $\bullet\text{OH}$. Il se forme alors plusieurs types de composés réactifs entraînant soit une réticulation du squelette en absence d' O_2 , soit la substitution de l'hydrogène H^α par un groupement hydroxyle (OH) voire même une scission du squelette qui peut se faire en deux endroits distincts (figure 1.2, page suivante) [1.6]. Le clivage du squelette peptidique peut se faire également par l'oxydation des chaînes latérales de certains résidus comme l'acide glutamique,

l'acide aspartique et la proline. Tous les résidus sont susceptibles d'être oxydés, soit par l'intermédiaire du carbone C α soit par leurs chaînes latérales, tout du moins *in vitro* car certaines réactions n'ont pas encore été caractérisées *in vivo*.

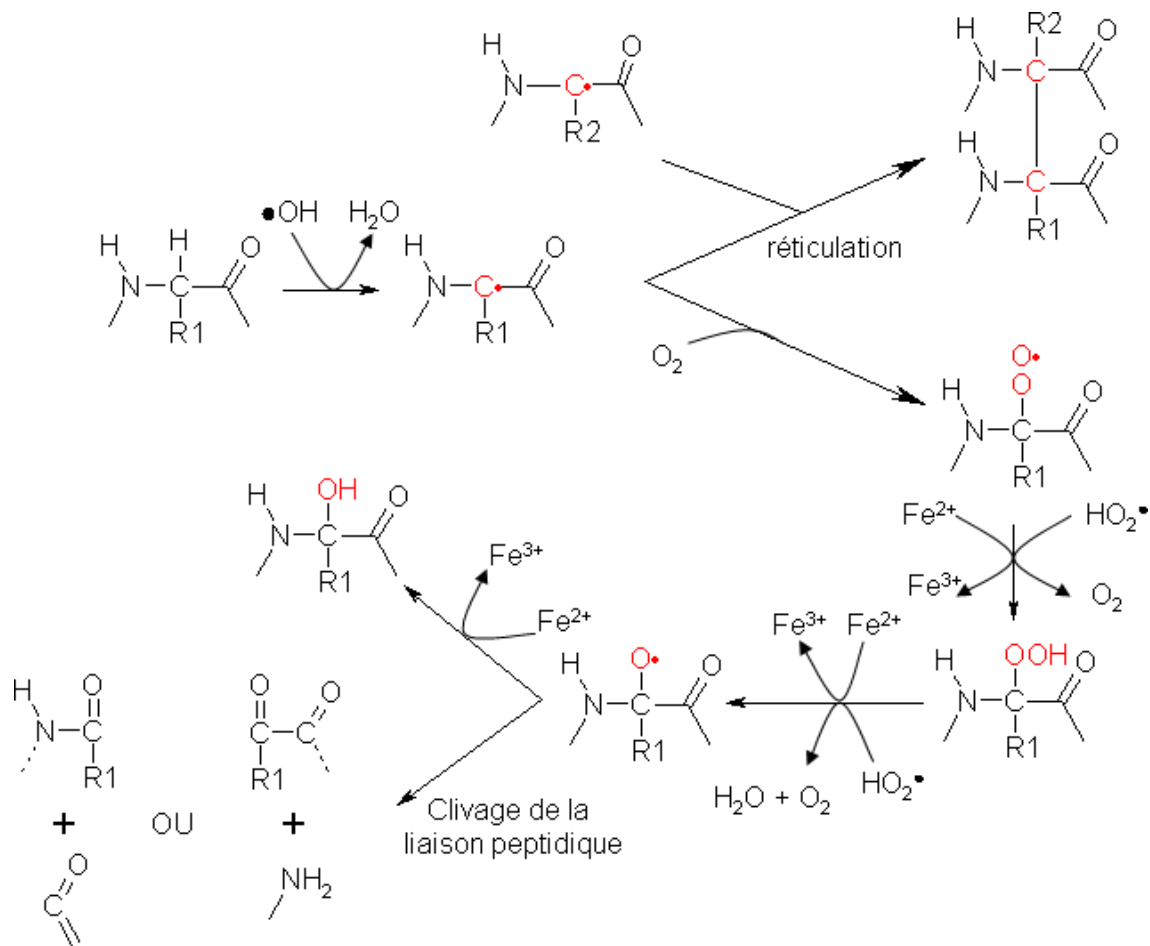


Figure 1.2 – Effets des ROS sur le squelette peptidique.

Les acides aminés contenant un atome de soufre (cystéine et méthionine) sont pratiquement sensibles à tous les ROS. L'oxydation des lysines, arginines, prolines et thréonines peut produire des dérivés carbonés qui ensuite réagissent notamment avec les lipides en entraînant une oxydation de ces derniers. Les résidus peptidiques acides et aromatiques sont aussi des cibles privilégiées pour les ROS provoquent des perturbations dans les cellules. Par exemple, l'oxydation de la chaîne latérale de la tyrosine bloque la possibilité, pour cette dernière, d'être phosphorylée et entraîne de nombreux dérèglements dans la signalisation cellulaire.

1.1.2.2 Oxydation et problèmes physio-pathologiques

D'importants liens sont établis entre le taux d'oxydation des protéines et les phénomènes de vieillissement, le stress oxydatif et plusieurs maladies [1.13–1.22]. La régulation du taux de protéines oxydées dépend de multiples facteurs qui vont de la production de ROS à la dégradation ou à la réparation des protéines. Par conséquent, l'accumulation des protéines oxydées ne dépend pas seulement de la concentration de ROS mais également du mécanisme de réparation de ces protéines. Plusieurs voies biochimiques peuvent aboutir à la production de ROS mais leur capacité à oxyder les protéines est dépendante de leur concentration et du nombre important de facteurs enzymatiques et non enzymatiques ayant une capacité réductrice. Dans un fonctionnement normal, il y a un équilibre entre les agents oxydants et la myriade des facteurs anti-oxydants (figure 1.3, page suivante). De nombreux dérèglements cellulaires sont liés à la concentration instantanée des protéines oxydées. En effet, l'oxydation des protéines entraîne une perturbation du protéasome qui est à l'origine du mécanisme principal de dégradation des protéines [1.13–1.17], et entraîne par conséquent une mauvaise gestion du renouvellement des protéines se traduisant généralement par la mort cellulaire.

De nombreuses études établissent une relation entre l'âge et le taux de protéines oxydées, notamment dans le cerveau humain, le cristallin et les érythrocytes [1.18]. Chez les personnes âgées de 80 ans, le taux de protéines oxydées est estimé 50% supérieur à celui présent chez les jeunes [1.19]. De plus, il a été montré que la sensibilité au stress oxydatif est d'avantage accrue chez les animaux âgés [1.20]. A l'inverse, des recherches expérimentales montrent qu'une surexpression ou une activation des enzymes anti-oxydantes, comme la superoxyde dismutase, augmente l'espérance de vie [1.21]. Cependant, bien que le taux d'oxydation ne joue pas sur le système de l'apoptose, les enzymes anti-oxydantes peuvent améliorer la qualité de vie en réduisant les changements physiologiques relatifs au vieillissement. En effet, il existe de multiples maladies dégénératives liées à l'oxydation des protéines comme la maladie d'Alzheimer [1.22], la maladie de Parkinson ou la cataracte [1.3].

1.1.3 La méthionine

Parmi les acides aminés sensibles à l'oxydation, nous avons vu précédemment que les deux résidus soufrés, que sont la cystéine et la méthionine, sont parmi les plus réactifs au FAO. L'oxydation des cystéines, *in vivo*, entraîne, dans la plupart des cas, la formation de ponts disulfure alors que celle des méthionines entraîne la formation de méthionine sulfoxydes.

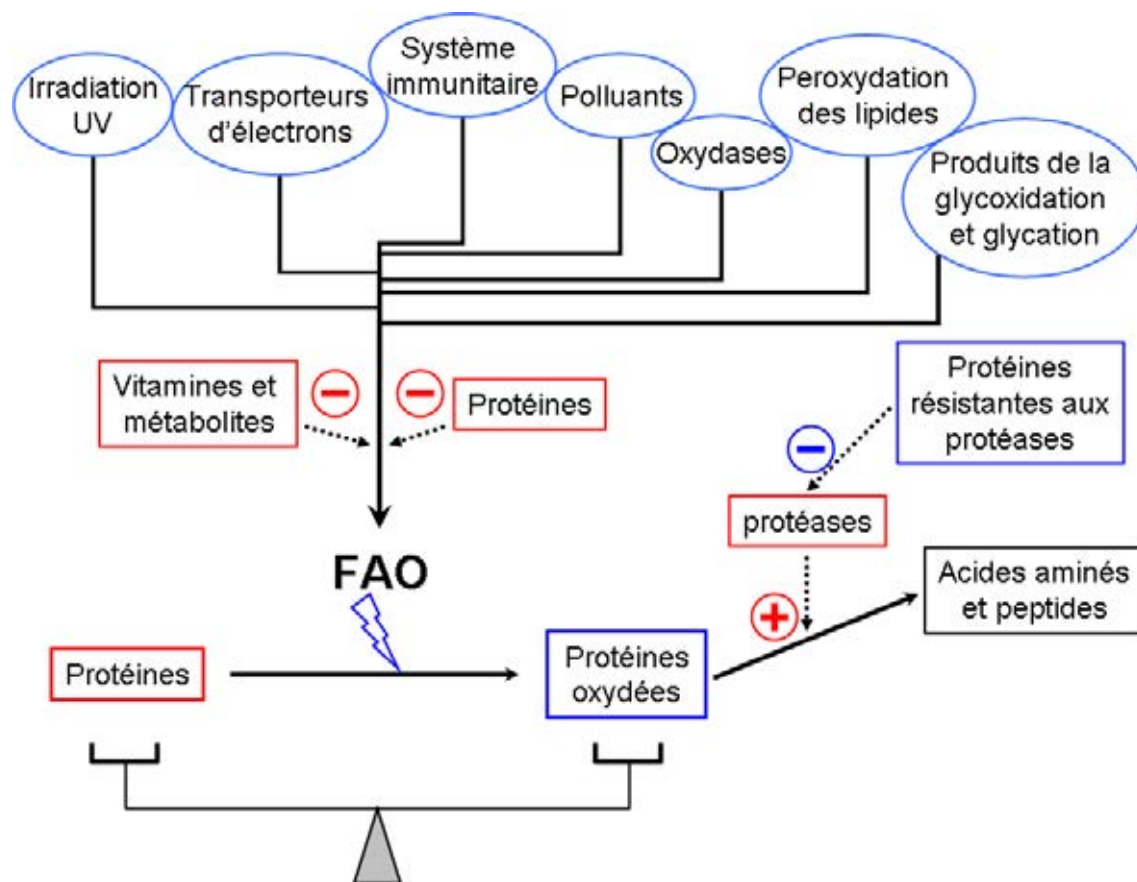


Figure 1.3 – L'accumulation des protéines oxydées est dépendante des agents pro et anti-oxydants et de l'activité protéolytique.

1.1.3.1 Réactivité de la chaîne latérale

Tous les acides aminés peuvent être oxydés, au moins *in vitro*. Mais le phénomène d'oxydation des cystéines et des méthionines est intéressant *in vivo* car cette réaction peut être physiologiquement réversible. L'oxydation de la fonction thiol de la cystéine peut entraîner *a priori* la formation d'un ion sulfénique, d'un disulfide ou d'un ion sulfonique [1.23]. La formation d'un disulfide est probablement la résultante la plus courante de l'oxydation des cystéines. Cette réaction est réversible par l'intervention du glutathion *in vivo* ou du dithiothréitol (DTT) *in vitro*.

D'un point de vue chimique, la méthionine peut être oxydée en MetSO [1.24] et dans certains cas, en présence d'un puissant oxydant, la MetSO peut être oxydée pour former la méthionine sulfone (MetSO₂) (figure 1.4, page ci-contre). Ce phénomène ne se trouverait que dans des conditions patho-physiologiques et expérimentales. Les conséquences de l'oxydation des méthionines sont importantes. En effet, la chaîne latérale d'une méthionine

est plutôt longue, flexible et non polaire alors que la chaîne d'une MetSO est beaucoup plus rigide et polaire [1.25] et son hydrophobicité devient comparable à celle d'une lysine [1.26]. Cependant, cette simple considération ne peut expliquer tous les changements conformationnels induits par l'oxydation des méthionines [1.27].

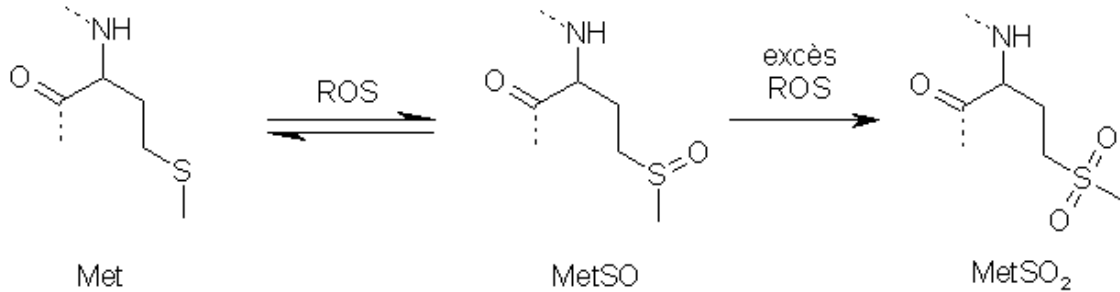


Figure 1.4 – Étapes d'oxydation d'une méthionine.

1.1.3.2 Conséquences et rôle de l'oxydation de la méthionine

De nombreux processus impliquant des ROS ont été décrits. Cependant, l'oxydation des Met en MetSO n'a pu être directement mise en évidence que dans certains cas. Par exemple, les blessures dues à une reperfusion au niveau des tissus cardiaques et du cerveau entraînerait une augmentation de la production de ROS et les dommages cellulaires qui seraient liés à une quantité plus importante de MetSO [1.28]. De plus, la quantification de l'oxydation des méthionines cellulaires a été suggérée comme étant sous-estimée. Ceci est dû à la méthode de détection basée sur une dégradation en milieu acide des acides aminés [1.29].

La réduction/oxydation spécifique des méthionines peut également constituer un mécanisme pour la régulation des protéines [1.30]. Il existe de nombreuses protéines qui présentent des méthionines à leur surface et dont l'oxydation ne semble pas altérer la fonction principale de la protéine. L'hypothèse est que le cycle d'oxydation/réduction de certaines méthionines pourrait constituer un système endogène au sein de la cellule [1.31, 1.32].

Il existe de multiples exemples où l'oxydation d'une ou plusieurs méthionines entraîne une modification de l'activité des protéines. Il a été montré récemment que l'oxydation des méthionines joue un rôle modulateur de l'excitabilité de la cellule. Les cas étudiés sont, par exemple, ceux impliquant le canal potassium potentiel dépendant [1.33, 1.34] et la calmoduline (CaM) [1.27, 1.35–1.39].

L'oxydation de la calmoduline au niveau des méthionines entraîne un changement conformationnel «à longue portée» qui induit une diminution de la stabilité de cette

dernière [1.36]. Dans le cas de la CaM, l'augmentation du taux de MetSO serait liée à l'âge [1.37]. Malgré son oxydation, la CaM se fixe sur la Ca-ATPase mais sur un site au dessus de celui normalement occupé. Cette interaction ne stabilise donc pas la structure du site de fixation qui semble important pour l'activation de l'enzyme Ca-ATPase [1.35, 1.39]. En ce qui concerne le canal potassium, les auteurs ont remarqué que l'oxydation d'une méthionine diminuait la capacité du canal potassium voltage dépendant à revenir à son état inactif, d'où les perturbations neurologiques observées [1.33].

Ces exemples suggèrent que l'oxydation réversible des résidus peut avoir un impact important sur les fonctions des protéines. En considérant que les cellules peuvent augmenter la production de ROS, le postulat est que l'oxydation de ces acides aminés peut être utilisée pour servir d'intermédiaire à la modulation de l'activité de certaines fonctions cellulaires.

Il est devenu évident que la formation de ROS joue un rôle dans le domaine complexe de la transduction du signal [1.40]. Une grande variété de ligands déclenche la production rapide de ROS au niveau des cellules. Il est difficile de savoir si ces déclenchements sont une réponse non spécifique et donc toxique, ou bien un élément important dans le cheminement du signal. Des études ont également montré qu'un blocage de la production des ROS entraîne une inhibition de la régulation de plusieurs voies biochimiques [1.23]. C'est le cas du facteur de croissance des plaquettes dont l'interaction avec les cellules du tissu musculaire lisse est régulée par H_2O_2 [1.41].

1.1.3.3 Réduction chimique des MetSO

La MetSO peut être réduite chimiquement en Met, par différents agents soufrés et/ou non soufrés, bien que les conditions expérimentales utilisées soient souvent drastiques [1.42]. Le DTT peut également être utilisé comme réducteur mais à des concentrations et pour un temps de réaction élevé [1.43]. D'autres agents, tels que le nonachloroditungstate tri potassique ($W_2 Cl_9 K_3$), le dithionate de sodium et le thiosulfate de sodium, ont aussi montré leur capacité à réduire la MetSO [1.24]; le méthylmercapto acétamide est également un réducteur fréquemment utilisé en synthèse peptidique [1.42].

1.2 Les Méthionine Sulfoxyde Réductases

Nous venons de voir que l'oxydation des méthionines a pour conséquence un dérèglement de plusieurs voies biochimiques au sein de la cellule. Afin de se protéger de l'oxydation des méthionines, les cellules ont mis au point différentes techniques. Les petites protéines solubles dans l'acide de type α/β (SASP pour Small Acide Soluble Protein) se

fixent sur l'ADN afin de protéger leurs méthionines des agents oxydants chez les bactéries du genre *Bacillus* [1.44]. En plus de différents mécanismes de protection imaginés par le vivant, il existe également un système de réparation des méthionines sulfoxydes qui fait intervenir des enzymes particulières : les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) [1.45]. L'importance des Msr au niveau cellulaire est confirmée par les études concernant le génome minimal pour la vie cellulaire. En effet, on retrouve le gène *pmsr* (peptide methionine sulfoxyde reductase) au niveau de ce génome bien qu'il ait été assimilé au départ à la famille des protéines chaperonnes [1.46].

Dans la suite, je parlerai des propriétés des différentes Msr, de leur fonction au sein des cellules et du lien qu'elles peuvent avoir sur certaines maladies.

1.2.1 Propriétés et organisation des Msr

Les Msr sont des protéines réduisant les MetSO libres ou incorporées dans une protéine en Met. L'oxydation des Met conduit à un mélange racémique de deux diastéréoisomères : la Met-*R*-SO et la Met-*S*-SO. Ces deux stéréoisomères se caractérisent par la position de l'atome d'oxygène porté par l'atome de soufre (figure 1.5, page suivante). Sharov et Schöneich ont montré que les MsrA ne réduisaient qu'une partie du mélange des deux diastéréoisomères. Une de leur hypothèse était l'existence possible d'une enzyme diastéréospécifique qui puisse former des Met-*R*-SO à partir des Met-*S*-SO [1.47, 1.48]. En 1997, l'équipe de Stadman a émis l'hypothèse de l'existence d'une autre Msr [1.49] lorsqu'ils évoquent la possibilité d'une autre enzyme capable de réduire uniquement les MetSO libres. C'est en 2001, que l'équipe de Barras démontre l'existence d'une autre Msr : dénommée MsrB [1.50]. Ils attribuent à cette MsrB le rôle de réduction des Met-*R*-SO, hypothèse vérifiée par la suite [1.51].

Il est intéressant de noter que dans la plupart des études impliquant un nombre connu de méthionines oxydées, avant la découverte de la MsrB, les auteurs émettaient des hypothèses diverses sur la partielle réduction des méthionines sulfoxydes. Le cas de la CaM est intéressant car en 1999, l'équipe de Sun explique la réduction partielle des méthionines appartenant à la CaM par une réduction d'un nombre minimal de méthionines afin de retrouver l'activité de la CaM ou par le fait que certaines méthionines sulfoxydes ne peuvent être réduites car se trouvant impossible d'accès dans une structure hélicoïdale [1.38].

Les gènes *msrA* et *msrB* se retrouvent dans la plupart des génomes connus [1.52] mais leur organisation est très variable selon les espèces (figure 1.6, page 15). Dans la majorité des cas, les gènes constituent une unité transcriptionnelle à part ; dans d'autres cas, ils

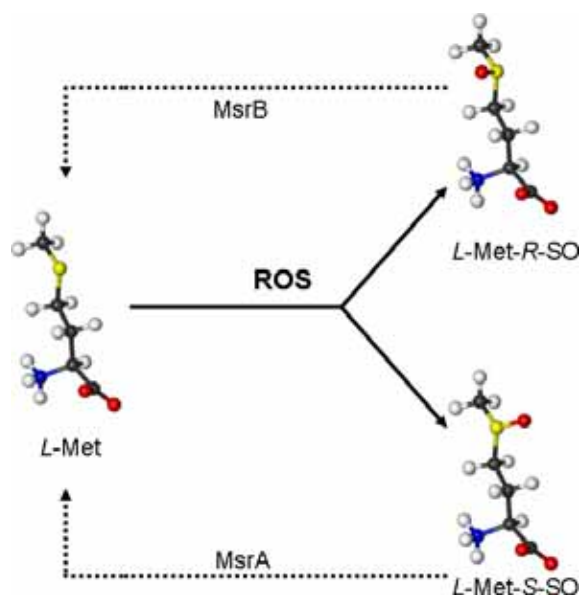


Figure 1.5 – Représentation des deux diastéréoisomères de la MetSO et leur réduction respective par les Msr

se retrouvent sur un opéron. Chez *Staphylococcus aureus*, un des gènes *msrA* est fusionné avec le gène *msrB* [1.53]. Enfin, chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, les deux gènes sont fusionnés et forment chacun un domaine d'une grosse protéine PilB qui comprend également un troisième domaine similaire à une thiorédoxine [1.54]. L'existence de plusieurs gènes *msrB* chez les mammifères contraste avec l'unique présence d'un gène *msrA* alors que dans d'autres systèmes comme celui de la levure, de la drosophile et du nématodes on ne trouve qu'un seul exemplaire de chaque gène. En effet, ont été découverts trois gènes *msrB* différents chez l'homme et la souris et les différentes MsrB se retrouvent dans des compartiments cellulaires spécifiques. Certains auteurs suggèrent que ces différents compartiments cellulaires maintiennent un système de réduction des méthionines sulfoxydes en fonction du type de l'enzyme et de manière stéréospécifique [1.55].

1.2.2 Fonctions des Msr

1.2.2.1 Rôle de défense et de détoxification

Afin d'étudier le rôle des Msr, de nombreuses études se sont portées sur l'expression des gènes *msr*, notamment ceux de la *msrA*, du fait de sa découverte plus ancienne. Il a été montré qu'une surexpression du gène dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que dans des cellules T humaines entraînait une augmentation de la résistance des cellules concernées au stress oxydatif [1.56]. A l'inverse, lorsqu'on soumet à un stress oxydatif

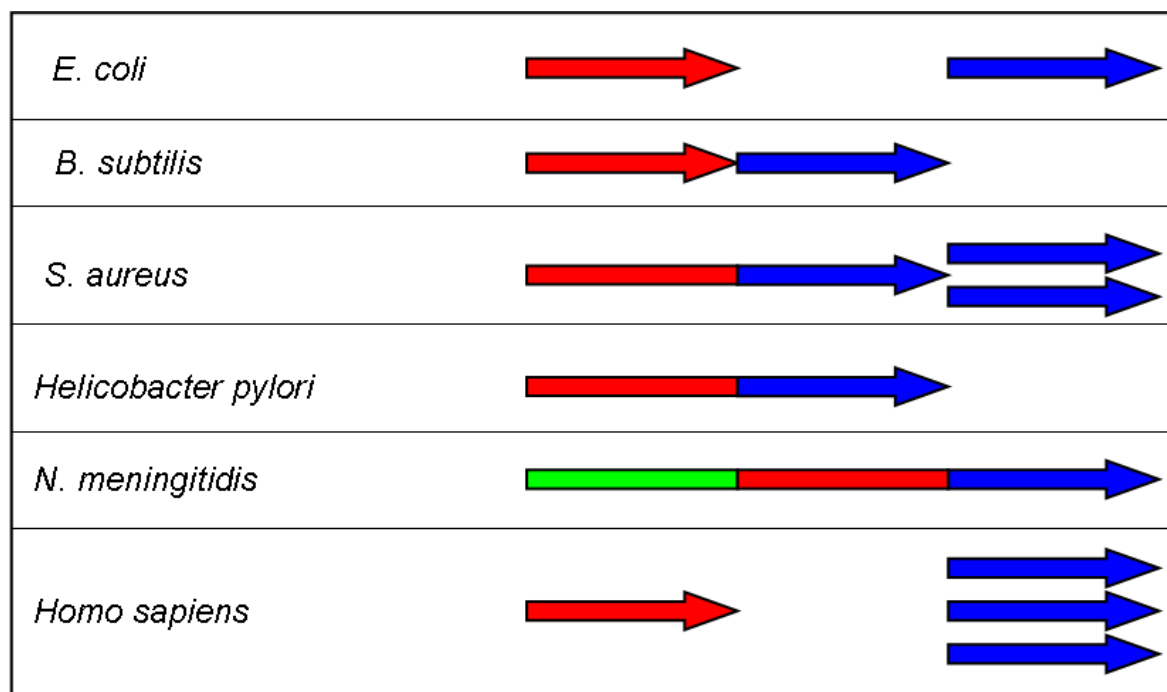


Figure 1.6 – Représentation de diverses organisations génomiques des gènes *msrA* et *msrB*. En rouge et en bleu sont représentés respectivement les gènes *msrA* et *msrB*. En vert est représenté le gène N-terminal de *PilB*, ayant des propriétés réductrices des Msr.

des mutants murins n'exprimant pas le gène *msrA*, on provoque une augmentation de leur sensibilité au stress oxydatif, une diminution de l'espérance de vie, une accumulation de protéines oxydées au niveau des tissus, un schéma de marche atypique et enfin une diminution de leur capacité à réguler positivement l'expression de la thiorédoxine réductase [1.57]. Par contre, il n'y aurait pas de relation directe entre la production de ROS et la transcription du gène *msrA* d'après des études faites sur *Escherichia coli* [1.58].

Comme on l'a vu précédemment dans le paragraphe 1.1.3.2, page 11, la présence de méthionines à la surface de certaines protéines apporte une protection contre le stress oxydant. L'oxydation de ces méthionines n'entraînerait pas de modification de l'activité enzymatique et la présence des Msr permettrait une régénération de ces méthionines [1.31].

1.2.2.2 Régulation des protéines

L'un des premiers articles sur le rôle régulateur de l'oxydation des méthionines est celui de Travis et Salvesen paru en 1983 [1.59]. Les auteurs se posaient la question de la présence d'une méthionine dans le site actif de l' α 1-PI (Protease Inhibitor) alors que la substitution de cette méthionine par une valine rendait le site actif plus stable et

non sensible à l'oxydation. La réponse donnée par les auteurs était qu'il était nécessaire à la cellule de pouvoir contrôler l'activité de ces inhibiteurs de protéases en gardant la possibilité d'inhiber l'activité de l' α 1-PI en oxydant la méthionine. La découverte des Msr a confirmé l'hypothèse d'un système de régulation grâce au phénomène d'oxydo-réduction des méthionines [1.60].

De nombreuses études sur les systèmes de régulation, par oxydation des méthionines, ont été rapportées. L'équipe de Hoshi [1.33, 1.34] a recherché les agents NOS susceptibles d'interagir avec le canal ShC/B potassium voltage-dépendant afin d'identifier les agents anti-oxydants potentiels. Ils ont démontré que le monoxyde d'azote (NO) permettait l'inactivation du canal potassium et que la vitamine C diminuait le temps d'inactivation. La MsrA pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité du canal.

Un autre exemple est celui d'une protéase du virus du VIH-2 qui perd complètement son activité lorsque qu'elle est soumise à un stress oxydatif (présence de H_2O_2) car elle ne peut se dimériser. Son activité est en partie restaurée (40%) en présence de MsrA [1.61]. Cette protéine contient deux Met à l'interface du dimère. Les auteurs suggèrent que la MsrA ne réduit que le stéréoisomère S de la méthionine sulfoxyde, à l'époque la MsrB n'avait pas encore été identifiée. Il semble évident qu'en présence d'un mélange MsrA/MsrB, la protéase aurait retrouvé une activité supérieure à 40%.

Il est intéressant de noter que la flavine mono-oxygénase 3 (FMO3) est la seule enzyme découverte à ce jour et pouvant oxyder, de façon spécifique, les Met en Met-S-SO [1.62]. Il est donc permis de supposer que, si ces enzymes existent, de nombreuses protéines peuvent être régulées en fonction de l'oxydation de leurs méthionines. Une comparaison entre la phosphorylation et l'oxydation est alors possible. En effet, dans un cas, le mécanisme réversible fait intervenir des kinases et des phosphatases [1.63] tandis que dans l'autre cas, il y a intervention des ROS ou de la FMO3 et des Msr.

1.2.3 Conséquences du fonctionnement des Msr

1.2.3.1 Msr et les maladies et le vieillissement

Devant l'importance des Msr dans les processus biochimiques, la question sur les conséquences d'un dérèglement de ces derniers dans l'organisme n'est pas anodine. Plusieurs études ont été menées afin d'apporter quelques réponses.

La relation entre la maladie d'Alzheimer et le stress oxydatif a été mise en évidence depuis plus de vingt ans [1.3] mais c'est en 1999 qu'une relation a été établie entre la MsrA et cette maladie [1.64]. Les auteurs ont mesuré une diminution de l'activité de la MsrA au niveau du cerveau chez les patients atteints de la maladie entraînant ainsi une diminu-

tion des défenses anti-oxydantes et par conséquent, une augmentation de l'oxydation de certaines protéines au niveau des neurones du cerveau.

En surexprimant le gène de la *msrA* chez la drosophile, une autre étude montre une augmentation de l'espérance de vie de 40% sans porter atteinte à l'activité physique avec allongement de la capacité reproductive, si on se réfère aux sauvages [1.65]. A l'inverse, une inactivation du gène *msrA* chez des souris mutantes réduit l'espérance de vie de 40% [1.57].

Enfin une autre étude, mettant en relation l'activité des Msr et le vieillissement, est menée par l'équipe de Friguet qui montre une diminution de l'expression du gène *msrA* dans le foie et le rein mais pas dans le cerveau au début de la vieillesse chez le rat. Par contre, l'activité et le taux de Msr diminue dans ces trois organes à la fin de la vie [1.66].

1.2.3.2 Bactéries pathogènes

Il est intéressant de noter que les Msr seraient également impliquées dans les relations hôtes/agents pathogènes en tant que facteur de virulence [1.67]. En fonction des niches écologiques, les bactéries utilisent les Msr de manières différentes [1.68]. Chez *Erwinia chrysanthemi*, la mutation du gène entraîne une incapacité à infecter la plante [1.69]. En ce qui concerne *Mycoplasma genitalium*, les auteurs démontrent l'importance de MsrA pour le maintien des adhésines et par la même le caractère virulent du pathogène [1.70]. Enfin, pour les agents pathogènes du genre *Neisseria*, une hypothèse sur l'existence d'une protéine PilB, exportée à l'extérieur de la membrane, au niveau du périplasme a été soulevée. L'exportation de la protéine entraînerait une résistance accrue en présence de stress oxydatif notamment pour H_2O_2 [1.71].

1.3 La Méthionine sulfoxyde réductase B

La première protéine MsrB fut découverte en 2001 [1.50]. Depuis, des études ont été menées pour tenter de comprendre le rôle de ces nouvelles protéines et de dégager leurs caractéristiques propres par rapport à celles des MsrA.

1.3.1 Caractérisation des MsrB

1.3.1.1 Identification des MsrB

La MsrB a été identifiée par les travaux sur la protéine YeaA d'*E. coli* qui fut rebaptisée MsrB par la suite [1.50]. Les auteurs ont mis en évidence un domaine supplémentaire

au côté de MsrA, chez certains organismes. Ce domaine, d'environ 150 résidus, était présent dans la plupart des génomes connus. Après avoir exprimé la protéine YeaA, ils ont remarqué que sa présence était importante, chez *E. coli*, vis à vis de la résistance *in vivo* au cadmium induisant un stress oxydatif. L'utilisation conjointe de MsrA et MsrB entraînait une réparation complète des méthionines de la calmoduline. Grimaud et coll. ont alors émis l'hypothèse d'une spécificité de substrat pour les Msr.

Parallèlement, la protéine PilB issue de *N. gonorrhoeae* a été étudiée par l'équipe de Matthews [1.51]. PilB partage une région homologue avec les MsrA mais avec un poids moléculaire (57 kDa) double du poids des autres MsrA. Elle est en fait composée de trois domaines ; un premier domaine N-terminal dont la fonction serait assimilée à une thiorédoxine (Trx) [1.72] ; un domaine intermédiaire qui est homologue à celui d'une MsrA ; un domaine C-terminal qui n'était pas caractérisé à l'époque mais qui présente une forte homologie avec YeaA (MsrB). Les auteurs ont montré que le domaine C-terminal de PilB réduisait spécifiquement les stéréoisomères Met-*R*-SO de la même façon que la protéine YeaA et CBS-1. Cette dernière est une protéine identifiée chez l'homme présentant une forte homologie avec YeaA et PilB [1.73]. Les auteurs ont ainsi déduit la stéréospécificité des Msr.

1.3.1.2 Alignement de séquences

A partir d'un alignement de séquences (figure 1.7, page ci-contre), deux groupes de MsrB ont été identifiés. Ces deux groupes se distinguent par la présence ou non d'un métal. La fixation d'un métal dans un groupe de MsrB (MsrB_I) se caractérise par l'existence de deux motifs *CXXC* dans la séquence primaire. Par contre, pour le deuxième groupe (MsrB_{II}), ces deux motifs ne sont pas présents [1.74]. Les auteurs supposent que le deuxième groupe a perdu sa capacité à fixer un métal au cours de l'évolution.

On remarque également que les MsrB ne possèdent qu'une seule cystéine commune, la cystéine 117 (Cys117) qui fut établie comme étant la cystéine catalytique [1.54]. Nous verrons le mécanisme catalytique par la suite dans le paragraphe 1.3.3, page 22. Pour les mammifères, cette cystéine est remplacée, dans certaines MsrB, par une sélénocystéine qui permet une plus grande efficacité réactionnelle [1.55]. Dans la plupart des cas, à cette cystéine dite catalytique, est associée une deuxième cystéine dite de régénération : la cystéine 63 (Cys63). Cette dernière formerait un pont disulfure, avec Cys117, lui même réductible par la Trx (figure 1.11, page 23). Par contre, pour les MsrB qui ne possèdent pas de Cys63, on observe la présence d'une autre cystéine pouvant jouer le rôle de Cys63 et occupant une autre position variable selon les genres (Cys 31 pour *Xanthomonas campestris*) [1.75].

Quelques séquences de MsrB ne semblent pas posséder de cystéine de régénération. Pour ces dernières, le mécanisme de régénération n'est pas encore expliqué.

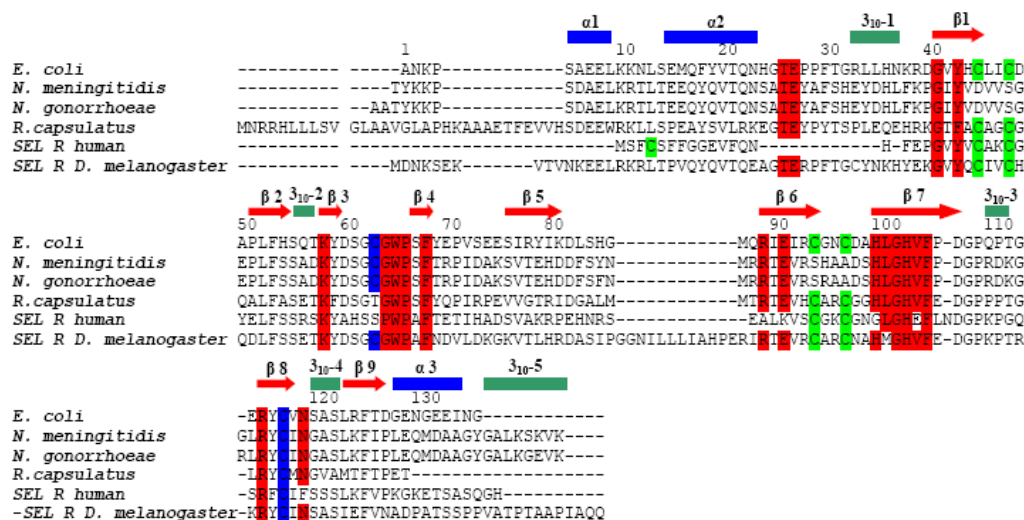


Figure 1.7 – Alignement de séquences de MsrB. Les cystéines connues comme intervenant dans la catalyse et la formation du pont disulfure sont indiquées en bleu, les résidus conservés en rouge et les autres cystéines en vert. Les structures secondaires sont celles issues de la cristallographie de la MsrB de chez *N. gonorrhoeae*.

1.3.2 Études structurales

À l'inverse des MsrA, où de nombreuses études structurales ont été entreprises, que ce soit par diffraction de rayons X (RX) [1.76–1.78] ou par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) [1.79, 1.80], très peu d'études ont été effectuées sur des MsrB. Il existe, à ce jour, une seule structure cristallographique publiée correspondant au domaine C-ter de PilB de *N. gonorrhoeae* [1.51] ainsi que des résultats préliminaires RX pour le domaine C-ter de PilB issue de *N. meningitidis* [1.81]. Une étude RMN préliminaire sur la protéine MsrB de *Bacillus subtilis* a également été reportée [1.82]. Une des premières études structurales concernant les MsrB est celle de Balasubramanian et coll. qui, par des études de dichroïsme circulaire (DC) concluait que la protéine correspondant au gène MG448 de *B. subtilis* et *E. coli*, identifiée par la suite comme étant une MsrB, n'était pas structurée [1.83].

1.3.2.1 Étude RMN

Une étude conformationnelle par RMN de la MsrB de *B. subtilis* a été publiée en 2003 dans laquelle les auteurs ont attribué les raies de résonances des atomes ^1H , ^{15}N et

^{13}C [1.82]. A partir de ces données, ils ont comparé les prédictions de structures secondaires obtenues sur la base des données RMN avec la structure cristallographique concernant le domaine C-ter de PilB de *N. gonorrhoeae* [1.51]. Les résultats de cette comparaison ont montré que les structures de ces deux protéines sont très proches pour une homologie de séquence de 52%. Les auteurs n'ont rien publié de nouveau jusqu'à ce jour et aucune structure tri-dimensionnelle de MsrB déterminée par RMN n'a été publiée.

1.3.2.2 Étude cristallographique

La seule structure RX d'une MsrB disponible à ce jour dans la *Protein Data Bank* (PDB) [1.84] est celle du domaine C-terminal de PilB de *N. gonorrhoeae* avec une résolution de 1,85 Å [1.51]. Une autre étude a été également effectuée chez *N. meningitidis* et qui présente une très forte homologie avec *N. gonorrhoeae* avec 1,8 Å de résolution. Les résultats sont similaires malgré des conditions différentes de cristallisation [1.85]. La structure ne présente aucune homologie avec celles des MsrA (figure 1.8).

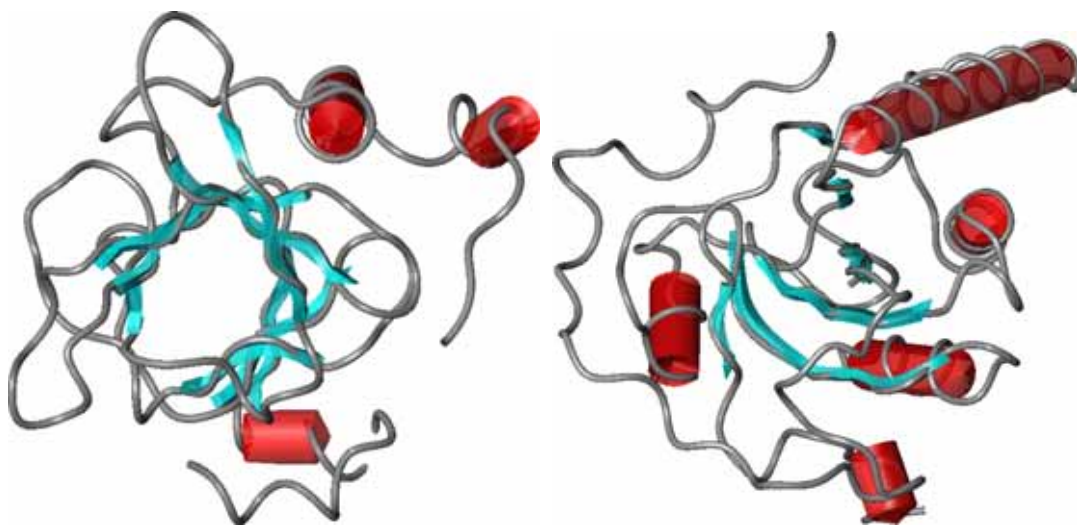


Figure 1.8 – Représentation schématique de la structure de MsrB de *N. gonorrhoeae* (à gauche) [1.51] et de la MsrA de *E. coli* (à droite) [1.76]. Les hélices sont représentées en rouge et les feuillets en bleu.

Elle est composée de trois hélices α et de cinq hélices 3_{10} qui bordent une structure en tonneau de trois (β_1 , β_2 et β_9) et cinq (β_3 à β_8) brins β anti-parallèles twistés. Trois zones conservées au niveau des séquences Ser₆₁-Gly-Cys-Gly-Trp-Pro-Ser₆₇, His₁₀₀-Leu-Gly-His₁₀₃ et Arg₁₁₅-Tyr-Cys-Ile-Asn₁₁₉ contenant les deux cystéines catalytique (Cys₁₁₇) et de régénération (Cys₆₃) forment une poche. Cette poche se trouve exposée au solvant. La Cys₁₁₇ appartient au brin β_8 , une zone rigide, alors que la Cys₆₃ se situe

dans la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ qui semble plus flexible. On peut également noter la présence d'une molécule de cacodylate $C_2H_6O_2As^-$, non liée covalamment, à l'intérieur de cette cavité qui est définie comme le site actif (figure 1.9).

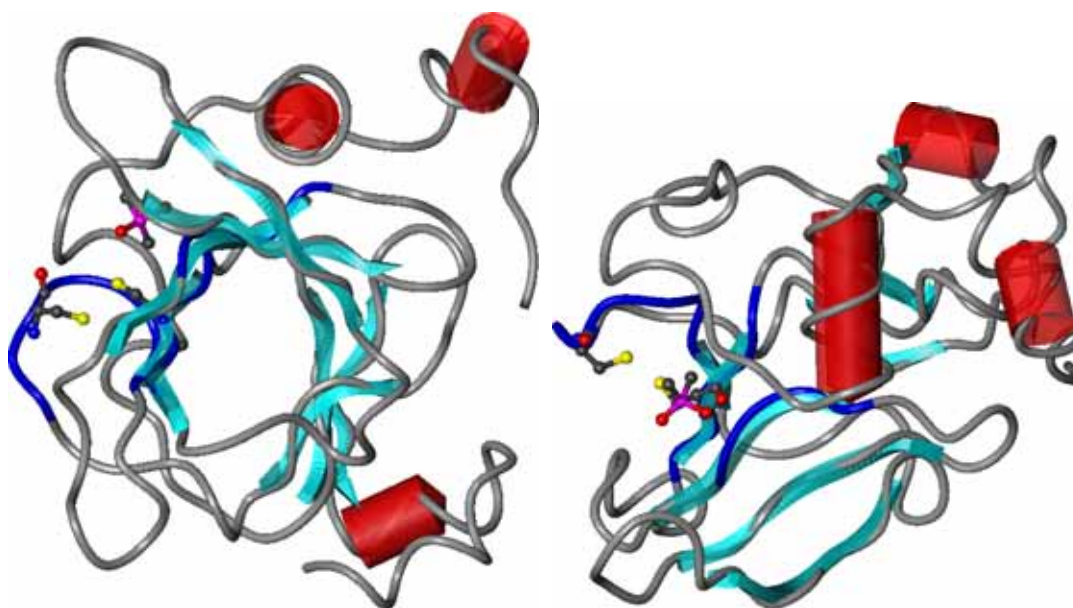


Figure 1.9 – Représentation schématique de la structure tri-dimensionnelle de MsrB de *N. gonorrhoeae* [1.51]. Les chaînes latérales des deux cystéines intervenant dans la catalyse sont représentées ainsi que la molécule de cacodylate qui mimerait le substrat. La figure de droite représente une rotation de la figure de gauche de 90° selon l'axe des x.

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement au site actif et à l'environnement des deux cystéines. Le fait que celui-ci soit exposé au solvant permet une bonne accessibilité au substrat. On peut penser qu'il en est de même pour le pont disulfure Cys117/Cys63 lors de l'approche de la thiorédoxine. On peut noter que les deux atomes de soufre des cystéines sont situés à $3,2 \text{ \AA}$ l'un de l'autre et confirment ainsi la possibilité d'une formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Quand à la molécule de cacodylate, elle pourrait être un bon modèle mimant le substrat. Les auteurs pensent que His 103 et qu'une molécule d'eau présent dans le cristal pourraient interagir avec l'oxygène du sulfoxyde. His 103 serait stabilisée par la présence de l'acide aspartique 82 (Asp82) et la molécule d'eau formerait une liaison hydrogène avec His 100 et Asn 120. La présence du tryptophane 65 (Trp65), proche de la Cys63, permettrait de former une cavité hydrophobe pouvant accueillir le méthyle ($-SC^H_3$) de la méthionine sulfoxyde (figure 1.10, page suivante).

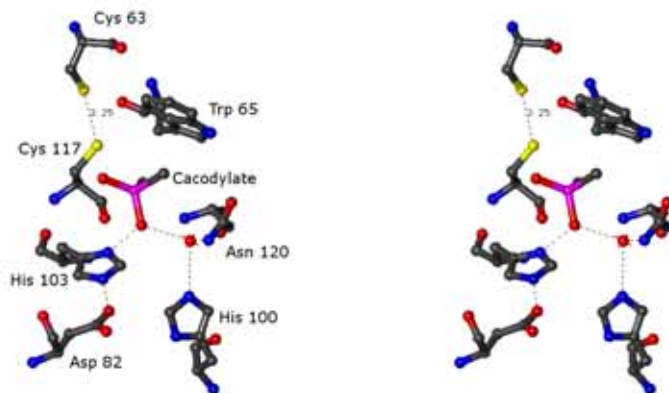


Figure 1.10 – Représentation stéréographique du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* [1.51].

1.3.3 Mécanisme catalytique

1.3.3.1 Les différents étapes du mécanisme

A partir de données biochimiques et de l'analyse de la structure cristallographique, un mécanisme réactionnel a été proposé [1.86]. Il est intéressant de noter que, le mécanisme enzymatique proposé pour les MsrA et MsrB est analogue, malgré le fait que les structures et les résidus impliqués dans la catalyse enzymatique soient différents.

Ce mécanisme est nouveau car il fait intervenir un sulfoxyde. Il s'effectue en trois étapes (figure 1.11, page ci-contre). La première étape passe par la formation d'un intermédiaire acide sulfénique avec un relargage de la méthionine régénérée à partir de son sulfoxyde initial (IA et IB). Cette première étape fait intervenir la cystéine 117 dite catalytique. Ensuite, il y a formation d'au moins un intermédiaire caractérisé par un pont disulfure intramoléculaire (pour les MsrA, la formation d'un deuxième pont disulfure est possible suivant le nombre de cystéines impliquées). Pour la MsrB de *N. meningitidis* c'est l'intervention de la cystéine 63, dite de régénération qui permet la création de ce pont disulfure (II). Enfin, la troisième étape consiste en la réduction du pont disulfure par la thiorédoxine (III) [1.87].

1.3.3.2 Les différents partenaires de la MsrB

Les substrats des Msr sont les méthionines sulfoxydes isolées ou incluses dans les protéines. Il s'avère que pour la MsrB, l'activité catalytique est plus importante lorsque le substrat mime une méthionine sulfoxyde au sein d'une protéine plutôt qu'une méthio-

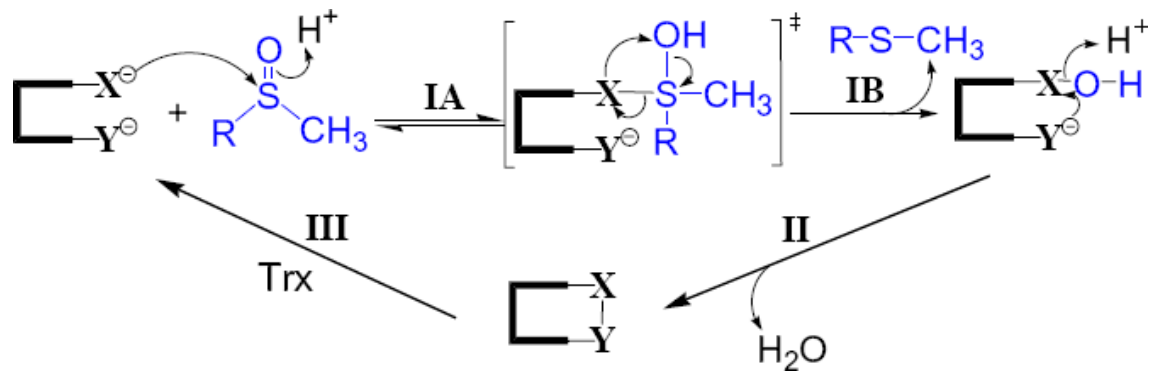


Figure 1.11 – Mécanisme catalytique proposé pour les Msr à deux Cys essentielles (cas des Msr de *N. meningitidis*) [1.54].

nine sulfoxyde seule. Le $k_{cat}/K_{sulfoxyde}$ pour le substrat L-Met-R-SO est 20 fois inférieur que pour le substrat Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, 19 ± 6 contre $380 \pm 60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivement [1.54]. Olry et coll. ont également souligné la stéréospécificité du substrat au niveau du sulfoxyde et que le deuxième diastéréoisomère n'était pas un inhibiteur de l'enzyme. De plus, ils ont montré la faible influence de la configuration du carbone C^α sur l'activité des Msr.

L'autre partenaire des Msr est la Trx qui est impliquée dans l'étape de régénération. L'une des premières conclusions sur l'interaction entre les Msr et la Trx fût établie lors de l'étude du rôle de cette dernière dans l'assemblage des filaments de phages [1.88]. Les auteurs ont montré que des mutants n'exprimant pas la Trx ne peuvent pas croître en présence de méthionine sulfoxyde comme seule source de méthionine. Ils suggèrent donc que la Trx est le seul cofacteur efficace pour les Msr. Des études complémentaires sur la MsrB de *N. meningitidis* ont montré que l'étape de réduction du sulfoxyde était nécessaire à la formation du pont disulfure. D'autre part l'étape de régénération de la Msr par la thiorédoxine constitue l'étape limitante de tout le processus enzymatique, et plus précisément, elle concerne la dissociation entre la MsrB réduite et la Trx oxydée [1.86].

1.4 Conclusion

Les méthionines sont des acides aminés pouvant s'oxyder très facilement en présence de ROS pour former des méthionines sulfoxydes. Cette modification post-traductionnelle peut conduire à une modification de l'activité des protéines portant ces méthionines. Ce changement d'activité peut être induit dans le cadre d'un processus de régulation de ces protéines mais peut également entraîner, s'il n'est pas contrôlé, des désordres physio-

pathologiques. L'existence des Msr pouvant réduire les MetSO en Met permet de réguler plus efficacement l'oxydation des Met par les ROS et de restaurer l'activité physiologique. Il existe deux enzymes pouvant réduire les MetSO en fonction de leur spécificité énantiomérique au niveau du sulfoxyde. La MsrA, découverte en 1981, est à ce jour bien caractérisée alors que la MsrB, découverte en 2001, était, au début de mes travaux de thèse, encore peu étudiée. Nous avons entrepris une étude structurale par RMN de la MsrB de *N. meningitidis* qui constitue le domaine C-terminal de PilB. Au cours de mes travaux, la structure cristallographique de la MsrB de *N. gonorrhoeae*, qui présente 98% d'identité avec celle de *N. meningitidis*, est parue avec une résolution de 1.85 Å. Une étude préliminaire par RMN de la MsrB de *B. subtilis*, qui présente 52% d'identité avec *N. meningitidis*, a également été entreprise sans apporter d'informations structurales supplémentaires. Ayant une structure cristallographique d'une MsrB très proche de celle que nous voulions étudier, nous avons préféré nous orienter vers des études inédites d'interaction de la MsrB avec ses différents partenaires au cours de la réaction catalytique afin de justifier ou d'infirmer les différentes étapes qui sont évoquées lors du mécanisme global proposé. La RMN, après l'étape d'attribution des signaux de résonance des noyaux ^1H , ^{15}N et ^{13}C du squelette peptidique, est un outil idéal pour caractériser les résidus impliqués dans les différentes interactions du processus catalytique.

Bibliographie

- [1] B. Halliwell. Antioxidant defence mechanisms : from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31 :261–72, 1999.
- [2] K. Hensley and R. A. Floyd. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging : A look back, a look ahead. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397 :377–383, 2002.
- [3] H. Schuessler and K. Schilling. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. part 2. bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 45 :267–81, 1984.
- [4] T. Finkel and N. J. Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 :239–47, 2000.
- [5] N. Brot, M. A. Rahman, J. Moskovitz, and H. Weissbach. Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase : cloning, high expression, and purification. *Methods Enzymol*, 251 :462–70, 1995.
- [6] B. S. Berlett and E. R. Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272 :20313–6, 1997.
- [7] G. L. Squadrito and W. A. Pryor. Oxidative chemistry of nitric oxide : the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*, 25 :392–403, 1998.
- [8] G. St John, N. Brot, J. Ruan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, H. Weissbach, and C. Nathan. Peptide methionine sulfoxide reductase from escherichia coli and mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :9901–6, 2001.
- [9] D. E. Richardson, C. A. Regino, H. Yao, and J. V. Johnson. Methionine oxidation by peroxymonocarbonate, a reactive oxygen species formed from co₂/bicarbonate and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 35 :1538–50, 2003.
- [10] J. J. Haddad. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 316 :969–77, 2004.
- [11] R.P. Haugland. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals, Molecular Probes*. Eugene, 1996.
- [12] E. R. Stadtman and B. S. Berlett. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev*, 30 :225–43, 1998.

- [13] B. Friguet, L. I. Szveda, and E. R. Stadtman. Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase modified by 4-hydroxy-2-nonenal and metal-catalyzed oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch Biochem Biophys*, 311 :168–73, 1994.
- [14] T. Grune, T. Reinheckel, M. Joshi, and K. J. Davies. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem*, 270 :2344–51, 1995.
- [15] A. J. Grant, W. Jessup, and R. T. Dean. Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules. *Free Radic Res Commun*, 18 :259–67, 1993.
- [16] G. Suarez, J. D. Etlinger, J. Maturana, and D. Weitman. Fructated protein is more resistant to atp-dependent proteolysis than glucated protein possibly as a result of higher content of maillard fluorophores. *Arch Biochem Biophys*, 321 :209–13, 1995.
- [17] A. J. Rivett. Regulation of intracellular protein turnover : covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Curr Top Cell Regul*, 28 :291–337, 1986.
- [18] E. R. Stadtman and B. S. Berlett. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. Kluwer Academic/Plenum New York, 1997.
- [19] E. R. Stadtman. Protein oxidation and aging. *Science*, 257 :1220–4, 1992.
- [20] B. P. Yu, C. M. Kang, J. S. Han, and D. S. Kim. Can oxidant supplementation slow the aging process? *Biofactors*, 7 :93–101, 1998.
- [21] G. N. Landis and J. Tower. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 126 :365–79, 2005.
- [22] C. Schoneich, D. Pogocki, G. L. Hug, and K. Bobrowski. Free radical reactions of methionine in peptides : mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and alzheimer’s disease. *J Am Chem Soc*, 125 :13700–13, 2003.
- [23] T. Finkel. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*, 476 :52–4, 2000.
- [24] Y. Shechter, Y. Burstein, and A. Patchornik. Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, 14 :4497–503, 1975.
- [25] J. S. Richardson and D. C. Richardson. *Prediction of protein structure and the Principles of Proteins conformation*. Plenum Press, 1989.
- [26] S. D. Black and D. R. Mould. Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Anal Biochem*, 193 :72–82, 1991.

- [27] D. Yin, H. Sun, R. F. Weaver, and T. C. Squier. Nonessential role for methionines in the productive association between calmodulin and the plasma membrane ca-atpase. *Biochemistry*, 38 :13654–60, 1999.
- [28] P. H. Chan. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*, 27 :1124–9, 1996.
- [29] T. C. Squier and D. J. Bigelow. Protein oxydation and age dependent alterations in calcium homeostasis. *Frontiers in bioscience*, 5 :504–526, 2000.
- [30] T. Hoshi and S. Heinemann. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol*, 531 :1–11, 2001.
- [31] R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, and E. R. Stadtman. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 :15036–40, 1996.
- [32] R. L. Levine, B. S. Berlett, J. Moskowitz, L. Mosoni, and E. R. Stadtman. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*, 107 :323–32, 1999.
- [33] M. A. Ciorba, S. H. Heinemann, H. Weissbach, N. Brot, and T. Hoshi. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 :9932–7, 1997.
- [34] M. A. Ciorba, S. H. Heinemann, H. Weissbach, N. Brot, and T. Hoshi. Regulation of voltage-dependent k⁺ channels by methionine oxidation : effect of nitric oxide and vitamin c. *FEBS Lett*, 442 :48–52, 1999.
- [35] Y. Yao, D. Yin, G. S. Jas, K. Kuczer, T. D. Williams, C. Schoneich, and T. C. Squier. Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane ca-atpase. *Biochemistry*, 35 :2767–87, 1996.
- [36] J. Gao, D. H. Yin, Y. Yao, H. Sun, Z. Qin, C. Schoneich, T. D. Williams, and T. C. Squier. Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys J*, 74 :1115–34, 1998.
- [37] J. Gao, D. Yin, Y. Yao, T. D. Williams, and T. C. Squier. Progressive decline in the ability of calmodulin isolated from aged brain to activate the plasma membrane ca-atpase. *Biochemistry*, 37 :9536–48, 1998.
- [38] H. Sun, J. Gao, D. A. Ferrington, H. Biesiada, T. D. Williams, and T. C. Squier. Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane ca-atpase. *Biochemistry*, 38 :105–12, 1999.
- [39] J. Gao, Y. Yao, and T. C. Squier. Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane ca-atpase in a nonproductive and conformationally disordered complex. *Biophys J*, 80 :1791–801, 2001.

- [40] H. Kamata and H. Hirata. Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal*, 11 :1–14, 1999.
- [41] M. Sundaresan, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. Requirement for generation of h₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270 :296–9, 1995.
- [42] R. A. Houghten and C. H. Li. Reduction of sulfoxides in peptides and proteins. *Methods Enzymol*, 91 :549–59, 1983.
- [43] K. P. Polzhofer and K. H. Ney. Über die verwendung von cleland's reagenz für die reduktion von methioninsulfoxid und für die abspaltung von nps- und nim-dnp-schutzgruppen. *Tetrahedron*, 27 :1997–2001, 1971.
- [44] C. S. Hayes, B. Illades-Aguiar, L. Casillas-Martinez, and P. Setlow. In vitro and in vivo oxidation of methionine residues in small, acid-soluble spore proteins from bacillus species. *J Bacteriol*, 180 :2694–700, 1998.
- [45] A. B. Sigalov and L. J. Stern. Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein a-i. *FEBS Lett*, 433 :196–200, 1998.
- [46] A. R. Mushegian and E. V. Koonin. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 :10268–73, 1996.
- [47] V. S. Sharov, D. A. Ferrington, T. C. Squier, and C. Schoneich. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett*, 455 :247–50, 1999.
- [48] V. S. Sharov and C. Schoneich. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic Biol Med*, 29 :986–94, 2000.
- [49] J. Moskovitz, B. S. Berlett, J. M. Poston, and E. R. Stadtman. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 :9585–9, 1997.
- [50] R. Grimaud, B. Ezraty, J. K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P. J. Derrick, and F. Barras. Repair of oxidized proteins. identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem*, 276 :48915–20, 2001.
- [51] W. T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, and B. W. Matthews. The mirrored methionine sulfoxide reductases of neisseria gonorrhoeae pilb. *Nat Struct Biol*, 9 :348–52, 2002.

- [52] G. V. Kryukov, R. A. Kumar, A. Koc, Z. Sun, and V. N. Gladyshev. Selenoprotein r is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 :4245–50, 2002.
- [53] V. K. Singh and J. Moskovitz. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in staphylococcus aureus : expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology*, 149 :2739–47, 2003.
- [54] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaar, and G. Branlant. Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of pilb, a probable virulence factor from neisseria meningitidis. *J Biol Chem*, 277 :12016–22, 2002.
- [55] H. Y. Kim and V. N. Gladyshev. Methionine sulfoxide reduction in mammals : characterization of methionine-r-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell*, 15 :1055–64, 2004.
- [56] J. Moskovitz, E. Flescher, B. S. Berlett, J. Azare, J. M. Poston, and E. R. Stadtman. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in saccharomyces cerevisiae and human t cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 :14071–5, 1998.
- [57] J. Moskovitz, S. Bar-Noy, W. M. Williams, J. Requena, B. S. Berlett, and E. R. Stadtman. Methionine sulfoxide reductase (msra) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :12920–5, 2001.
- [58] J. Moskovitz, M. A. Rahman, J. Strassman, S. O. Yancey, S. R. Kushner, N. Brot, and H. Weissbach. Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene : regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol*, 177 :502–7, 1995.
- [59] J. Travis and G. S. Salvesen. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*, 52 :655–709, 1983.
- [60] W. Vogt. Oxidation of methionyl residues in proteins : tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med*, 18 :93–105, 1995.
- [61] D. A. Davis, F. M. Newcomb, J. Moskovitz, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, J. Kaufman, H. M. Fales, R. L. Levine, and R. Yarchoan. Hiv-2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulphoxide reductase. *Biochem J*, 346 :305–11, 2000.
- [62] S. L. Ripp, K. Itagaki, R. M. Philpot, and A. A. Elfarra. Methionine s-oxidation in human and rabbit liver microsomes : evidence for a high-affinity methionine s-oxidase

- activity that is distinct from flavin-containing monooxygenase 3. *Arch Biochem Biophys*, 367 :322–32, 1999.
- [63] Eric Klann and Edda Thiels. Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species : Implications for hippocampal synaptic plasticity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 23 :359–376, 1999.
- [64] S. P. Gabbita, M. Y. Aksenov, M. A. Lovell, and W. R. Markesbery. Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in alzheimer’s disease brain. *J Neurochem*, 73 :1660–6, 1999.
- [65] H. Ruan, X. D. Tang, M. L. Chen, M. L. Joiner, G. Sun, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann, L. Iverson, C. F. Wu, T. Hoshi, and M. A. Joiner. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 :2748–53, 2002.
- [66] I. Petropoulos, J. Mary, M. Perichon, and B. Friguet. 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, 2001.
- [67] T. M. Wizemann, J. Moskovitz, B. J. Pearce, D. Cundell, C. G. Arvidson, M. So, H. Weissbach, N. Brot, and H. R. Masure. Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 :7985–90, 1996.
- [68] B. Ezraty, L. Aussel, and F. Barras. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1703 :221–9, 2005.
- [69] M. E. Hassouni, J. P. Chambost, D. Expert, F. Van Gijsegem, and F. Barras. The minimal gene set member msra, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen erwinia chrysanthemi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 :887–92, 1999.
- [70] S. Dhandayuthapani, M. W. Blaylock, C. M. Bebear, W. G. Rasmussen, and J. B. Baseman. Peptide methionine sulfoxide reductase (msra) is a virulence determinant in mycoplasma genitalium. *J Bacteriol*, 183 :5645–50, 2001.
- [71] E. P. Skaar, D. M. Tobiason, J. Quick, R. C. Judd, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, and H. S. Seifert. 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. Epub 2002 Jul 2., 2002.
- [72] J. Wu, F. Neiers, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. 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, 2005.

- [73] W. Huang, J. Escribano, M. Sarfarazi, and M. Coca-Prados. Identification, expression and chromosome localization of a human gene encoding a novel protein with similarity to the pilb family of transcriptional factors (pilin) and to bacterial peptide methionine sulfoxide reductases. *Gene*, 233 :233–40, 1999.
- [74] R. A. Kumar, A. Koc, R. L. Cerny, and V. N. Gladyshev. Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in drosophila methionine-r-sulfoxide reductase. *J Biol Chem*, 277 :37527–35, 2002.
- [75] F. Neiers, A. Kriznik, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. Evidence for a new subclass of methionine sulfoxide reductases b with an alternative thioredoxin recognition signature. *J Biol Chem*, 279 :42462–8, 2004.
- [76] F. Tete-Favier, D. Cobessi, S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, and A. Aubry. Crystal structure of the escherichia coli peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 a resolution. *Structure Fold Des*, 8 :1167–78, 2000.
- [77] W. T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, and B. W. Matthews. Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry*, 39 :13307–12, 2000.
- [78] A. B. Taylor, Jr. Benglis, D. M., S. Dhandayuthapani, and P. J. Hart. Structure of mycobacterium tuberculosis methionine sulfoxide reductase a in complex with protein-bound methionine. *J Bacteriol*, 185 :4119–26, 2003.
- [79] S. Beraud, B. Bersch, B. Brutscher, P. Gans, F. Barras, and M. Blackledge. Direct structure determination using residual dipolar couplings : reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution. *J Am Chem Soc*, 124 :13709–15, 2002.
- [80] N. Coudevylle, A. Thureau, S. Azza, S. Boshi-Muller, G. Branlant, and M. T. Cung. Letter to the editor : (1)h, (13)c and (15)n resonance assignment of the reduced form of methionine sulfoxide reductase a from escherichia coli. *J Biomol NMR*, 30 :363–4, 2005.
- [81] B. Kauffmann, F. Favier, A. Olry, S. Boschi-Muller, P. Carpentier, G. Branlant, and A. Aubry. Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase b domain of neisseria meningitidis pilb. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58 :1467–9, 2002.
- [82] D. Zheng, J. R. Cort, Y. Chiang, T. Acton, M. A. Kennedy, and G. T. Montelione. 1h, 13c and 15n resonance assignments for methionine sulfoxide reductase b from bacillus subtilis. *J Biomol NMR*, 27 :183–4, 2003.

- [83] S. Balasubramanian, T. Schneider, M. Gerstein, and L. Regan. Proteomics of mycoplasma genitalium : identification and characterization of unannotated and atypical proteins in a small model genome. *Nucleic Acids Res*, 28 :3075–82, 2000.
- [84] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Res*, 28 :235–42, 2000.
- [85] B. Kauffmann, A. Aubry, and F. Favier. The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases : current knowledge and open questions. *Biochim Biophys Acta*, 1703 :249–60, 2005.
- [86] A. Olry, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase b from neisseria meningitidis. *Biochemistry*, 43 :11616–22, 2004.
- [87] S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselear, and G. Branlant. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from escherichia coli. *J Biol Chem*, 275 :35908–13, 2000.
- [88] M. Russel and P. Model. The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins. *J Biol Chem*, 261 :14997–5005, 1986.

Chapitre 2

Étude des protéines par RMN

Sommaire

2.1	RMN des protéines	37
2.1.1	Introduction à la RMN	37
2.1.1.1	Spins nucléaires	37
2.1.1.2	Phénomène de résonance	38
2.1.2	Avancées technologiques	39
2.1.2.1	L'instrumentation	39
2.1.2.2	Introduction de la séquence TROSY	40
2.1.2.3	Importance de la biochimie	41
2.2	Processus d'études d'une protéine	44
2.2.1	Production de l'échantillon	44
2.2.1.1	Techniques d'expression	45
2.2.1.2	Préparation de l'échantillon	46
2.2.2	Attribution des raies de résonance du squelette peptidique	47
2.2.2.1	Attribution séquentielle	48
2.2.2.2	Prédictions des structures secondaires	50
2.2.3	Études supplémentaires	51
2.2.3.1	Études structurales	51
2.2.3.2	Études de dynamique	54
2.3	Études des interactions	57
2.3.1	Phénomènes d'échanges	58
2.3.1.1	Études cinétique et thermodynamique des phénomènes d'interaction	58
2.3.1.2	L'échange chimique rapide	59

2.3.1.3	L'échange chimique lent et intermédiaire	60
2.3.2	Détermination des interfaces d'interaction	62
2.3.2.1	Cartographie de la perturbation des déplacements chimiques	63
2.3.2.2	Transfert d'aimantation	64
2.3.2.3	Cartographie par mesure de dynamique moléculaire	64
2.3.2.4	Échange des protons amidiques	66
2.3.3	Détermination de contraintes géométriques	66
2.3.3.1	Expériences NOESY filtrées	67
2.3.3.2	Les sondes paramagnétiques	68
2.3.3.3	Utilisation des constantes de couplage dipolaire	70
2.3.3.4	L'approche par arrimage	70
2.4	Conclusion	71
	Bibliographie	73

Les protéines sont l'un des premiers constituants des organismes vivants et des virus. Elles sont les principales molécules étudiées en biologie et sont, la plupart du temps, décrites comme étant la machinerie des cellules. Du point de vue biochimique, les protéines sont des polymères composés de différents acides aminés formant ainsi une chaîne polypeptidique. Dans le règne supérieur, il existe vingt acides aminés différents auxquels viennent se greffer des acides aminés plus rares comme la sélénocystéine. Les acides aminés d'une chaîne polypeptidique s'organisent pour former une structure tridimensionnelle considérée comme l'état natif de la protéine. Il existe quatre niveaux de structure pour les protéines :

- *la structure primaire* : elle constitue la séquence en acides aminés de la chaîne polypeptidique. Les acides aminés sont reliés entre eux par la liaison peptidique.
- *la structure secondaire* : ces structures se forment à partir des liaisons hydrogène entre les atomes H^N et CO du squelette peptidique. Les deux entités les plus importantes sont les hélices α et les feuillets β .
- *la structure tertiaire* (ou structure tridimensionnelle) : ce sont les structures stabilisées principalement par des interactions à longue distance squelette-squelette et entre certaines chaînes latérales des résidus constituant la protéine et le squelette peptidique ; c'est l'association des structures secondaires de la protéine.
- *la structure quaternaire* : C'est l'association stable de multiples chaînes polypeptides produisant une unité active. Les protéines ne présentent pas toutes une structure quaternaire. Généralement, chaque polypeptide à l'intérieur d'une protéine possédant plusieurs domaines se plie plus ou moins indépendamment au sein d'une structure tertiaire stable et les domaines repliés s'associent alors entre elles pour former la structure finale.

La spectroscopie de RMN est la principale technique disponible pour l'étude des protéines au niveau atomique et en solution. Si l'on considère que la plupart des fluides corporels comme le sang, le milieu extra et intracellulaire, la salive, . . . sont des solutions de protéines où elles exercent leurs fonctions biologiques, la connaissance du comportement de ces protéines en milieu liquide est très importante. Au niveau des expériences RMN, il est possible de modifier les conditions expérimentales comme le pH, la concentration en sel, la température afin de mimer au mieux le milieu où fonctionne la protéine tout en obtenant une bonne qualité spectrale. En modifiant la composition du milieu, il est également possible d'étudier le processus de dénaturation renaturation des protéines. Une des premières applications de la spectroscopie de RMN dans des protéines fut la détermination de leur structure, mais il est également possible d'étudier leur comportement

dynamique ainsi que certains aspects structuraux, thermodynamiques et cinétiques en fonction de l'environnement : solvant, présence d'autres macromolécules et de ligands.

En général, la fonction biologique des protéines dépend de leur interaction avec d'autres molécules. Les interactions des hormones avec leurs récepteurs qui entraînent une cascade de réactions, l'interaction des protéines avec l'ADN afin de réguler la réplication, la transcription et la traduction des gènes ou encore les interactions antigènes/anticorps sont des exemples parmi tant d'autres qui prouvent le rôle indispensable de la reconnaissance protéique dans le fonctionnement des cellules. Récemment, de nouvelles techniques RMN ont vu le jour et permettent de mieux comprendre les processus de reconnaissance protéique au niveau moléculaire. En théorie, la plupart des paramètres expérimentaux issus de la RMN peuvent apporter une information au niveau de la nature de l'interaction. Expérimentalement, seuls quelques paramètres sont obtenus facilement et à un degré de sensibilité élevé. Ainsi, les valeurs du déplacement chimique, les temps de relaxation, les nOe , les transferts de saturation, ... sont des paramètres permettant de caractériser l'interface d'interaction d'une protéine avec un ligand, lui-même étant soit une petite molécule ou une autre macromolécule.

Dans ce chapitre, nous nous attarderons dans un premier temps aux avancées technologiques qui ont permis l'étude des protéines par RMN. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'étude d'une protéine par RMN et enfin, dans un troisième temps, nous nous focaliserons plus particulièrement sur certaines méthodes permettant l'étude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand par RMN.

2.1 RMN des protéines

Cette partie n'a pas pour objet d'aborder la RMN sous l'angle de la théorie, il existe de nombreuses revues sur ce sujet [2.1–2.3], mais d'informer les personnes non «spécialistes» à la RMN pour comprendre les expériences décrites par la suite dans ce manuscrit.

2.1.1 Introduction à la RMN

2.1.1.1 Spins nucléaires

La RMN repose sur l'analyse des propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Les noyaux des atomes engendrent l'existence d'un moment cinétique propre au noyau et appelé spin. Le spin (I) peut prendre les valeurs 0, 1/2, 1, 3/2, et ainsi de suite ($I = 0$ signifie qu'il n'y a pas de spin). Cette quantification du spin implique celle du moment magnétique μ qui lui est associé ($\mu = \alpha I$). En effet, le fait d'avoir un spin non nul confère aux particules les propriétés d'un dipôle magnétique (ou aimant). Une particule de spin 1/2 soumise à un champ magnétique intense (B_0) possède un moment magnétique qui peut prendre deux orientations, l'une dans le même sens que le champ, et l'autre dans le sens opposé (figure 2.1). Les noyaux ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F ou ^{31}P ont une valeur de spin égale à $\pm 1/2$ soit deux états de spin : $+1/2$ et $-1/2$. Pour un spin égal à 1, tel que celui du deutérium ^2H ou du lithium ^6Li , il existe trois orientations possibles : -1 , 0 et $+1$ [2.2]. Plus généralement, il y a $2I + 1$ orientations pour un spin.

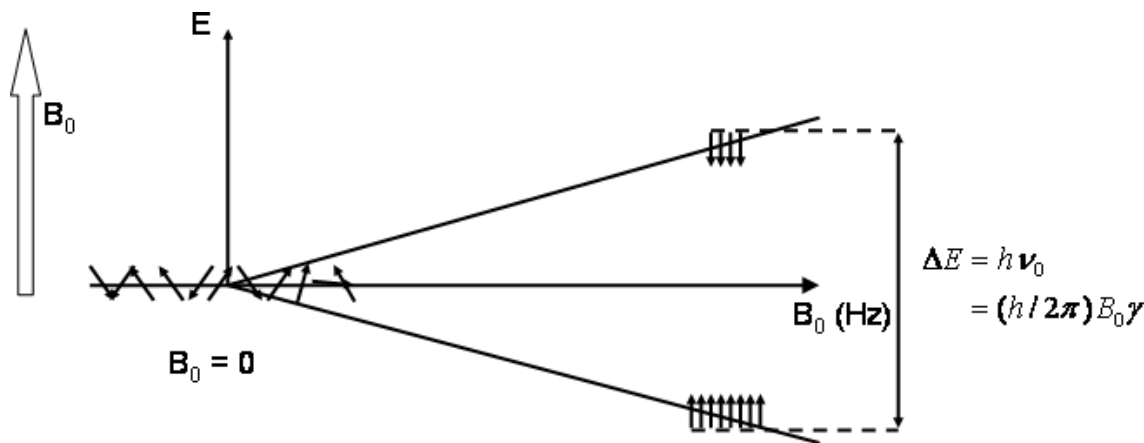


Figure 2.1 – Principe de la séparation des niveaux d'énergie en RMN. Le rapport des populations (parallèle et anti-parallèle) n'est pas représentatif de la réalité : le rapport est beaucoup plus faible.

Lorsque l'échantillon est soumis à un champ magnétique, à chacune de ces orientations correspond un niveau d'énergie. Pour le proton, dont le nombre de spin vaut 1/2, il existe

deux niveaux d'énergie, avec un léger excès de population sur le niveau d'énergie le plus stable. Ce sont les transitions entre ces niveaux qui constituent le phénomène de résonance magnétique nucléaire [2.2].

2.1.1.2 Phénomène de résonance

Pour observer un signal, il faut rompre l'équilibre entre les deux niveaux d'énergie en peuplant davantage le niveau supérieur. L'échantillon doit alors être soumis à un deuxième champ magnétique, produit par une source de radiation électromagnétique, appelée impulsion, perpendiculaire au premier champ B_0 produit par l'aimant. L'aimantation globale sera transférée dans le plan x, y , perpendiculaire à l'axe z et donc au champ B_0 . Dès que l'impulsion est terminée, le moment magnétique précesse autour de B_0 et l'aimantation globale induit un courant électrique dans une bobine réceptrice. L'aimantation globale M revient alors à sa position initiale par un phénomène de relaxation (figure 2.2) [2.1].

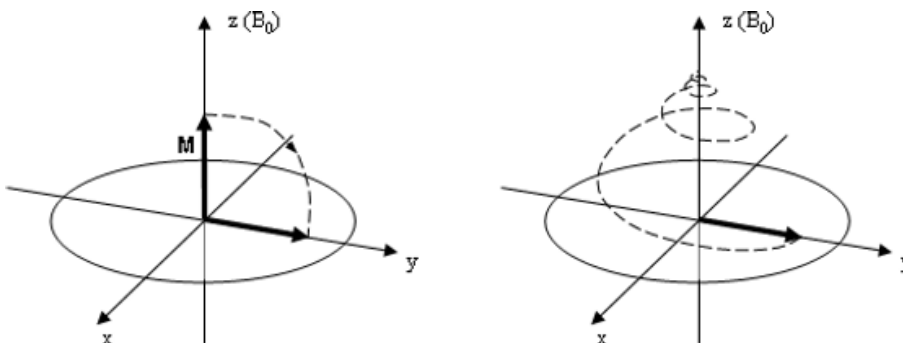


Figure 2.2 – Impulsion $\frac{\pi}{2}$ pour transférer l'aimantation suivant les axes x et y puis retour à l'équilibre du moment magnétique par rotation de l'aimantation autour de l'axe z parallèle à B_0 .

C'est pendant cette période de retour à l'équilibre que les données sont enregistrées par le spectromètre RMN. Les noyaux de la protéine vont «résonner» à différentes fréquences (dites fréquences de Larmor) dépendant, entre autres, de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Le signal enregistré est appelé interférogramme (ou FID) qui est représenté par une sinusoïde amortie en fonction du temps. Ces signaux contiennent un grand nombre d'informations qui sont difficiles à interpréter dans l'espace temps. Une transformée de Fourier est appliquée sur l'interférogramme qui permet d'obtenir un spectre RMN, qui est fonction de la fréquence (figure 2.3, page suivante). Chaque noyau a une fréquence propre qui est différente selon le type de noyau (^1H , ^{13}C , ^{15}N) et qui varie légèrement en fonction de son environnement. C'est cette fréquence spécifique qui va permettre de travailler sur différents noyaux au sein de la protéine et de les attribuer spécifiquement par RMN.

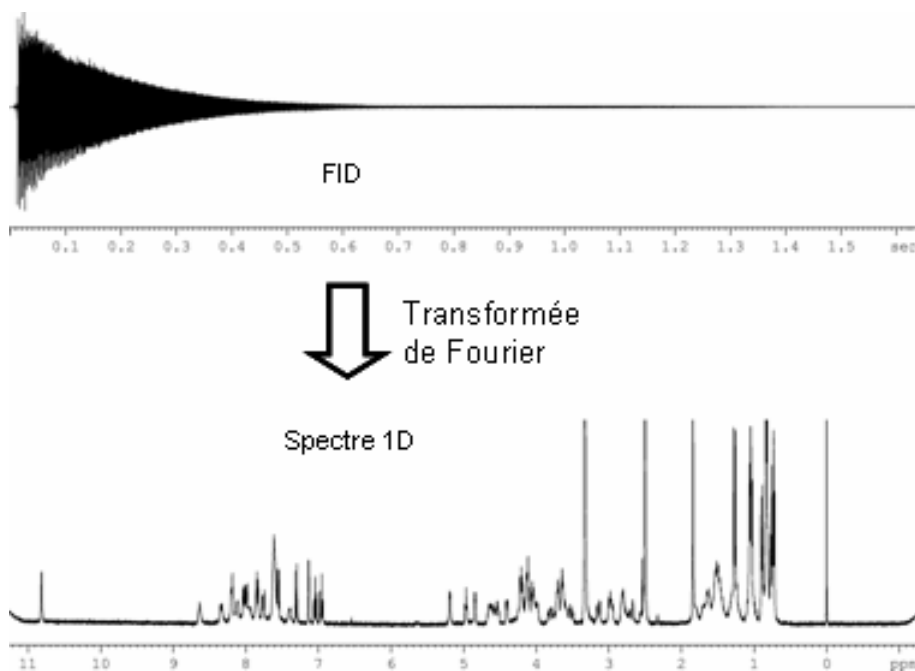


Figure 2.3 – Interférogramme (espace temps) et spectre 1D RMN (espace fréquence) d'un peptide de 14 résidus.

2.1.2 Avancées technologiques

Un nombre impressionnant d'avancées dans le domaine de la RMN a vu le jour durant ces dernières années. De nouvelles instrumentations, des expériences sophistiquées ainsi que des méthodes de marquage, de production et de purification de macromolécules ont toutes joué un rôle important dans l'établissement de la RMN comme une technique moderne et indispensable pour l'étude des protéines au niveau atomique.

2.1.2.1 L'instrumentation

La puissance des aimants a augmenté considérablement ces dernières années passant de 2.1 Tesla en 1962 (équivalent à une fréquence en ^1H de 90 MHz) à 21 Tesla en 2002 (équivalent à une fréquence en ^1H de 900 MHz). Les premiers 1 GHz (^1H) sont prévus courant 2006. Cette course aux hautes fréquences (aux hauts champs) s'explique par le fait qu'une augmentation du champ revient à accroître de façon linéaire, la résolution et la sensibilité d'un puissance $3/2$ [2.3]. Un spectre issu d'un spectromètre 600 MHz est donc deux fois mieux résolu et 2,8 fois plus sensible que le même spectre enregistré avec un spectromètre 300 MHz. Une meilleure résolution va permettre d'éviter les recouvrements de certains pics proches au niveau des spectres RMN. Des études à des concentrations

plus faibles sont rendues possibles par l'augmentation de la sensibilité. L'augmentation du champ facilite l'interprétation des résultats mais participe aussi à la mise au point d'expériences RMN qui nécessitent une sensibilité accrue du spectromètre.

Une autre avancée considérable dans le domaine de l'équipement est l'apparition de la Cryosonde (Bruker) ou de la Cold Probe (Varian). Les sondes ainsi que les pré-amplificateurs sont plongés dans un bain d'hélium permettant de diminuer le bruit électronique et ainsi d'augmenter la sensibilité d'un facteur 3 à 4 suivant le type d'échantillon. Par cette technique, l'étude des protéines à des concentrations de l'ordre de 200 μM est rendue possible. Par contre, la salinité de l'échantillon ne doit pas être très élevée [2.4] et on ne doit pas appliquer des puissances trop importantes pour les impulsions.

Ces deux avancées que sont les champs magnétiques de plus en plus élevés et les sondes cryogéniques permettent d'enregistrer des spectres RMN à des concentrations en protéines de plus en plus faibles mais également de raccourcir les temps d'acquisition. Un des problèmes majeurs reste l'étude des protéines de grandes tailles qui, malgré ces avancées, ne peut être complètement résolue.

2.1.2.2 Introduction de la séquence TROSY

La relaxation transversale des protéines (T_2 ou R_2) a un impact majeur sur la taille limite autorisant l'étude d'une protéine par spectroscopie RMN. Cette relaxation est due aux interactions dipôle-dipôle (DD) et à l'anisotropie de déplacement chimique (CSA pour *Chemical Shift Anisotropy*). Plus la taille de la protéine augmente, plus la vitesse de relaxation diminue. La conséquence de cette diminution de la vitesse est une augmentation de la largeur des raies de résonance qui se traduit au niveau des spectres par une disparition des pics de corrélation.

La séquence TROSY (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*) a été développée dans le but de réduire la relaxation transversale. A l'inverse de la séquence HSQC dont le signal est issu de l'irradiation du multiplet résultant du couplage scalaire entre deux spins 1/2 et qui cumule les largeurs de raies maximales des deux noyaux observés, la séquence TROSY ne sélectionne que la raie relaxant la plus lentement et donc la plus fine (figure 2.4, page ci-contre) [2.5]. La conséquence directe de l'utilisation de cette séquence est une augmentation de la résolution et de la sensibilité lorsqu'on opère avec des spectromètres à très haut champ dans le cas des grosses protéines. La séquence TROSY est maintenant incorporée dans la plupart des expériences nécessaires pour l'étude des protéines [2.6–2.13]. En effet, la majorité des expériences mises en œuvre pour l'attribution séquentielle du squelette peptidique utilise le transfert d'aimantation entre ^1H et ^{15}N . Il suffit donc d'introduire la séquence TROSY dans les programmes d'impulsions à la place

de la séquence INEPT utilisée dans le cas de la séquence HSQC et de les optimiser pour l'étude de grosses molécules. Il faut tout de même noter que le gain de sensibilité n'est pas systématique. Pour les protéines de petites tailles et à des champs magnétiques moyens (500 et 600 MHz), la sélection d'une seule raie de résonance implique une diminution de l'intensité par 2 en comparaison de l'approche HSQC.

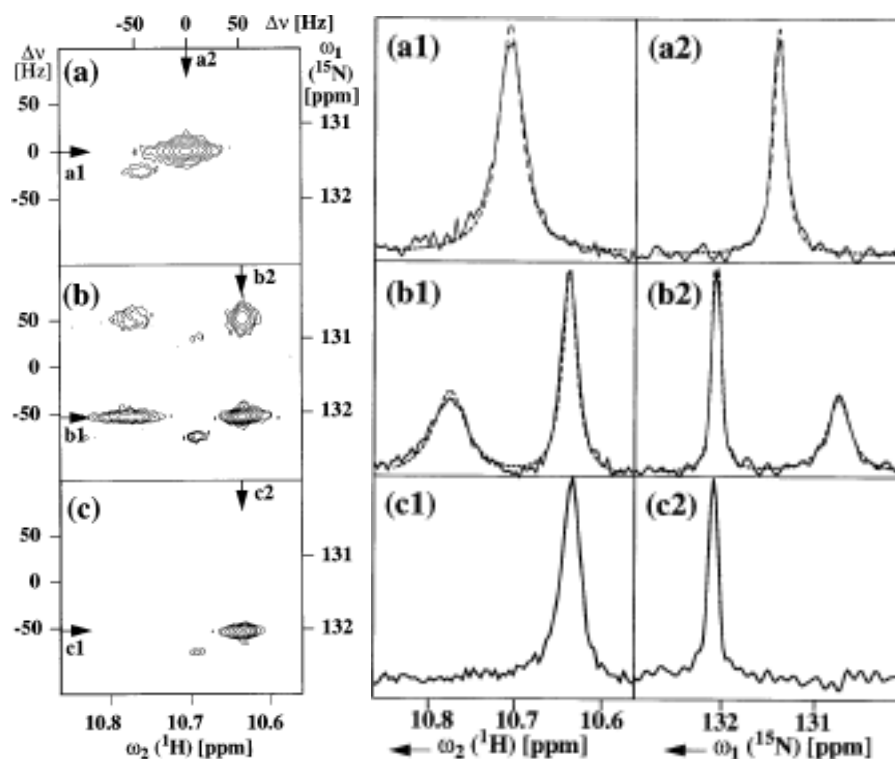


Figure 2.4 – La figure de droite représente le pic de corrélation des atomes N et H^{N} du noyau indole du résidu Trp 48 de l'homodomaine ftz marqué ^{15}N (2 mM) et complexé avec un ADN non marqué de 14 paires de base. a) Spectre HSQC (^1H , ^{15}N) conventionnel avec découplage, b) Spectre COSY sans découplage en t1 et t2 et c) spectre TROSY (^1H , ^{15}N). La figure de gauche représente la projection 1D des taches de corrélation de la figure de droite afin de comparer la largeur des pics. Les deux figures sont issues de [2.5].

2.1.2.3 Importance de la biochimie

La RMN est une technique peu sensible et il faut donc des quantités importantes de produit pour obtenir un spectre facilement analysable. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir un échantillon de protéine. L'extraction de la protéine hors de son organisme naturel ne permet pas d'obtenir des quantités suffisantes pour les études par RMN et la protéine ne peut pas être marquée avec les isotopes ^{13}C et ^{15}N . La synthèse chimique est possible mais, à partir d'une certaine taille (50 acides aminés), le rendement devient très

faible à cause en partie du repliement de la séquence en construction. La surexpression est, pour l'instant, la meilleure technique pour la production des protéines. L'utilisation des méthodes issues de la biologie moléculaire a facilité la production de grosses protéines en quantités pondérales idéales pour la RMN.

Parmi les atomes constituant les protéines, c'est à dire essentiellement l'hydrogène, le carbone, l'azote et le soufre, seul l'hydrogène possède un isotope majoritaire de spin $1/2$. Le soufre n'est pas un noyau très étudié en RMN à cause de son spin de $3/2$. Le carbone et l'azote possèdent également des isotopes ayant un spin $1/2$ mais en abondance naturelle faible : respectivement de 1,1 et 0,4 %. La RMN étant une technique peu sensible, la faible abondance de ces noyaux ne permettait pas de les étudier directement, sur les protéines.

A partir de la fin des années 80, la maîtrise de l'expression des protéines a permis de développer leur marquage isotopique, en utilisant les isotopes ^{13}C et ^{15}N [2.14]. La production de protéines uniformément marquées permettait d'envisager un nombre plus important d'expériences RMN et en particulier celles faisant intervenir des corrélations entre les spins de noyaux différents. L'élaboration de ces spectres hétéronucléaires et multidimensionnels a facilité l'attribution des raies de résonance et a augmenté, dans le même temps, la taille maximale des protéines pouvant être étudiées par RMN : l'éclatement du signal dans une troisième dimension ^{15}N ou ^{13}C pouvait diminuer le nombre de superpositions des pics de résonance et rendait plus simple l'attribution séquentielle car il n'était plus nécessaire de passer par des corrélations NOESY [2.15, 2.16]. Pour l'étude des grosses protéines, dont la masse est supérieure à 30 kDa, la possibilité d'un marquage spécifique de certains résidus permet de ne visualiser que ces résidus au niveau des spectres hétéronucléaires et ainsi faciliter l'attribution séquentielle. Cette méthode est en complément d'un marquage totale de la protéine. Des marquages spécifiques sont également possibles au niveau des chaînes latérales de certains résidus. Une technique permet par exemple de deutérer toutes les chaînes latérales de la protéine à l'exception des méthyles des alanines, valines, leucines et isoleucines [2.17]. L'avantage de cette technique est d'obtenir des tâches de corrélation nOe entre ces résidus hydrophobes qui constituent principalement le coeur des protéines ; la résolution de la structure de grosses protéines en est nettement améliorée. Le principal inconvénient de ce marquage spécifique est le coût économique important des résidus marqués.

Une autre technique est le marquage isotopique spécifique d'un seul domaine d'une protéine dit marquage par intéine. Malgré l'apport de la méthode TROSY qui permet d'examiner des protéines de taille plus importante, les valeurs des largeurs spectrales restent les mêmes et, par conséquent, la probabilité d'avoir un recouvrement de pics augmente avec le nombre d'atomes présents dans la protéine. Le marquage d'un seul

domaine permet de diminuer le risque de recouvrement en n'étudiant qu'une partie de la protéine. Un domaine de la protéine est enrichi uniformément en ^{15}N et ^{13}C , puis est lié à un autre domaine non marqué de la protéine. La ligation se fait à partir d'une fonction SH en position C-terminal du premier domaine et d'une cystéine en position N-terminal pour le deuxième domaine (figure 2.5) [2.18–2.20]. Cette réaction est similaire au phénomène d'épissage que l'on retrouve dans les protéines *in vivo* [2.21]. La liaison entre les deux domaines ne peut se faire que si l'encombrement stérique autour de la liaison peptidique est faible. De plus, la protéine de fusion doit retrouver sa structure native après la réaction chimique. Dans certains cas, il est nécessaire de renaturer la protéine. L'intérêt de cette méthode est d'observer un seul domaine sans l'isoler des autres domaines d'une protéine. Le cas de PilB est un bon exemple. Cette protéine est composée de trois domaines dont la MsrB. Bien que les domaines MsrA et MsrB gardent leur activité réductrice lorsqu'ils sont isolés, l'étude du rôle de chacun l'un envers l'autre ainsi que le rôle du domaine N-terminale peut être intéressant à étudier.

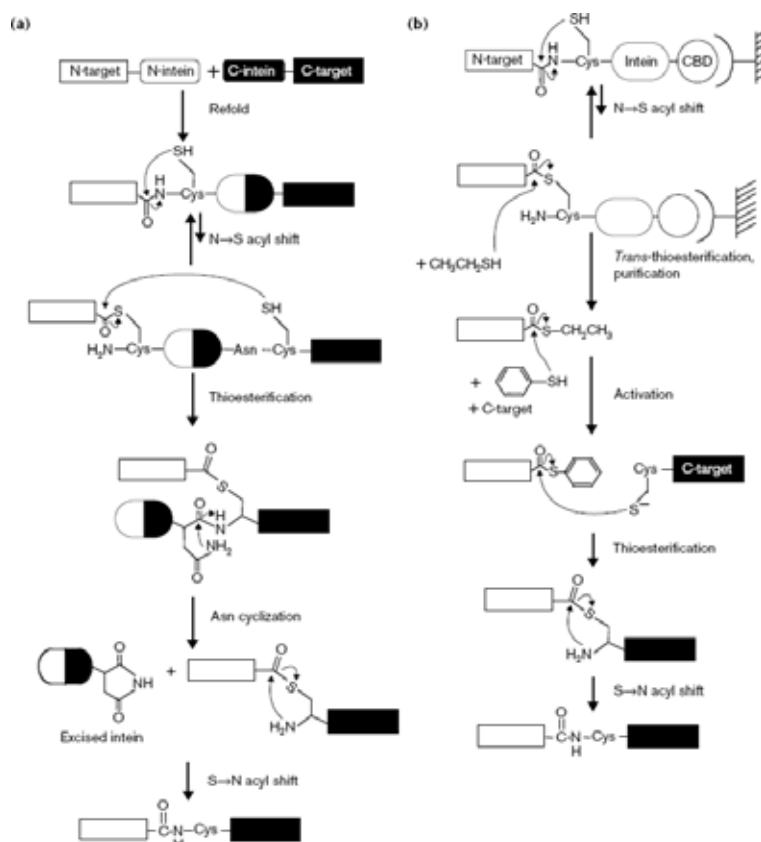


Figure 2.5 – Comparaison de deux méthodes de marquage par intéine utilisant la stratégie d'épissage (a) et la méthode de ligation chimique (b). Figure issue de [2.14].

La deutération des molécules pour simplifier les spectres RMN n'est pas une nouvelle stratégie en soit, mais sa combinaison avec la spectroscopie hétéronucléaire et la protonation spécifique des résidus a permis d'augmenter la taille limite pour l'étude des grosses protéines par RMN. Le deutérium a un rapport gyromagnétique beaucoup plus faible que le proton $\gamma_H = 6,5\gamma_D$ et par conséquent diminue le mécanisme d'interaction dipôle-dipôle $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ pour le ^{13}C . Pour les protéines deutériées, le temps de relaxation des carbones C^α est diminué d'un facteur 5 [2.22]. La deutération des protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 30 kDa réduit la diffusion de spin et affine les signaux des expériences RMN triple résonance [2.23, 2.24]. Elle permet d'effectuer plus facilement l'attribution séquentielle de la protéine. Pour une protéine à partir d'une certaine taille, malgré la deutération, la vitesse de relaxation transversale des carbones devient trop rapide et les techniques standards de triple résonance ne sont alors pas suffisantes pour l'attribution de la protéine.

La combinaison de la deutération des protéines avec les expériences TROSY ont permis d'obtenir des spectres RMN de protéines de plus de 100 kDa. Toutes ces avancées tant matérielles qu'informatiques et chimiques ont permis d'étudier des complexes de plus de 800 kDa comme le complexe GroEL/GroES [2.25], ou la malate synthase G qui est composée de 723 résidus [2.26].

2.2 Processus d'études d'une protéine

L'analyse structurale et fonctionnelle des protéines nécessite, en RMN, des quantités importantes de produits de l'ordre du millimolaire. Par exemple, pour des protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 10 kDa, il est nécessaire d'effectuer un enrichissement isotopique uniforme en ^{15}N et ^{13}C . Dans cette partie, nous parlerons des expériences utilisées pour produire et purifier une protéine. La seconde étape consiste à attribuer les raies de résonance des atomes de la chaîne principale de la protéine. A partir de ces données, de nombreuses études peuvent être entreprises ; nous en verrons quelques unes d'entre elles à la fin de cette partie.

2.2.1 Production de l'échantillon

La production des protéines est le facteur limitant des projets de génomique structurale. A partir de ces constatations, de nombreux efforts ont permis de diminuer le temps de production et d'expression des protéines. En pratique, il existe peu de laboratoires qui font de la génomique structurale, mais les avancées dans ce domaine profite également aux

autres laboratoires. La nécessité d'obtenir un clonage rapide, un bon taux d'expression et une protéine pure passe par une optimisation des vecteurs d'expression, de l'organisme producteur et des protocoles de purification. Je passerai brièvement sur les différentes étapes de production et d'expression des protéines car, lorsque j'ai commencé ma thèse, les protocoles étaient déjà mis en place dans l'équipe Enzymologie du laboratoire MAEM, dirigée par le Professeur G. Branlant. J'ai seulement participé aux étapes d'expression et de purification.

2.2.1.1 Techniques d'expression

La première étape pour l'expression d'une protéine est d'obtenir le gène codant pour celle-ci, c'est l'ADN complémentaire. La possession d'un gène ne contenant pas d'introns (parties non codantes) est très fortement souhaitée. Le gène doit ensuite être exprimé dans un organisme et préférentiellement dans l'organisme dont il est issu. En effet, le phénomène de production diffère selon les organismes surtout en ce qui concerne les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, la biotinylation... Il n'est pas rare d'obtenir une protéine non structurée si elle n'a pas subi toutes les modifications nécessaires à son bon fonctionnement.

Le choix d'un système d'expression se fait en fonction de la simplicité de la manipulation de l'organisme mais principalement de l'origine de la protéine. Les organismes les plus couramment utilisés sont les bactéries, les levures, les cellules d'insectes et les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Plus l'organisme est complexe, plus les contraintes de manipulation de ce dernier seront élevées. C'est pour cela que les systèmes d'expression habituels sont ceux faisant intervenir les bactéries. La bactérie *E. coli* est le système le plus utilisé. Elle est très bien caractérisée par la communauté scientifique et possède une croissance rapide. En ce qui concerne les levures, le système utilisant *Pichia pastoris* succède à celui de *Saccharomyces cerevisiae*. La levure *P. pastoris* est simple d'utilisation et permet la plupart des modifications post-traductionnelles que l'on retrouve chez les organismes supérieurs. De plus, elle utilise le système respiratoire à l'instar de *S. cerevisiae* qui fermente et exige donc plus d'appareillages. Pour tous ces organismes, il existe des souches différentes qui ont un génome modifié afin d'optimiser au mieux la surproduction des protéines.

Le gène choisi, correspondant à la protéine que l'on veut étudier, doit être introduit dans la cellule hôte par l'intermédiaire de vecteurs d'expression. Le vecteur, une fois inséré dans la cellule (étape de transformation), va utiliser la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour exprimer le gène codant pour la protéine d'intérêt. Il existe une très grande variété de vecteurs. L'approche standard est d'utiliser un promoteur inductible

de l'ARN T7 polymérase pour contrôler la production. D'autres vecteurs combinent la protéine d'intérêt avec une autre protéine (protéine de fusion) afin d'augmenter le taux d'expression, la solubilité, de favoriser l'expression extra-cellulaire et de faciliter la purification. La purification peut également être facilitée en introduisant, dans les vecteurs d'expression, une étiquette de plusieurs histidines (polyhistidine tag). En faisant varier le pH, il est alors possible de retenir la protéine d'intérêt sur une colonne grâce à la charge du noyau imidazole.

Le marquage des protéines nécessite un milieu de culture particulier. Les bactéries doivent pousser dans un milieu minimum contenant une unique source de carbone et d'azote. Les principales sources sont le glucose enrichi en ^{13}C , pour le carbone, et le chlorure d'ammonium enrichi en ^{15}N , pour l'azote. Il existe d'autres alternatives comme l'utilisation du méthanol enrichi en ^{13}C pour *P. pastoris*. En ce qui concerne les protéines marquées au deutérium, les composants du milieu de culture sont préparés en présence d'eau lourde (D_2O). L'utilisation d'eau lourde entraîne une diminution de la croissance de la bactérie car le remplacement d'un hydrogène par un deutérium provoque une modification des liaisons hydrogène au sein de la cellule. Cette diminution de croissance entraîne une diminution de la production de la protéine d'intérêt.

Il existe de nombreux modes de purification des protéines qui diffèrent selon l'organisme utilisé et la protéine d'intérêt. Le processus mis en œuvre pour la MsrB de *N. meningitidis* sera décrit plus en détail dans le chapitre suivant (§ 3.1.2, page 85).

2.2.1.2 Préparation de l'échantillon

La dernière étape après l'obtention d'une protéine pure est la préparation de l'échantillon. Les conditions idéales pour une étude par RMN est une forte concentration de la protéine (1 à 2 mM) pour un volume d'environ 500 μL . Si la quantité de protéine produite est faible, on peut utiliser des tubes «Shigemi» dont le fond du tube, qui constitue un volume mort, est en verre plein ce qui permet de travailler avec un volume d'environ 300 μL . Cependant ces tubes ne sont pas utilisables dans la plupart du temps car il est nécessaire de dégazer et de sceller les tubes pour éliminer l'oxygène dissous dans les solutions. Un pH faible permet de diminuer les possibilités d'échange entre les protons amides et les molécules du solvant et d'obtenir ainsi des raies fines. Toutes les conditions optimales sont rarement remplies à cause de la stabilité de la protéine. A de fortes concentrations, les protéines peuvent s'agréger. Un moyen d'augmenter la solubilité de la protéine consiste à jouer sur la salinité de l'échantillon. Les protéines sont généralement pleinement actives à un pH donné et si celui-ci est modifié, la structure de la protéine peut être déstabilisée. De plus, les conditions d'étude par RMN ne seront plus celles correspondant à l'activité

maximale de la protéine. L'effet de la température peut également influencer la qualité des spectres. En général, une température élevée au sein de l'échantillon, mais sans dénaturation de la protéine, affine les signaux et augmente ainsi la résolution des spectres. Une augmentation de quelques degrés peut parfois éliminer certains recouvrements de pics. A l'inverse, la présence de plusieurs isomères peut être atténuée par une diminution de la température qui permet de favoriser le plus stable. Enfin, les conditions dans lesquelles la protéine se trouve devraient idéalement être très proches de celles présentes au sein de la cellule afin d'étudier la protéine dans sa conformation spatiale spécifiquement active.

2.2.2 Attribution des raies de résonance du squelette peptidique

Après l'obtention d'un échantillon pur et stable de la protéine, l'enregistrement des spectres est l'étape suivante. Pour les protéines non enrichies en ^{13}C et ^{15}N , la méthode consiste à effectuer des spectres 2D homonucléaires ^1H COSY, TOCSY puis NOESY et ROESY [2.27]. Ces expériences sont très performantes et suffisantes pour de petites protéines. Lorsque le nombre de résidus devient plus important, aux alentours de 100, la superposition des pics entraîne des erreurs d'attribution et celle-ci devient fastidieuse. Un moyen de diminuer le nombre de recouvrement consiste à éclater le signal dans une troisième dimension en effectuant l'expérience 3D NOESY–TOCSY ou en marquant les protéines en ^{15}N ou ^{13}C [2.28]. Les expériences COSY sont directement liées aux constantes de couplage scalaire ^2J et ^3J . Dans une expérience phasée, pour chaque noyau, ces couplages spin-spin conduisent à un spectre sous la forme de doublets ou de multiplets avec des pics en antiphase (positifs et négatifs). Dans le cas d'une protéine de grande taille, lorsque la largeur des raies devient supérieure à la valeur de la constante de couplage J , les pics en anti-phase s'annulent mutuellement. L'intensité des pics de résonance décroît exponentiellement avec la taille de la protéine. Dans le cas des expériences TOCSY, c'est l'augmentation de la relaxation transversale qui sera à l'origine de la décroissance de l'intensité des pics.

Les expériences de triple résonance hétéronucléaire font intervenir divers transferts d'aimantation, de polarisation ou de cohérence, évoluant sous l'effet des couplages $^1\text{J}_{\text{XH}}$, $^2\text{J}_{\text{XH}}$ ou $^3\text{J}_{\text{XH}}$ pendant des intervalles de durée proportionnels à l'inverse de ces couplages et permettent le développement d'un très grand nombre d'expériences pour les protéines doublement marquées (^{15}N , ^{13}C). Les valeurs de constante de couplage en ^1J sont relativement grandes ($^1\text{J}_{\text{NH}} \approx 90 \text{ Hz}$ et $^1\text{J}_{\text{CH}} \approx 135 \text{ Hz}$) et autorisent des transferts rapides qui compensent la perte d'aimantation due à la relaxation pendant la séquence d'impulsion. Ces expériences ont ainsi permis l'étude des protéines de plus grande taille par RMN.

Dans ce paragraphe, nous parlerons des expériences multidimensionnelles utilisant l'attribution séquentielle des noyaux du squelette peptidique d'une protéine doublement marquée puis des conclusions directes que l'on peut déduire de ces résultats, notamment au niveau de la prédiction des structures secondaires.

2.2.2.1 Attribution séquentielle

La plupart des expériences multidimensionnelles sont basées sur le transfert de l'aimantation du H^N vers N via le couplage scalaire $^1J_{NH}$ avec les expériences HSQC (1H , ^{15}N) ou TROSY (1H , ^{15}N), puis vers un troisième atome principalement un carbone. L'attribution séquentielle consiste à identifier les résidus voisins par un jeu d'expériences corrélant les atomes d'un résidu acide aminé donné avec ceux du résidu précédent [2.29, 2.30]. Le type d'expérience dépend du chemin de transfert de cohérence utilisé et leur notation est liée directement au transfert d'aimantation (figure 2.6).

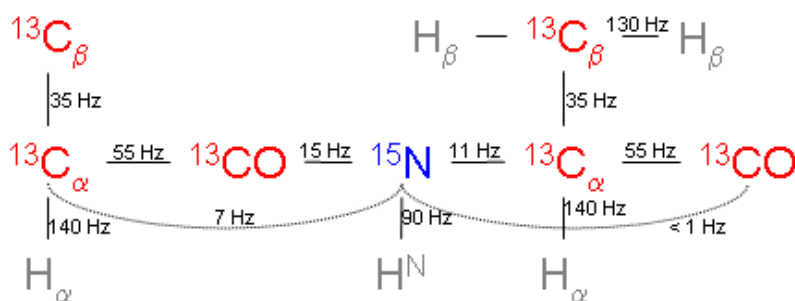


Figure 2.6 – Système de spins du squelette peptidique et valeurs des constantes de couplage 1J et 2J qui sont utilisées pour les transferts d'aimantation dans les protéines doublement marquées ^{15}N et ^{13}C .

Le tableau 2.1, page ci-contre, présente une liste non exhaustive des expériences possibles pour l'attribution séquentielle, elles sont complémentaires et fonctionnent par deux. Elles s'appuient sur le fait que la valeur de la constante de couplage $^1J_{N,C_i^\alpha}$ est approximativement la même que $^2J_{N,C_{i-1}^\alpha}$ (respectivement 11 et 7 Hz). De ce fait, lorsqu'on transfère l'aimantation de l'azote N vers le carbone C^α , l'opération se fait avec les deux C^α . Les expériences, qui s'appuient sur le couplage N- C^α , auront deux pics correspondant aux C^α des résidus i et i-1. Le fait que la valeur $^1J_{N-C_i^\alpha}$ soit légèrement supérieure à celle de $^2J_{N-C_{i-1}^\alpha}$, le transfert vers le résidu i sera plus important, ainsi l'intensité du pic de corrélation correspondant sera également plus importante. En pratique, ce n'est pas toujours le cas et il est donc préférable d'y associer les expériences utilisant le transfert de N vers

CO où, seules les corrélations des atomes du résidu précédent seront visibles ($^1J_{N-CO_{i-1}} = 15$ Hz et $^2J_{N-CO_i} < 1$ Hz).

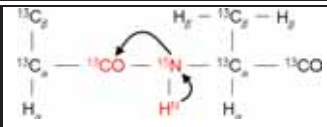
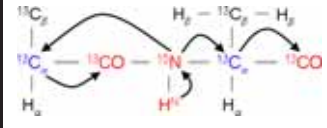
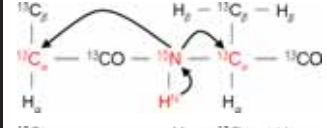
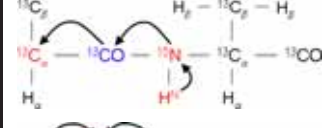
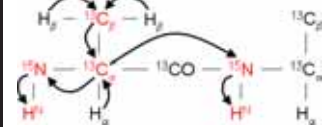
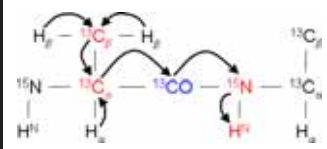
Expériences	Noyaux observés	Transfert d'aimantation
HNCO	H_i, N_i, CO_{i-1}	
HN(CA)CO	H_i, N_i, CO_i, CO_{i-1}	
HNCA	$H_i, N_i, C_i^\alpha, C_{i-1}^\alpha$	
HN(CO)CA	H_i, N_i, C_{i-1}^α	
CBCANH	$H_i, N_i, C_i^\alpha, C_{i-1}^\alpha, C_i^\beta, C_{i-1}^\beta$	
CBCA(CO)NH	$H_i, N_i, C_{i-1}^\alpha, C_{i-1}^\beta$	

Tableau 2.1 – Tableau des six expériences les plus utilisées pour l'attribution du squelette peptidique des protéines doublement marquées ^{15}N et ^{13}C avec leur schéma de transfert d'aimantation. Les expériences de transfert vers les C^β sont indispensables pour l'identification des résidus bien que les C^β ne font pas partie du squelette peptidique.

Pour les petites protéines doublement marquées, l'attribution séquentielle du squelette semble être possible avec seulement les expériences CBCANH et CBCA(CO)NH. En effet, les connexions, à partir du déplacement chimique des C^α et C^β , semblent suffisantes pour lever les ambiguïtés. Le principal problème est que la séquence CBCANH n'est pas très sensible pour des protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 15 kDa ; par conséquent, il est préférable d'ajouter à cette paire d'expériences, les expériences plus sensibles comme HNCA et HN(CO)CA. Enfin, si la connaissance des déplacements chimiques des C^α et C^β n'est pas suffisante, les expériences HNCO et HN(CA)CO peuvent être utilisées pour lever les incertitudes. L'expérience HNCO est en plus une expérience très sensible et permet de lever l'ambiguïté de possibles recouvrements de pics au niveau de l'expérience HSQC ($^1H, ^{15}N$).

Les valeurs des déplacements chimiques des C^α et C^β permettent de connaître, dans certains cas, le résidu correspondant. L'attribution de certains résidus dans une séquence permet ensuite de replacer les fragments attribués et composés de plusieurs acides aminés dans la séquence entière de la protéine. En reliant les séquences, il est ainsi possible d'attribuer les atomes H^N , N , C^α , C^β et CO pour chaque résidu.

En plus des six expériences rapportées dans le tableau 2.1, page précédente, l'expérience HNHA permet de connaître également le déplacement chimique des H^α . Le cheminement du transfert d'aimantation se fait à partir du H^N vers le H^α via le ^{15}N . En plus de la connaissance du déplacement chimique, le rapport des intensités entre le pic de la diagonale (H^N-H^N) et le pic de corrélation (H^N-H^α) permet de calculer la constante de couplage $^3J_{H^N-H^\alpha}$. L'utilisation de la relation de Karplus permet alors de déduire l'angle ϕ du squelette peptidique [2.31]. Cette expérience, sans grand intérêt pour l'attribution séquentielle, nous donne la valeur du déplacement chimique du H^α qui est sensible à l'élément de structure dont il fait partie.

2.2.2.2 Prédiction des structures secondaires

La connaissance des déplacements chimiques des atomes formant le squelette peptidique est la première étape pour l'étude d'une protéine par RMN. A partir de ces résultats préliminaires, il est possible de faire de nombreuses études, notamment structurale, dynamique et d'interaction. Mais avant de se lancer dans des expériences RMN supplémentaires, il est possible d'identifier les différentes régions de structures secondaires particulières dans des protéines à partir de ces déplacements chimiques.

En effet, une relation, entre la valeur du déplacement chimique des atomes d'un résidu et la structure secondaire dans laquelle il se trouve, a été proposée. Les premières études datent du début des années 90 avec l'étude des protons H^N et H^α et l'effet de la structure sur la valeur de leurs déplacements chimiques [2.32]. En même temps, des études sur les carbones C^α et C^β ont montré une relation entre la valeur de leurs déplacements chimiques et les angles de torsions ϕ et ψ [2.33] qui définissent la nature des structures secondaires [2.32].

A partir de ces données, deux principales méthodes ont vu le jour pour déterminer, avec précision, les éléments de structures secondaires dans les protéines. La première consiste à calculer un index de déplacement chimique (*CSI pour Chemical Shift Index*). Dans ce cas, les valeurs des déplacements chimiques des carbones C^α , C^β et CO et du proton H^α sont comparées avec celles que l'on retrouve dans les zones non structurées des protéines pour chaque résidu [2.34]. Lorsqu'un consensus se détache dans la comparaison des déplacements chimiques, on peut conclure que ce résidu se retrouve dans une certaine

structure secondaire. La possibilité de différencier les deux types d'hélice que sont l'hélice α et l'hélice 3_{10} est également possible¹. Par contre des études sont encore entreprises pour étudier l'effet de la séquence primaire sur les déplacements chimiques des constituants ainsi que des études sur les valeurs de référence (ceux des zones déstructurées) utilisées pour calculer le CSI [2.35].

La deuxième méthode, proposée avec le logiciel TALOS, se base sur le calcul des valeurs des angles ϕ et ψ à partir d'une base de données de 78 protéines dont la structure cristallographique et les valeurs des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique sont connues. Le logiciel TALOS recherche des valeurs de déplacements chimiques identiques pour un résidu en prenant en compte les résidus $i-1$ et $i+1$. Il combine donc le CSI et l'alignement de séquences [2.36]. Pour chaque résidu, le logiciel propose dix valeurs d'angles ϕ et ψ prises dans la base de données. A partir de la carte de Ramachandran, il est ensuite possible de relier directement les structures secondaires aux valeurs des angles ϕ et ψ d'un résidu [2.37]. Ces techniques ont été appliquées pour l'attribution des spectres RMN de la thiorédoxine de peuplier [2.38] et de la MsrA d'*E. coli* [2.39].

2.2.3 Études supplémentaires

A partir de l'attribution des atomes de chacun des résidus du squelette peptidique de la protéine, de nombreuses études sont possibles. La principale est l'identification des contraintes structurales permettant de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine. Avec le développement des techniques RMN, de nouvelles études ont vu le jour et notamment des études de dynamique des protéines en solution afin de comprendre leur mécanisme fonctionnel. Enfin, l'augmentation de la sensibilité des spectromètres a permis d'analyser et de caractériser les interactions entre une protéine et ses différents partenaires. Dans ce paragraphe, nous parlerons seulement des études structurales et dynamiques des protéines. L'étude des interactions sera développée plus en détail dans la troisième partie de ce chapitre.

2.2.3.1 Études structurales

L'étude classique des protéines par RMN est basée sur la détermination d'un maximum de contraintes locales semi-quantitatives. Ces contraintes géométriques sont les distances interprotoniques et les angles dièdres. Afin d'avoir le plus grand nombre de contraintes de distance, il est nécessaire d'établir l'attribution des atomes et principalement des protons des chaînes latérales des résidus.

¹http://www.bmrwisc.edu/referenc/published/Ikura_cs_study/part3.html

Les deux principales séquences RMN permettant l'attribution des atomes des chaînes latérales d'une protéine marquée sont les expériences HCC(CO)NH-TOCSY [2.40] et de type HCCH-TOCSY [2.41]. Le tableau 2.2 présente les différentes expériences 3D pour l'attribution des atomes des chaînes latérales.

Expériences	Noyaux observés	Transfert d'aimantation
(H)CC(CO)NH-TOCSY	$H_i, N_i, C_{i-1}^{\alpha, \beta, \gamma, \dots}$	
H(CC)(CO)NH-TOCSY	$H_i, N_i, H_{i-1}^{\alpha, \beta, \gamma, \dots}$	
HCCH-TOCSY	$C^{\alpha, \beta, \gamma, \dots}, H^{\alpha, \beta, \gamma, \dots}$	

Tableau 2.2 – Tableau des expériences les plus utilisées pour l'attribution des atomes des chaînes latérales des protéines doublement marquées ^{15}N et ^{13}C avec leur schéma de transfert d'aimantation.

Les expériences qui utilisent les transferts C-C de type TOCSY pour établir l'attribution des chaînes latérales en passant par les atomes du squelette deviennent moins sensibles pour les grosses molécules à cause du nombre important de transferts d'aimantation. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser les expériences de type HCCH-TOCSY. Les fréquences des noyaux H^α et $C^{\alpha, \beta}$ permettent ensuite de relier le système de spin des chaînes latérales avec l'attribution du squelette peptidique.

Les expériences qui permettent de déterminer les distances interprotons sont celles utilisant l'effet de relaxation croisée ou l'effet nOe [2.42]. Un spin I, irradié par des impulsions $\frac{\pi}{2}$ (ou 90°), peut transférer son aimantation à un spin J en interaction dipolaire

avec I. La vitesse d'échange, caractérisée par son taux de relaxation croisée σ_{IJ}^{NOE} , dépend de la distance r_{IJ} entre les deux spins I et J [2.43] :

$$\sigma_{IJ}^{NOE} = \frac{\hbar^2 \mu_0^2 \gamma_I^2 \gamma_J^2 \tau_c}{40\pi^2 r_{IJ}^6} \left(-1 + \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad (2.1)$$

Avec $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ et h la constante de Planck ; μ_0 , le moment magnétique ; γ_I et γ_J , les rapports gyromagnétiques des spins I et J ; τ_c , le temps de réorientation globale de la molécule et ω_0 , la fréquence de Larmor.

Au niveau des spectres NOESY, l'intensité du signal de corrélation, proportionnelle à r^{-6} , est directement liée à la distance r entre les deux protons I et J. On peut quantifier tous les pics de corrélations nOe en comparant leur intensité avec celle du pic nOe des deux protons non équivalents d'un groupement méthylène ($C^\alpha H_2$ d'un résidu Gly ou $C^\beta H_2$ d'un résidu Asn ou Asp . . .) dont la distance théorique est connue pour extraire les distances interprotoniques correspondantes. La sensibilité des spectromètres est telle que la distance maximale quantifiable est de l'ordre de 6 Å. Au delà de cette distance, l'effet nOe est nul. D'autres phénomènes peuvent influencer l'effet nOe et il est donc préférable, en pratique, de faire une échelle de distance et de classer les estimations en plusieurs intervalles de distance (courtes, moyennes et longues) plutôt que de calculer une distance exacte. La quantification complète des effets nOe a permis la résolution de la structure 3D en solution de la thiorédoxine de peuplier par RMN [2.44].

Enfin, la RMN permet également d'avoir accès aux constantes de couplage scalaire via les liaisons chimiques [2.45]. En effet, la constante de couplage 3J est fonction de la valeur de l'angle dièdre θ entre les deux plans définis par chacun des spins I et J avec la liaison X–Y selon la relation suivante (figure 2.7, page suivante) [2.46] :

$${}^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (2.2)$$

avec A, B et C qui sont des constantes dépendant de la nature de la liaison chimique et déterminées empiriquement.

Si l'on représente le profil d'une courbe, figure 2.7, page suivante, il existe plusieurs valeurs d'angles pour une même valeur de 3J ; le paramètre est donc dégénéré. Dans certain cas une des valeurs d'angle est interdite structuralement et alors il devient possible de connaître sans ambiguïté certaines valeurs d'angles de torsion.

Les distances interprotoniques ainsi que les valeurs des angles de torsion sont introduites comme contraintes géométriques dans les calculs de modélisation moléculaire avec

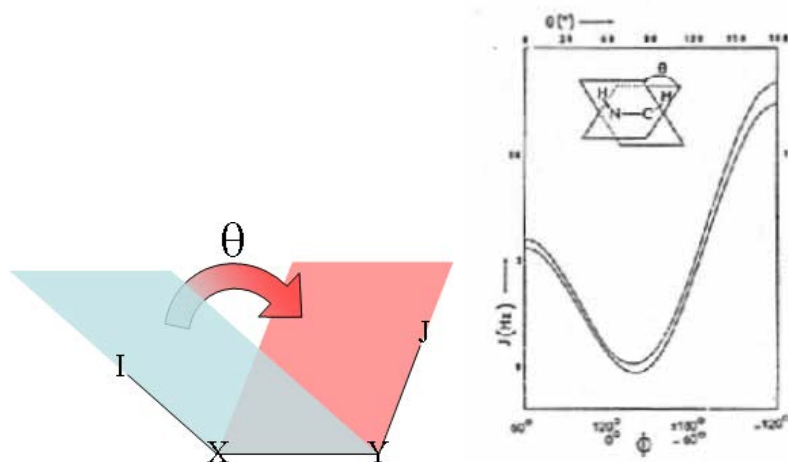


Figure 2.7 – Représentation schématique d'un angle de torsion θ pour les atomes I,X,Y,J (gauche). Corrélation entre l'angle ϕ de torsion autour de la liaison N-C $^\alpha$ des peptides et la constante de couplage entre protons vicinaux dans le fragment H N -N-C $^\alpha$ -H $^\alpha$ (droite).

le formalisme du recuit simulé pour déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine.

D'autres expériences ont vu le jour afin de déterminer plus facilement la structure des protéines. L'une d'entre elles, est l'étude des constantes de couplage dipolaire résiduel (CDR) [2.47, 2.48]. Chaque noyau magnétique se comporte comme un dipôle capable de créer un champ magnétique local. En présence d'un champ magnétique externe et intense, le champ local modifie la fréquence de Larmor initiale des noyaux voisins. Ce phénomène est appelé interaction dipôle-dipôle ou couplage dipolaire. Son intensité dépend, en plus d'autres facteurs, de la distance entre les deux noyaux interagissant et l'angle que fait le vecteur de ces deux noyaux avec le champ magnétique externe. A travers cette dépendance angulaire, il est possible de positionner les deux noyaux par rapport à un système d'axes choisi arbitrairement dans un référentiel. Ces données orientationnelles peuvent être utilisées afin d'obtenir des informations supplémentaires pour déterminer la structure des protéines en solution (figure 2.8, page suivante) [2.49]. Ces contraintes orientationnelles à longue portée sont complémentaires des contraintes habituellement utilisées : les distances entre atomes et les angles dièdres.

2.2.3.2 Études de dynamique

La RMN permet également d'étudier la dynamique des protéines en solution. La connaissance de la structure d'une protéine ne permet pas toujours d'expliquer les phénomènes biologiques. En effet, au sein des cellules, les protéines ne sont pas des structures

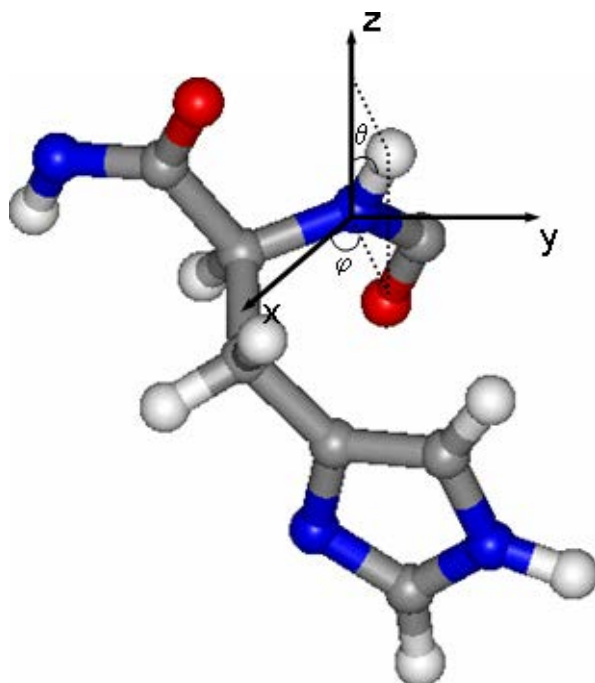


Figure 2.8 – Orientation d'un vecteur de couplage dipolaire N-H^N d'un résidu His d'une protéine. Le système d'axe du tenseur d'alignement est représenté par les axes x, y et z. Les angles θ et φ définissent l'orientation du vecteur dipolaire selon le tenseur d'alignement.

rigides ce qui leur permet dans certains cas de faciliter les interactions de ces protéines avec leurs partenaires. Toutes les zones de la protéine n'ont pas la même flexibilité et en mesurant les vitesses de relaxation des spins nucléaires, il est possible d'estimer l'amplitude des mouvements locaux. La RMN permet d'étudier des mouvements de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde et, dans certains cas, jusqu'à la milliseconde en ce qui concerne des échanges conformationnels (figure 2.9, page suivante).

Les mesures principales sont la relaxation longitudinale R_1 , la relaxation transversale R_2 et le paramètre de relaxation croisée hétéronucléaire nOe (HnOe) [2.50]. La mesure de ces trois paramètres se fait principalement sur le noyau ^{15}N car les champs fluctuants (ceux qui engendrent la relaxation) proviennent principalement des mouvements de réorientation angulaire de la liaison unique N-H par rapport au champ magnétique externe. D'autre part, ce noyau est réparti de façon uniforme tout au long de la chaîne peptidique et permet donc une visualisation continue de la dynamique le long du squelette protéique.

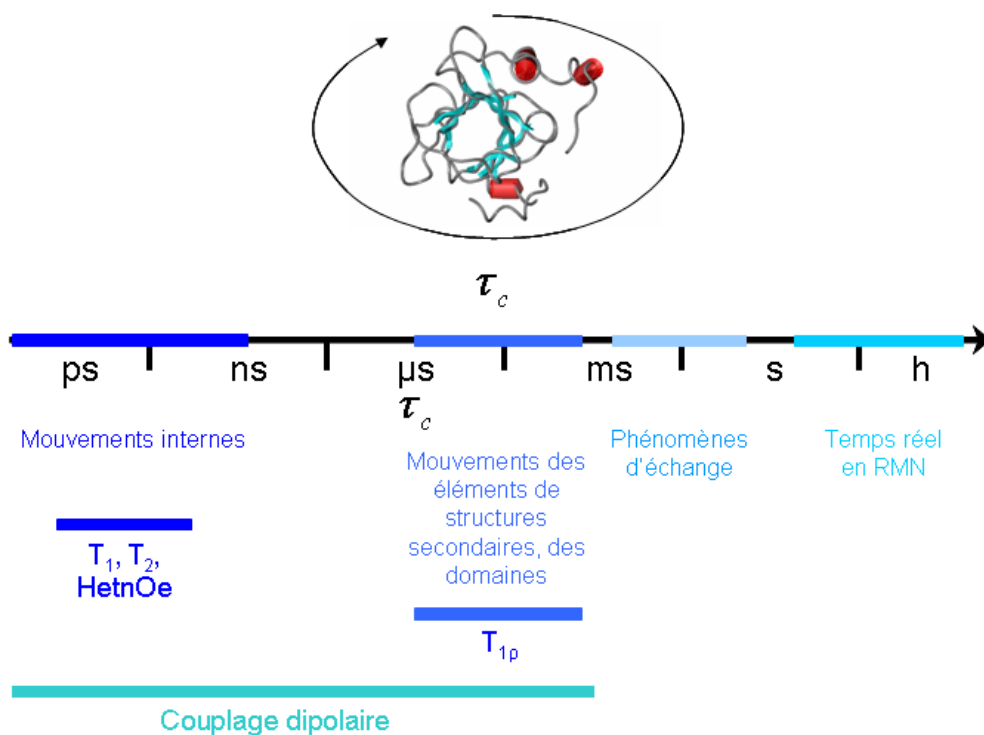


Figure 2.9 – Échelle des temps pour différents types de mouvements moléculaires mesurables par des études de dynamique RMN.

Les composantes de la relaxation longitudinale et transversale (respectivement $M_z(t)$ et $M_{xy}(t)$), peuvent être décrites de la façon suivante :

$$M_z(t) = M_{z_0}[1 - 2e^{-tR_1}] \quad (2.3)$$

$$M_{xy}(t) = M_{xy_0}e^{-tR_2} \quad (2.4)$$

La détermination des paramètres se fait par échantillonnage en fonction du temps des fonctions décroissantes $M_z(t)$ et $M_{xy}(t)$.

Le phénomène de relaxation croisée se traduit par un échange d'aimantation dans l'espace entre deux spins en interaction dipolaire. Il peut fournir des informations de distance entre les deux noyaux porteurs de spin. Le paramètre nOe hétéronucléaire entre les spins ^{15}N et $^1\text{H}^{\text{N}}$ d'une même liaison NH dépend seulement du temps de corrélation effectif entre ces deux spins (amplitude du mouvement) car leur distance est supposée constante et est de $1,01 \text{ \AA}$. Dans la pratique, on calcule un rapport d'intensité des pics de corrélation avec et sans irradiation du proton H^{N} . Afin d'avoir les mêmes conditions d'expérience, une irradiation hors résonance est appliquée pour l'expérience sans irradiation. Le paramètre

nOe se calcule donc de la façon suivante :

$$nOe = \frac{I_{rad}}{I_{ref}} \quad (2.5)$$

Si la valeur du nOe est proche de 1, ($I_{rad} \approx I_{ref}$), on peut considérer que l'irradiation des ^1H affecte peu la relaxation des spins ^{15}N et donc que la structure est rigide.

Dans la plupart des cas, ce sont les parties flexibles de la protéine qui sont à l'origine de son activité. La seule image statique d'une protéine ne suffit pas toujours à identifier les régions impliquées dans les interactions. Les trois paramètres R_1 , R_2 et HnOe permettent d'identifier les régions flexibles d'une protéine et ainsi de mieux comprendre son fonctionnement.

2.3 Études des interactions

A l'aube de l'ère post-génomique, les interactions protéine-protéine deviennent un événement digne de considération [2.51]. Les conclusions des études sur les phénomènes d'interaction vont de plus en plus dans le sens d'un réseau pour la plupart des systèmes catalytiques et de régulation. La réplication, la transcription, la traduction, l'acheminement des protéines, la dégradation des protéines, ... sont accomplis par des complexes protéiques qui sont activés en fonction de l'association ou de la dissociation des macromolécules impliquées dans ces processus. La plupart de ces interactions sont dirigées par une reconnaissance entre certains domaines des protéines participantes [2.52]. Afin de comprendre les mécanismes d'interaction des protéines et, en ce qui nous concerne, ceux de la MsrB, il est nécessaire d'identifier les domaines impliqués dans l'interaction des protéines avec leurs partenaires et de comprendre le mécanisme de reconnaissance.

La connaissance des structures 3D des deux partenaires sous leur forme non liée n'est pas suffisante pour comprendre les mécanismes qui peuvent régir la formation du complexe. Malgré le nombre important de logiciels d'arrimage (docking) [2.53], nous ne sommes pas encore capable de prédire correctement les résidus impliqués dans l'interaction ainsi que la structure du complexe, sans l'aide de données expérimentales.

La cristallographie et la RMN sont les principales techniques pour caractériser les complexes protéiques à une résolution atomique [2.54]. Bien que la taille des complexes limite la détermination des structures des protéines, la RMN peut fournir des informations spécifiques et qualitatives sur des complexes de très grande taille. La connaissance des états d'ionisation, des liaisons hydrogène, de la dynamique du site de reconnaissance mais aussi l'identification des résidus engagés dans l'interaction, l'estimation des constantes

cinétiques lors de la fixation d'un ligand font de la RMN un outil très performant pour les études d'interaction.

Dans cette partie, je parlerai du principe des phénomènes d'échanges chimiques au niveau de la RMN ; je citerai ensuite plusieurs méthodes utilisant la RMN pour caractériser les interactions possibles entre différents partenaires.

2.3.1 Phénomènes d'échanges

Cette section traitera des différents phénomènes d'échange que l'on retrouve dans les phénomènes d'interactions non covalentes.

2.3.1.1 Études cinétique et thermodynamique des phénomènes d'interaction

La quantification d'une constante physique définissant les interactions ligand-récepteur les plus classiques dépend de plusieurs hypothèses (Théorie de Clark) :

1. L'interaction doit être réversible : l'association doit être bi-moléculaire avec une réaction cinétique du second ordre, c'est à dire sans former de liaison covalente.
2. Tous les récepteurs de la molécule doivent être équivalents et indépendants.
3. La réponse biologique doit être proportionnelle au nombre de sites des récepteurs occupés.
4. L'interaction et la réponse sont mesurées après que la réaction a atteint son équilibre.
5. Le ligand ne doit pas participer à d'autres réactions et être dégradé et il ne doit exister que sous sa forme libre ou liée au récepteur.

La terminologie de récepteur-ligand est utile pour la compréhension des équations, mais dans le cas des interactions protéine-protéine, elle n'est pas appropriée. Je parlerai donc de ligand (L) pour le composé dont la concentration varie pendant l'étude et de récepteur (P) pour le composé dont la concentration reste fixe. L'observation se fera au niveau du récepteur.

Sous ces conditions, l'association (PL) d'un ligand (L) à son récepteur protéique (P) peut être représentée par l'équation (2.6) :



avec k_{+1} et k_{-1} les vitesses d'association et de dissociation respectives. Une autre façon de représenter l'équation chimique (2.6) est possible en incluant la constante d'affinité ou

de dissociation K_D :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (2.7)$$

Dans plusieurs cas, les techniques permettent de ne connaître que les concentrations totales du récepteur protéique ($[P]_0 = [PL] + [P]$) et du ligand ($[L]_0 = [L] + [PL]$). Il est alors possible de transformer l'équation (2.7) en une équation quadratique dont la solution unique est :

$$[PL] = \frac{([L]_0 + [P]_0 + K_D) - \sqrt{([L]_0 + [P]_0 + K_D)^2 + 4[L]_0[P]_0}}{2} \quad (2.8)$$

La résolution de cette équation est possible par différents programmes capables d'ajuster des équations non linéaires aux résultats expérimentaux.

Dans l'échelle de temps de la RMN, il existe plusieurs conditions d'échange qui dépendent de la vitesse de dissociation (k_{-1}) (figure 2.10, page suivante)² :

- Échange rapide : $k_{-1} \gg \Delta\omega$
- Échange intermédiaire : $k_{-1} \approx \Delta\omega$
- Échange lent : $k_{-1} \ll \Delta\omega$

où $\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu$ est la différence, en Hertz, des fréquences ou des signaux correspondant à l'état libre et à l'état complexé. En fonction des valeurs de k_{-1} , du champ magnétique propre au spectromètre, les conditions d'échange peuvent donc être différentes.

2.3.1.2 L'échange chimique rapide

Si les conditions d'un échange rapide sont remplies, il y a un seul pic de résonance durant la titration ($[P]$ reste constante et $[L]$ varie). La valeur de son déplacement chimique observé (δ_{obs}) est la moyenne pondérée des déplacements chimiques des deux états libre (δ_P) et complexé (δ_{PL}) : équation (2.9).

$$\delta_{obs} = \frac{[P]}{[P]_0}\delta_P + \frac{[PL]}{[P]_0}\delta_{PL} \quad (2.9)$$

Dans ce cas, la résonance d'un noyau évolue de façon continue à chaque ajout de ligand. Ce phénomène est donc décrit comme un échange chimique rapide et se retrouve principalement lorsque l'affinité des deux partenaires est faible. L'attribution de l'état lié est simple car il suffit de suivre l'évolution du pic en fonction de la concentration du ligand. Quand la résonance n'évolue plus, on peut dire que l'on est à saturation de ligand et que les valeurs des déplacements chimiques observées seraient proches de celles

²http://tesla.ccruc.uga.edu/~jhp/nmr_04/notes/bcmb8190_042604.pdf

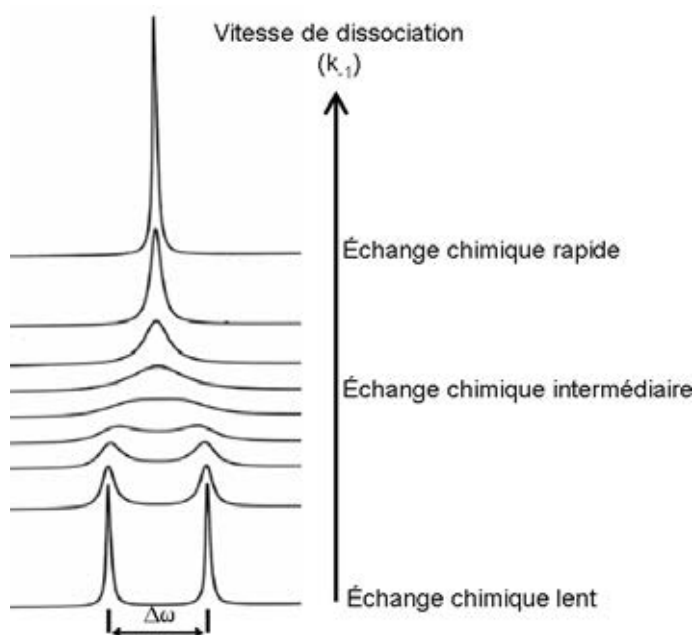


Figure 2.10 – Représentation d'un pic de résonance en fonction de la vitesse d'échange dans le cas où la proportion entre les états libre et complexé est la même.

de l'état lié. Le suivi des résonances, de l'état libre vers l'état lié, permet de calculer la constante d'affinité en ajustant les valeurs de déplacements chimiques (δ_{obs}) à l'équation quadratique (2.8) qui dépend des concentrations du récepteur et du ligand. En combinant les équations (2.8) et (2.9), on obtient :

$$\delta_{obs} = \delta_P + \frac{(\delta_{PL} - \delta_P) \times ([P]_0 + [L]_0 + K_D) - \sqrt{([P]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4[P]_0[L]_0}}{2[P]_0} \quad (2.10)$$

La trajectoire des résonances du récepteur en fonction de la concentration du ligand, dans un échange rapide, peut nous donner une information supplémentaire sur le phénomène de fixation (figure 2.11, page ci-contre). Dans le cas d'expériences RMN bidimensionnelles, comme l'expérience HSQC (^1H , ^{15}N), si la trajectoire est linéaire et régulière, il existe alors qu'un seul site de fixation entre le récepteur et le ligand. Par contre, si la trajectoire n'est pas rectiligne ou, n'est pas régulière pour tous les résidus, plus d'un site de fixation est impliqué.

2.3.1.3 L'échange chimique lent et intermédiaire

Si la dissociation du complexe est lente, nous observerons deux jeux de résonances : un jeu pour la protéine libre et un autre jeu de résonance pour la protéine liée. Pendant

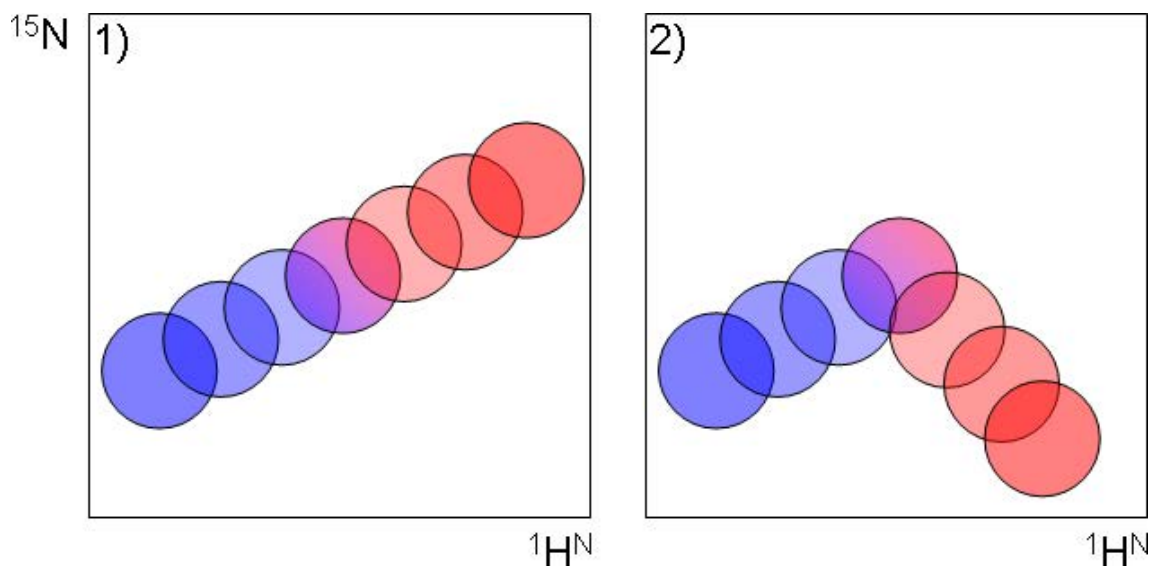


Figure 2.11 – Exemple de trajectoires possibles d’un pic lors de l’ajout d’un ligand. Lorsque la concentration du ligand augmente au fur et à mesure, le pic associé au résidu passe de l’état libre (bleu) à l’état complexé (rouge). Dans le cas 1), la trajectoire est linéaire, il y a donc un site de fixation du substrat. Dans le cas 2), la trajectoire est cassée ; cela se produit lorsqu’il y a un second site de fixation non équivalent ou non spécifique.

la titration, l’état libre va disparaître au profit de l’état lié. Dans ce cas, l’intensité des tâches de corrélation sera pondérée en fonction de la concentration du récepteur dans l’état libre et dans l’état lié, respectivement I_P et I_{PL} (2.11).

$$I_{P_{obs}} = \frac{[P]}{[P]_0} I_P \quad \text{et} \quad I_{PL_{obs}} = \frac{[PL]}{[P]_0} I_{PL} \quad (2.11)$$

avec $I_{P_{obs}}$, intensité des pics de corrélation observés pour l’état libre et $I_{PL_{obs}}$, intensité des pics de corrélation observés pour l’état lié.

Les fréquences de résonance des atomes ne participant pas à l’interaction resteront identiques pour les deux états libre et lié. Les pics seront alors superposés et il ne sera pas possible de quantifier les deux états dans ce cas là. Par contre, pour les atomes impliqués dans l’interaction, la modification de leur environnement chimique va entraîner une modification des fréquences de résonance. Il va donc y avoir une disparition des pics de corrélation attribués à l’état libre et une apparition concomitante, à un autre endroit du spectre, des pics de corrélation attribués à l’état lié. La mesure de l’intensité de ces pics devrait nous renseigner sur la proportion des formes libre et liée dans la solution.

Dans le cas d’un échange lent, il n’est pas possible d’attribuer facilement les résonances de la forme liée comme pour un échange rapide. Le déplacement chimique des atomes de

l'état lié n'est pas connu, les pics qui vont apparaître ne pourront donc pas être directement attribués aux atomes de l'état lié. Il faut alors effectuer une réattribution des pics de résonance par les méthodes d'attribution séquentielle standard. L'attribution globale du spectre est quand même plus facile si la majeure partie des résonances entre l'état libre et lié se superposent ou sont proches les unes des autres. Ainsi, de nombreux auteurs suggèrent que la résonance de la forme liée, si elle n'est pas superposée à la forme libre, apparaît proche de cette dernière et s'affranchissent d'une réattribution complète [2.55, 2.56]. Dans le cas d'un échange lent, la constante d'affinité peut être calculée en mesurant les intensités des pics qui disparaissent ou qui apparaissent en fonction de la concentration du ligand [2.57]. La formule (2.8) combinée à (2.11) peut être adaptée pour y faire figurer l'intensité des pics :

$$I_{P_{obs}} = I_P - \frac{(I_{PL} - I_P) \times ([P]_0 + [L]_0 + K_D) - \sqrt{([P]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4[P]_0[L]_0}}{2[P]_0} \quad (2.12)$$

Dans le cas d'un échange intermédiaire, les raies de résonance s'élargissent et l'on peut observer une disparition de certains pics au niveau des spectres RMN. Pour les spectres à deux dimensions, une diminution de l'intensité des pics et une variation des déplacements chimiques peuvent être observées.

A partir de ces études des phénomènes d'échange dans le cas de la RMN, il est possible de déterminer l'interface de l'interaction entre une protéine et un ligand. En fonction du phénomène observé, des expériences RMN adaptées permettront de caractériser au mieux l'interaction.

2.3.2 Détermination des interfaces d'interaction

Les expériences RMN pour caractériser l'interface des interactions sont nombreuses et diverses. On peut les classer en deux catégories en fonction de ce que l'on veut observer. Les expériences RMN de la première catégorie étudient les signaux du ligand au contact de son récepteur. Ces expériences ne nécessitent pas de marquage du récepteur. Les expériences les plus couramment utilisées sont celles faisant intervenir les techniques de filtrage dynamique [2.58], les expériences de NOESY transférée (TR-NOE) [2.59] et les expériences de différence de transfert de saturation (STD) [2.60]. Avant mon arrivée, le laboratoire avait acquis une bonne pratique dans ce type d'expériences notamment pour l'étude d'interaction antigène/anticorps monoclonaux [2.61, 2.62]. La deuxième catégorie d'expériences est celle qui permet d'étudier les changements induits par la fixation du ligand sur le récepteur. Dans cette partie, je donnerai quelques exemples d'expériences de

cette catégorie. Dans le cas de l'étude d'interaction entre deux macromolécules, la nomenclature récepteur et ligand n'est plus très valable car les rôles peuvent être intervertis. Le récepteur sera alors celui dont la concentration ne varie pas lors des titrations.

2.3.2.1 Cartographie de la perturbation des déplacements chimiques

C'est la technique la plus utilisée pour cartographier l'interface résultant de l'interaction entre une protéine et son ligand. Le récepteur est marqué en ^{15}N et le ligand, non marqué, est utilisé pour les titrations. Les perturbations des déplacements chimiques du récepteur sont visualisées en suivant les différents spectres HSQC (^1H , ^{15}N) effectués à diverses concentrations du ligand. Les déplacements chimiques des noyaux H^{N} et ^{15}N du récepteur sont très sensibles à leur environnement chimique local. De faibles changements au niveau de l'environnement immédiat de ces atomes lors d'une titration par un ligand, même ayant une faible affinité, peuvent être détectés et utilisés pour identifier la surface de contact avec la protéine [2.63]. Les atomes des résidus qui ne participent pas à l'interaction ne verront pas leurs déplacements chimiques perturbés sauf dans le cas où la fixation du ligand entraîne des réarrangements conformationnels additionnels hors du site de fixation. Remarquons à ce stade que grâce à la grande sensibilité de l'expérience HSQC (^1H , ^{15}N), les mesures peuvent être entreprises à des concentrations de l'ordre de la centaine de micromolaire pour le récepteur, ce qui est très pratique dans le domaine de recherche des cibles thérapeutiques, comme dans le cas des études de relations structure-activité, où l'obtention d'une concentration importante en protéine est difficile à obtenir [2.64].

Pour quantifier la perturbation subie par le déplacement chimique lors d'un échange rapide, la plupart des auteurs utilisent une relation vectorielle reliant le déplacement chimique des noyaux des atomes ^{15}N et H^{N} . Il n'y a pas d'unanimité sur la formule à appliquer [2.60, 2.65–2.67]. A cause de la difficulté d'établir une relation précise entre la cartographie de l'interaction et le déplacement chimique des acides aminés la constituant, la valeur de la différence entre les déplacements chimiques des états libre et complexé doit être retenue comme une valeur indicative ; les résultats obtenus ne sont significatifs que si les fréquences perturbées appartiennent à des résidus regroupés et très proches de la surface de la protéine. Il est également possible de calculer la constante d'affinité à partir de l'équation (2.10) en prenant en compte les noyaux perturbés.

Dans le cas d'un échange lent, l'intensité des pics de l'expérience HSQC (^1H , ^{15}N) peut être évaluée par intégration pour déterminer une valeur approximative de la constante de dissociation K_D à partir de l'équation (2.12). Une réattribution est nécessaire pour estimer la différence entre les déplacements chimiques des formes libre et liée et pour utiliser la formule (2.10) afin d'identifier la zone d'interaction entre le récepteur et le ligand.

La cartographie de la perturbation des déplacements chimiques permet de visualiser la zone d'interaction mais ne permet pas de caractériser les interactions au niveau atomique [2.68].

2.3.2.2 Transfert d'aimantation

Les cas d'un échange lent et d'un échange intermédiaire sont plus difficiles à analyser. La cartographie de l'interface d'interaction est plus complexe. Un certain nombre de pics s'élargissent en passant de la forme libre à la forme liée au cours d'un échange chimique intermédiaire. La détermination de la surface d'interaction en est donc rendue plus difficile. Dans ce cas, la caractérisation de l'interface entre les deux partenaires peut être résolue en utilisant la méthode de transfert d'aimantation. Suivant le même procédé que le transfert nOe, on irradie les protons d'un ligand non marqué de telle façon que l'aimantation soit alors transférée vers certains noyaux de la protéine marquée (en ^{15}N par exemple) se trouvant au niveau du site actif (figure 2.12, page suivante). Cette étude peut être réalisée par exemple, au moyen d'une expérience HSQC (^1H , ^{15}N). Le résidu appartenant au récepteur et dont la corrélation $\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ varie en intensité se situe alors très près de l'interface. L'expérience est répétée plusieurs fois en variant l'intensité de saturation *via* le temps d'irradiation. Elle nécessite au minimum que l'un des deux partenaires soit enrichi en ^{15}N , l'autre ayant des protons proches de l'interface et dont les fréquences propres ne se superposent pas avec celles des protons de son partenaire. Un moyen alternatif est de deutérier le partenaire recevant le transfert d'aimantation, ce qui permet d'irradier l'autre partenaire sur toute l'intervalle de fréquence des protons aliphatiques. La deutération permet également de diminuer la diffusion de spins et d'augmenter ainsi la sensibilité. L'attribution des noyaux ^{15}N et H^{N} de la protéine marquée doit également être connue ainsi que sa structure tridimensionnelle. Cette méthode est plus précise pour la caractérisation du site actif que la cartographie des déplacements chimiques car le transfert d'aimantation ne tient pas compte des fluctuations conformationnelles possibles liées à la fixation du ligand à son récepteur.

2.3.2.3 Cartographie par mesure de dynamique moléculaire

Les études de dynamique des protéines par RMN constituent un large champ d'investigation. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons uniquement à l'apport de la dynamique dans les études d'interaction. L'interaction entre deux partenaires peut entraîner une perturbation dynamique au niveau de l'interface : dans certains cas, il va y avoir une modification de la dynamique qui va permettre d'identifier les zones d'inter-

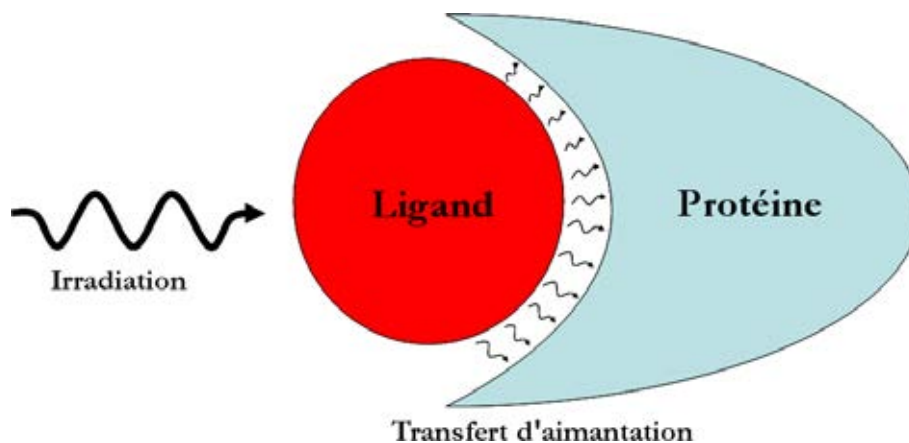


Figure 2.12 – Schéma décrivant la méthode de transfert d'aimantation.

action [2.69, 2.70], dans d'autres cas cela ne sera pas possible [2.66, 2.71]. Le principal paramètre étudié est la mesure de la relaxation transversale R_2 [2.72] mais d'autres comme le temps de corrélation à partir de R_1 et R_2 ainsi que la relaxation croisée hétéronucléaire nOe ont été également reportées [2.66].

Le cas où la région du site actif possède une dynamique particulière tendant à favoriser la fixation du ligand est idéal pour les études d'interaction par dynamique moléculaire ; la dynamique conduit alors à plusieurs conformations particulières. Lorsque le ligand se situe dans le site actif, une seule de ces conformations est stabilisée, ce qui induit des changements significatifs au niveau de la dynamique résultante de la protéine. Malheureusement, l'exemple précédent n'est pas le cas général : dans le cas de l'étude des interactions, par dynamique moléculaire entre un octapeptide et le domaine SH2 d'une phospholipase, où les résidus du site actif forment une poche hydrophobe, ces derniers n'ont pas été affectés par la présence du peptide au vu des valeurs d'ordre (S_{axis}^2) calculées à partir des données de relaxations longitudinale et transversale [2.71].

Il semblerait que l'étude dynamique d'une protéine lors de la fixation d'un ligand ne soit pas un moyen idéal pour déterminer avec certitude les composants de l'interface. En effet les protéines sont des molécules adaptables qui peuvent changer leur conformation spatiale lors de la fixation d'un ligand. Par contre, une modification de la dynamique de la protéine à l'approche d'un ligand peut être intéressante pour caractériser des réarrangements structuraux au sein de la protéine.

2.3.2.4 Échange des protons amidiques

Une autre technique est celle utilisant le phénomène d'échange des protons amidiques par ceux provenant du solvant H_2O [2.73]. L'échange des protons amidiques par des deutérons s'effectue à des vitesses différentes (de la minute à plusieurs mois) suivant leur accessibilité au solvant. Dans le cas des études d'interaction, il est possible de supposer que les protons amidiques présents à l'interface seront moins accessibles au solvant. Plusieurs expériences HSQC (^1H , ^{15}N) à des temps chronologiquement différents permettent de connaître les protons amidiques qui s'échangent le plus lentement et donc qui sont susceptibles d'être en interaction avec le ligand. Afin de ne prendre en compte que les H^{N} à l'interface et ainsi exclure les H^{N} enfouis au coeur de la protéine, l'expérience est également effectuée sans la présence du ligand.

Dans le cas de ces expériences, il est préférable que le ligand soit une autre macromolécule (protéine, ADN ou ARN) et que le complexe soit très stable. Le cas le plus simple est l'interaction anticorps-antigène. Par cette méthode, les épitopes de la protéine Derp2 ont pu être identifiés par des mesures d'échange protonique en présence et absence d'un anticorps monoclonal [2.74]. Par contre, certaines expériences montrent qu'une grande partie de la protéine voit son accessibilité au solvant modifiée lors de la fixation d'un ligand [2.75]. C'est principalement le cas lorsqu'il y a un réarrangement conformationnel dû à la fixation du ligand. Dans certains cas, il est également possible que la faculté d'accessibilité ne se situe pas au niveau de l'interface [2.76].

2.3.3 Détermination de contraintes géométriques

Les expériences décrites ci-dessus permettent d'avoir une indication rapide de l'interface mais avec une faible résolution. De plus, dans le cas d'une interaction protéine-protéine, il est possible d'inverser les rôles ligand-récepteur et de connaître ainsi les zones d'interaction pour chacun des deux partenaires. Par contre, ces seules expériences ne sont pas suffisamment précises pour connaître les groupements fonctionnels et les atomes importants dans l'interaction des deux partenaires. Pour cela il existe d'autres expériences RMN permettant d'obtenir des contraintes géométriques non ambiguës et notamment des contraintes de distance afin de déterminer avec précision la structure du complexe. Ces techniques complètent les techniques de cartographie mais nécessitent plus de temps dans l'interprétation des résultats.

2.3.3.1 Expériences NOESY filtrées

La méthode conduisant à des informations non ambiguës sur les interactions présentes nécessite l'utilisation de l'effet nOe. La mesure des distances interprotoniques intermoléculaires permet d'obtenir avec précision la structure du complexe au niveau de l'interface ; celle des contraintes de distances intramoléculaires favorise la détermination de la structure des protéines.

En pratique, la difficulté réside dans la distinction entre les deux types de nOe observés : les nOe intramoléculaires et intermoléculaires. De plus, lors de l'étude des interactions entre une protéine et un peptide, il est nécessaire de supprimer le signal de la protéine afin de pouvoir attribuer les corrélations propres au ligand. Afin de remédier à tous ces problèmes, les expériences de NOESY éditée [2.28] et NOESY filtrée [2.77] permettent de séparer sans ambiguïté les nOe internes à une protéine des nOe intermoléculaires dans le complexe. Ces expériences sont particulièrement utiles lors de l'étude de deux macromolécules. Pour cela, les deux partenaires ne doivent pas avoir le même marquage isotopique. Par exemple un des partenaires n'est pas marqué (^{14}N et ^{12}C) alors que l'autre est marqué avec au moins un isotope (^{15}N et/ou ^{13}C) (figure 2.13). Il est également possible d'utiliser un isotope pour le premier partenaire (^{15}N) différent de celui du deuxième partenaire (^{13}C).

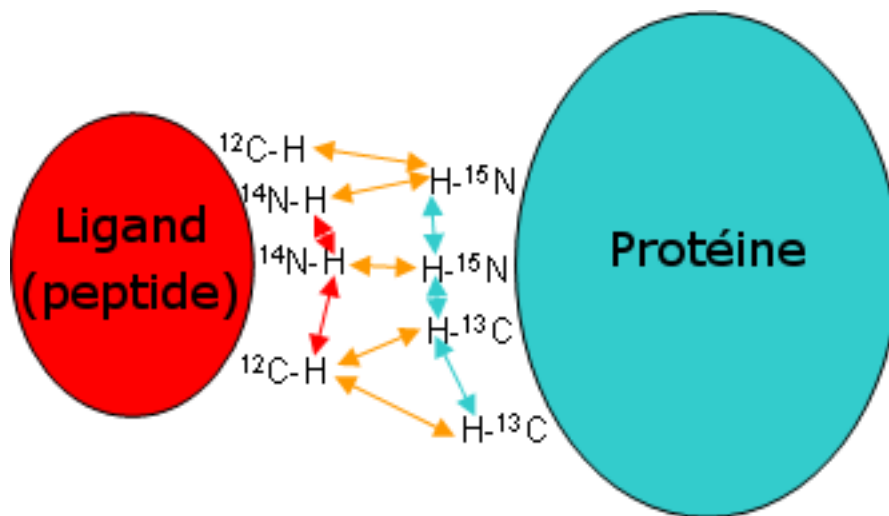


Figure 2.13 – Représentation schématique des corrélations intramoléculaires (rouge et bleu) et intermoléculaires (orange) pouvant être discriminées par l'utilisation des expériences NOESY éditée/filtrée.

A partir de ces expériences, il est possible de sélectionner les corrélations nOe en fonction de l'isotope lié aux protons. Par exemple, une NOESY éditée ^{15}N , dans la première

dimension, permet de ne visualiser que les corrélations entre un proton porté par un ^{15}N avec tous les autres protons (^1H - ^{14}N , ^1H - ^{12}C , ^1H - ^{15}N et ^1H - ^{13}C). En combinant des séquences filtrées et éditées, il est ainsi possible de séparer le signal inhérent aux corrélations intra et intermoléculaires (tableau 2.3).

Position des filtres dans les dimensions	Type de corrélation observée
Filtrage en F1 et Filtrage en F2	non marqué / non marqué
Filtrage en F1 et Édition en F2	non marqué / marqué
Édition en F1 et Filtrage en F2	marqué / non marqué
Édition en F1 et Édition en F2	marqué / marqué

Tableau 2.3 – Expérience NOESY utilisant deux demi-filtres [2.77]. Un filtre est appliqué dans la dimension du noyau marqué (^{15}N ou ^{13}C) caractérisé par un pulse π ($2 \times \pi/2$). En fonction de l'application ou non de cette impulsion, il est possible de filtrer ou d'éditer les corrélations intéressantes. La stratégie de Otting et Wüthrich [2.77] consiste à acquiesionner simultanément 4 spectres et à les combiner. En fonction des combinaisons de ces 4 spectres (addition, soustraction), on peut extraire des corrélations intra ou intermoléculaires.

L'interprétation des données est ensuite identique à celle issue d'un spectre NOESY normal où l'intensité des pics est inversement proportionnelle à la puissance 6 de la distance r entre les deux protons (r^{-6}). Cette méthode est seulement applicable dans le cas d'une forte interaction entre les deux partenaires. Elle a été largement utilisée pour les études d'interaction entre des protéines marquées et une séquence d'acides nucléiques, comme c'est le cas entre le répresseur *lac* protéique et l'opérateur *lac* ADN [2.78], mais également pour résoudre des complexes protéine-protéine [2.79].

2.3.3.2 Les sondes paramagnétiques

Des contraintes de distance peuvent également être calculées à partir de l'élargissement des pics de résonance dû à un effet paramagnétique pour les résidus marqués. La plupart du temps, une sonde magnétique possédant un radical nitroxyde libre est liée chimiquement à une cystéine via une liaison thio-ester (figure 2.14, page ci-contre). Des calculs de relaxations transversale et longitudinale sont effectués en présence de la sonde paramagnétique sous sa forme nitroxyde. Ensuite, la sonde est réduite sous une forme diamagnétique (hydroxylamine) par addition de deux équivalents d'acide-L-ascorbique, et les expériences de relaxation sont alors renouvelées [2.80]. L'élargissement des raies est alors proportionnel (facteur r^{-6}) à la distance entre le noyau étudié et la sonde [2.81].

Pour utiliser une sonde paramagnétique, la protéine doit posséder une seule cystéine libre. Dans la plupart des cas, il est nécessaire de produire des mutants contenant une

cystéine accessible dont sa position spatiale est connue au niveau de la protéine. La sonde utilisant un radical nitroxyde libre permet de visualiser des changements de relaxation dans un rayon de 20 Å environ. Dans le cas d'étude de gros complexes où l'on ne connaît pas le site d'interaction, il est nécessaire de produire plusieurs mutants en jouant sur la position des cystéines [2.82].

Cette méthode a été mise en œuvre pour déterminer la structure du complexe entre un anticorps TE33 et un antigène de nature peptidique en plus des expériences NOESY classiques [2.83]. Elle a été également utilisée pour identifier l'interface entre une protéine chaperonne DnaK et un peptide [2.84]. Une autre utilisation de cette méthode a permis de casser la symétrie d'un homodimère, ce qui a permis de différencier les corrélations nOe intra et intermoléculaires [2.85].

Le principal problème de cette technique est la présence de la sonde elle-même qui peut interagir avec la protéine et modifier sa structure. De plus, la flexibilité de la sonde et notamment, celle du bras espaceur, peut engendrer des erreurs au niveau des estimations de distance, de l'ordre de 1 à 2 Å [2.86, 2.87].

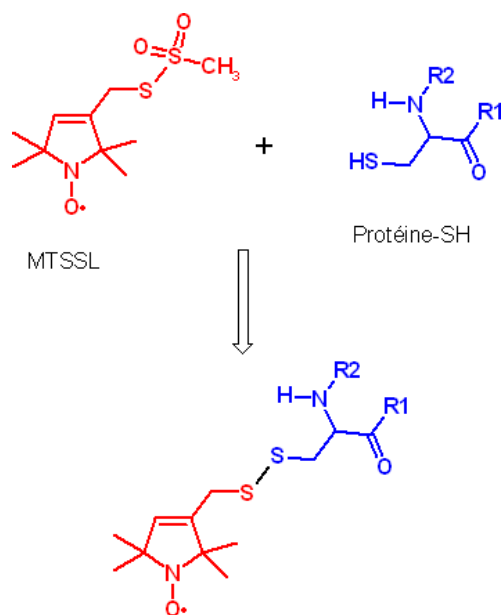


Figure 2.14 – Exemple de sonde paramagnétique. La liaison entre la cystéine en bleu et la sonde MTTSL (*pour methanethiosulfonate spin-label*) en rouge est composée de 5 angles dièdres engendrant une flexibilité qui doit être prise en compte dans les calculs de distance.

2.3.3.3 Utilisation des constantes de couplage dipolaire

Dans un milieu isotrope, la valeur des couplages dipolaires, entre les noyaux d'une protéine soumise aux mouvements browniens, n'est pas constante mais tend vers zéro. Dans le cas où le mouvement de la protéine est restreint par l'utilisation d'une solution micellaire diluée [2.88] ou de phages filamenteux [2.89], le milieu devient alors anisotrope, il est donc possible de calculer une constante dipolaire résiduelle. Comme décrit dans le paragraphe 2.2.3.1, page 51, les CDR, permettent d'avoir une idée sur l'orientation d'un vecteur (principalement ^1H - ^{15}N) et par conséquent sur la structure du squelette peptidique.

Cette méthode est maintenant également utilisée pour connaître l'orientation relative des domaines présents dans les grosses protéines [2.90] ou dans les complexes protéiques [2.91]. Si l'on considère le cas d'un complexe entre deux protéines et si la structure de ces deux protéines sous leur forme libre est connue, les orientations moyennes des vecteurs entre les deux protéines peuvent être déduites à partir des orientations des axes de chaque protéine prise individuellement. La mesure des couplages dipolaires reflète l'orientation de ces dipôles vis-à-vis du champ magnétique. Si les intensités des vecteurs pour les deux protéines sont égales, il est fort probable que ces dernières sont coordonnées et forment une seule entité. Les axes des deux protéines doivent alors être colinéaires ce qui permet de définir l'orientation d'une protéine par rapport à l'autre. Des programmes informatiques peuvent ensuite utiliser ces valeurs pour ajuster au mieux l'orientation des deux protéines.

2.3.3.4 L'approche par arrimage

L'approche par arrimage (docking) n'est pas une technique RMN à proprement parler, mais certains programmes permettent d'implanter des données RMN afin de diminuer considérablement le nombre des possibilités d'interaction entre deux partenaires. La condition pour utiliser ces programmes est de connaître la structure tridimensionnelle des deux partenaires sous leur forme libre et que cette dernière ne change pas énormément lors de l'interaction. Par exemple, les changements observés dans certains déplacements chimiques à partir d'une expérience HSQC (^1H , ^{15}N) peuvent être utilisés pour générer des contraintes intermoléculaires ambiguës. Dans le cas du logiciel HADDOCK, les données RMN sont incluses pour prédire la structure du complexe [2.92].

Pour chaque interface choisie aléatoirement entre les molécules, une minimisation de l'énergie, en conservant la structure rigide, est effectuée; ensuite, un recuit simulé est effectué pour autoriser le mouvement des chaînes latérales afin d'optimiser l'interaction. Le calcul est répété de nombreuses fois en changeant la position des molécules l'une

envers l'autre afin d'explorer toutes les possibilités d'interaction. Une analyse par lot est ensuite nécessaire afin de prédire le meilleur modèle d'interaction. Le point fort du logiciel HADDOCK provient de l'analyse statistique des résultats obtenus.

Une approche similaire, qui inclut les mesures de CDR, a été décrite afin d'avoir des informations sur l'orientation relative des deux protéines [2.93]. Ce programme fait appel à un terme supplémentaire dans le calcul d'énergie : le rayon de giration. Dans les deux cas, les contraintes de distance nOe peuvent être ajoutées afin de diminuer le nombre de faux positifs ce qui conduit à une meilleure résolution du complexe.

2.4 Conclusion

La RMN des protéines est une technique relativement récente. La première structure tridimensionnelle complète d'une protéine, déterminée par cette méthode, ne date que de 1985 [2.94]. La limite principale de la RMN, qui est la taille des macromolécules (recouvrements spectraux, augmentation de la vitesse de relaxation transversale) ne cesse d'être repoussée par la course aux champs magnétiques élevés, la mise en place du marquage isotopique et le développement de nombreuses et nouvelles séquences d'impulsion. La spectroscopie RMN est une méthode idéale pour les études des interactions entre les protéines et les autres molécules en solution et à un niveau de résolution atomique.

L'étude de la signalisation cellulaire à travers les interactions fait suite aux grands travaux de la génomique. La connaissance de nombreux génomes ne permet pas de comprendre le fonctionnement des cellules. La protéomique et notamment l'étude des interactions ont pour but de relier les gènes aux réponses cellulaires, *via* l'étude des protéines. La RMN est donc un outil puissant pour ce type d'étude car elle permet de combiner étude en solution avec résolution atomique.

Des méthodes comme la cartographie des déplacements chimiques et le transfert de saturation caractérisent assez facilement le domaine interfacial mais avec une faible résolution. Dans le cas où une résolution atomique est importante, la détermination des nOe, l'utilisation des mesures de CDR et des sondes paramagnétiques vont permettre d'affiner la résolution du complexe et donc d'améliorer la compréhension des phénomènes à l'interface. Toutes ces méthodes peuvent être utilisées sur des complexes de grande taille grâce à l'incorporation de la séquence TROSY dans la majorité des séquences d'impulsions. Avec l'expérience TROSY, qui permet d'obtenir des raies de résonance fines malgré la taille du complexe, il n'y a théoriquement plus de limite de taille pour les expériences utilisant les corrélations de type $^1\text{H}-^{15}\text{N}$. Expérimentalement, les raies de grosses molécules peuvent

néanmoins être élargies et dans ce cas, un marquage spécifique de certains résidus ou d'un seul domaine peut être utile.

Ces méthodes ont permis d'étudier des complexes dont la taille est supérieure à 50 kDa. L'équipe de Wüthrich, en utilisant la plupart des avancées décrites ci-dessus, a déterminé l'interface d'un complexe dont la taille est de l'ordre de 900 kDa [2.25].

Une partie de ces méthodes a été appliquée pour l'étude de la MsrB de *N. meningitidis*. Les chapitres 3 et 4 constituent les résultats obtenus durant mon travail de thèse.

Bibliographie

- [1] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, and A.G. Palmer. *Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice*. Academic Press, New York, 1996.
- [2] O. Jardetzky and G.C.K. Roberts. *NMR in Molecular Biology*. Academic Press, New York, 1981.
- [3] A. Abragam. *Principles of Nuclear Magnetism*. Clarendon Press, Oxford, 1961.
- [4] P. J. Hajduk, T. Gerfin, J. M. Boehlen, M. Haberli, D. Marek, and S. W. Fesik. High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening. *J Med Chem*, 42 :2315–7, 1999.
- [5] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wuthrich. Attenuated t2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to nmr structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 :12366–71, 1997.
- [6] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, and K. Wuthrich. Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution nmr with very large molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 :4918–23, 1999.
- [7] M. Salzmann, G. Wider, Pervushin K., H. Senn, and K. Wüthrich. Trosy-type resonance experiments for sequential nmr assignments of large proteins. *J Am Chem Soc*, 121 :844–8, 1999.
- [8] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, and K. Wuthrich. [13c]-constant-time [15n,1h]-trosy-hnca for sequential assignments of large proteins. *J Biomol NMR*, 14 :85–8, 1999.
- [9] J. P. Loria, M. Rance, and 3rd Palmer, A. G. Transverse-relaxation-optimized (trosy) gradient-enhanced triple-resonance nmr spectroscopy. *J Magn Reson*, 141 :180–4, 1999.
- [10] K. Pervushin, V. Gallius, and C. Ritter. Improved trosy-hnca experiment with suppression of conformational exchange induced relaxation. *J Biomol NMR*, 21 :161–6, 2001.
- [11] P. Permi and A. Annala. A new approach for obtaining sequential assignment of large proteins. *J Biomol NMR*, 20 :127–33, 2001.
- [12] A. Meissner and O. W. Sorensen. Sequential hncacb and cbcanh protein nmr pulse sequences. *J Magn Reson*, 151 :328–31, 2001.
- [13] Y. Xia, K. H. Sze, P. C. Shaw, and G. Zhu. Protein dynamics measurements by 3d hnco based nmr experiments. *Spectroc-Int J*, 16 :1–13, 2002.

- [14] N. K. Goto and L. E. Kay. New developments in isotope labeling strategies for protein solution nmr spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 10 :585–92, 2000.
- [15] G. Wagner. Prospects for nmr of large proteins. *J Biomol NMR*, 3 :375–85, 1993.
- [16] G. M. Clore and A. M. Gronenborn. Structures of larger proteins in solution : three- and four-dimensional heteronuclear nmr spectroscopy. *Science*, 252 :1390–9, 1991.
- [17] M. K. Rosen, K. H. Gardner, R. C. Willis, W. E. Parris, T. Pawson, and L. E. Kay. Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins. *J Mol Biol*, 263 :627–36, 1996.
- [18] R. Xu, B. Ayers, D. Cowburn, and T. W. Muir. Chemical ligation of folded recombinant proteins : segmental isotopic labeling of domains for nmr studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 :388–93, 1999.
- [19] T. Otomo, K. Teruya, K. Uegaki, T. Yamazaki, and Y. Kyogoku. Improved segmental isotope labeling of proteins and application to a larger protein. *J Biomol NMR*, 14 :105–14, 1999.
- [20] D. Cowburn, A. Shekhtman, R. Xu, J. J. Ottesen, and T. W. Muir. Segmental isotopic labeling for structural biological applications of nmr. *Methods Mol Biol*, 278 :47–56, 2004.
- [21] Perler FB. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis : structure, function, and evolution. *Cell*, 92 :1–4, 1998.
- [22] S. Grzesiek, J. Anglister, H. Ren, and A. Bax. ^{13}C line narrowing by 2h decoupling in $2\text{h}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins – application to triple-resonance 4d j-connectivity of sequential amides. *J Am Chem Soc*, 115 :4369–70, 1993.
- [23] T. Yamazaki, W. Lee, C. H. Arrowsmith, D. R. Muhandiram, and L. E. Kay. A suite of triple-resonance nmr experiments for the backbone assignment of ^{15}N , ^{13}C , 2h -labeled proteins with high-sensitivity. *J Am Chem Soc*, 116 :11655–66, 1994.
- [24] K. H. Gardner and L. E. Kay. The use of 2h , ^{13}C , ^{15}N multidimensional nmr to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27 :357–406, 1998.
- [25] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, and K. Wuthrich. Nmr analysis of a 900k groel groes complex. *Nature*, 418 :207–11, 2002.
- [26] V. Tugarinov, R. Muhandiram, A. Ayed, and L. E. Kay. Four-dimensional nmr spectroscopy of a 723-residue protein : chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase g. *J Am Chem Soc*, 124 :10025–35, 2002.
- [27] K. Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley & Son, 1986.

- [28] S. W. Fesik, J. R. Luly, J. W. Erickson, and C. Abad-Zapatero. Isotope-edited proton nmr study on the structure of a pepsin/inhibitor complex. *Biochemistry*, 27 :8297–301, 1988.
- [29] S. Grzesiek and A. Bax. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Biomol NMR*, 3 :185–204, 1993.
- [30] M. Sattler, J. Schleucher, and C. Griesinger. Heteronuclear multidimensional nmr experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 34 :93–158, 1999.
- [31] G. W. Vuister and A. Bax. Measurement of four-bond hn-h alpha j-couplings in staphylococcal nuclease. *J Biomol NMR*, 4 :193–200, 1994.
- [32] D. S. Wishart, B. D. Sykes, and F. M. Richards. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol*, 222 :311–33, 1991.
- [33] S. Spera and A. Bax. Empirical correlation between protein backbone conformation and c.alpha. and c.beta. ^{13}C nuclear magnetic resonance chemical shifts. *J Am Chem Soc*, 113 :5490–5492, 1991.
- [34] D. S. Wishart and B. D. Sykes. Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol*, 239 :363–92, 1994.
- [35] S. P. Mielke and V. V. Krishnan. An evaluation of chemical shift index-based secondary structure determination in proteins : influence of random coil chemical shifts. *J Biomol NMR*, 30 :143–53, 2004.
- [36] G. Cornilescu, F. Delaglio, and A. Bax. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR*, 13 :289–302, 1999.
- [37] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, 7 :95–9, 1963.
- [38] N. Coudevylle, A. Thureau, C. Hemmerlin, E. Gelhaye, J. P. Jacquot, and M. T. Cung. ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the reduced form of thioredoxin h1 from poplar, a cppc active site variant. *J Biomol NMR*, 30 :229–30, 2004.
- [39] N. Coudevylle, A. Thureau, S. Azza, S. Boshi-Muller, G. Branlant, and M. T. Cung. (^1H) , (^{13}C) and (^{15}N) resonance assignment of the reduced form of methionine sulfoxide reductase a from escherichia coli. *J Biomol NMR*, 30 :363–4, 2004.

- [40] G. T. Montelione, B. A. Lyons, S. D. Emerson, and M. Tashiro. An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins. *J Am Chem Soc*, 114 :10974–5, 1992.
- [41] Kay L. E., Xu G. Y., Singer A. U., Muhandiram D. R., and Formankay J. D. A gradient-enhanced hcch-tocsy experiment for recording side-chain ^1H and ^{13}C correlations in H_2O samples of proteins. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, 101 :333–7, 1993.
- [42] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst. Investigation of exchange processes by two dimensional nmr spectroscopy. *J Chem Phys*, 71, 1979.
- [43] D. Neuhaus and M. Williamson. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. VCH publishers, New York, 1989.
- [44] N. Coudeville, A. Thureau, C. Hemmerlin, E. Gelhaye, J. P. Jacquot, and M. T. Cung. Solution structure of a natural cpc active site variant, the reduced form of thioredoxin h1 from poplar. *Biochemistry*, 44 :2001–8, 2005.
- [45] M. T. Cung, M. Marraud, and J. Neel. Experimental calibration of a karplus relationship in order to study the conformations of peptides by nuclear magnetic resonance. *Macromolecules*, 7 :606–13, 1974.
- [46] M. Karplus. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J Chem Phys*, 30 :11–5, 1959.
- [47] C. Gayathri, A. A. Bothnerby, P. C. M. Vanzijl, and C. Maclean. Dipolar magnetic-field effects in nmr-spectra of liquids. *Chem Phys Lett*, 87 :192–6, 1982.
- [48] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, and J. H. Prestegard. Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins : information for structure determination in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 :9279–83, 1995.
- [49] A. Bax. Weak alignment offers new nmr opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci*, 12 :1–16, 2003.
- [50] L. Spyropoulos. Thermodynamic interpretation of protein dynamics from nmr relaxation measurements. *Protein Pept Lett*, 12 :235–40, 2005.
- [51] D. Auerbach, S. Thaminy, M. O. Hottiger, and I. Stagljar. The post-genomic era of interactive proteomics : facts and perspectives. *Proteomics*, 2 :611–23, 2002.
- [52] R. C. Liddington. Structural basis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 261 :3–14, 2004.

- [53] S. J. Wodak and R. Mendez. Prediction of protein-protein interactions : the capri experiment, its evaluation and implications. *Curr Opin Struct Biol*, 14 :242–9, 2004.
- [54] A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest, and W. Baumeister. From words to literature in structural proteomics. *Nature*, 422 :216–25, 2003.
- [55] E. R. Zuiderweg, L. F. Hamers, H. S. Rollema, S. H. de Bruin, and C. W. Hilbers. 31p nmr study of the kinetics of binding of myo-inositol hexakisphosphate to human hemoglobin. observation of fast-exchange kinetics in high-affinity systems. *Eur J Biochem*, 118 :95–104, 1981.
- [56] F. W. Muskett, T. A. Frenkiel, J. Feeney, R. B. Freedman, M. D. Carr, and R. A. Williamson. High resolution structure of the n-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and characterization of its interaction site with matrix metalloproteinase-3. *J Biol Chem*, 273 :21736–43, 1998.
- [57] N. A. van Nuland, G. J. Kroon, K. Dijkstra, G. K. Wolters, R. M. Scheek, and G. T. Robillard. The nmr determination of the iia(mtl) binding site on hpr of the escherichia coli phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system. *FEBS Lett*, 315 :11–5, 1993.
- [58] M. A. Weiss, J. L. Eliason, and D. J. States. Dynamic filtering by two-dimensional 1h nmr with application to phage lambda repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 :6019–23, 1984.
- [59] A. P. Campbell and B. D. Sykes. Theoretical evaluation of the two-dimensional transferred nuclear overhauser effect. *J Magn Reson*, 93 :77–92, 1991.
- [60] B. Meyer and T. Peters. Nmr spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 42 :864–90, 2003.
- [61] M. T. Cung, P. Demange, M. Marraud, V. Tsikaris, C. Sakarellos, I. Papadouli, A. Kokla, and S. J. Tzartos. Two-dimensional 1h-nmr study of antigen-antibody interactions : binding of synthetic decapeptides to an anti-acetylcholine receptor monoclonal antibody. *Biopolymers*, 31 :769–76, 1991.
- [62] A. Phan-Chan-Du, C. Hemmerlin, D. Krikorian, M. Sakarellos-Daitsiotis, V. Tsikaris, C. Sakarellos, M. Marinou, A. Thureau, M. T. Cung, and S. J. Tzartos. Solution conformation of the antibody-bound tyrosine phosphorylation site of the nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit in its phosphorylated and nonphosphorylated states. *Biochemistry*, 42 :7371–80., 2003.
- [63] D. Nietlispach, H. R. Mott, K. M. Stott, P. R. Nielsen, A. Thiru, and E. D. Laue. Structure determination of protein complexes by nmr. *Methods Mol Biol*, 278 :255–88, 2004.

- [64] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, and S. W. Fesik. Discovering high-affinity ligands for proteins : Sar by nmr. *Science*, 274 :1531–4, 1996.
- [65] L. M. Rooney, Sachchidanand, and J. M. Werner. Characterizing domain interfaces by nmr. *Methods Mol Biol*, 278 :123–38, 2004.
- [66] D. M. Jacobs, K. Saxena, M. Vogtherr, P. Bernado, M. Pons, and K. M. Fiebig. Peptide binding induces large scale changes in inter-domain mobility in human pin1. *J Biol Chem*, 278 :26174–82, 2003.
- [67] N. Kachel, K. S. Erdmann, W. Kremer, P. Wolff, W. Gronwald, R. Heumann, and H. R. Kalbitzer. Structure determination and ligand interactions of the pdz2b domain of ptp-bas (hptp1e) : splicing-induced modulation of ligand specificity. *J Mol Biol*, 334 :143–55, 2003.
- [68] E. R. Zuiderweg. Mapping protein-protein interactions in solution by nmr spectroscopy. *Biochemistry*, 41 :1–7, 2002.
- [69] M. J. Howard, H. J. Chauhan, G. J. Domingo, C. Fuller, and R. N. Perham. Protein-protein interaction revealed by nmr t(2) relaxation experiments : the lipoyl domain and e1 component of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of bacillus stearothermophilus. *J Mol Biol*, 295 :1023–37, 2000.
- [70] L. E. Kay, D. R. Muhandiram, G. Wolf, S. E. Shoelson, and J. D. Forman-Kay. Correlation between binding and dynamics at sh2 domain interfaces. *Nat Struct Biol*, 5 :156–63, 1998.
- [71] L. E. Kay, D. R. Muhandiram, N. A. Farrow, Y. Aubin, and J. D. Forman-Kay. Correlation between dynamics and high affinity binding in an sh2 domain interaction. *Biochemistry*, 35 :361–8, 1996.
- [72] H. Matsuo, K. J. Walters, K. Teruya, T. Tanaka, G. T. Gassner, S. J. Lippard, Y. Kyogoku, and Wagner G. Identification by nmr spectroscopy of residues at contact surfaces in large, slowly exchanging macromolecular complexes. *J Am Chem Soc*, 121 :9903–4, 1999.
- [73] S. W. Englander, L. Mayne, Y. Bai, and T. R. Sosnick. Hydrogen exchange : the modern legacy of linderstrom-lang. *Protein Sci*, 6 :1101–9, 1997.
- [74] G. A. Mueller, A. M. Smith, M. D. Chapman, G. S. Rule, and D. C. Benjamin. Hydrogen exchange nuclear magnetic resonance spectroscopy mapping of antibody epitopes on the house dust mite allergen der p 2. *J Biol Chem*, 276 :9359–65, 2001.
- [75] J. R. Engen, W. H. Gmeiner, T. E. Smithgall, and D. L. Smith. Hydrogen exchange shows peptide binding stabilizes motions in hck sh2. *Biochemistry*, 38 :8926–35, 1999.

- [76] S. Arumugam, C. L. Hemme, N. Yoshida, K. Suzuki, H. Nagase, M. Berjanskii, B. Wu, and S. R. Van Doren. Timp-1 contact sites and perturbations of stromelysin 1 mapped by nmr and a paramagnetic surface probe. *Biochemistry*, 37 :9650–7, 1998.
- [77] G. Otting and K. Wuthrich. Heteronuclear filters in two-dimensional [1h,1h]-nmr spectroscopy : combined use with isotope labelling for studies of macromolecular conformation and intermolecular interactions. *Q Rev Biophys*, 23 :39–96, 1990.
- [78] C. A. Spronk, A. M. Bonvin, P. K. Radha, G. Melacini, R. Boelens, and R. Kaptein. The solution structure of lac repressor headpiece 62 complexed to a symmetrical lac operator. *Structure Fold Des*, 7 :1483–92, 1999.
- [79] C. Zwahlen, P. Legault, S. J. F. Vincent, J. Greenblatt, R. Konrat, and L. E. Kay. Methods for measurement of intermolecular noes by multinuclear nmr spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 63 :9735–8, 1997.
- [80] W. L. Hubbell, H. S. McHaourab, C. Altenbach, and M. A. Lietzow. Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure*, 4 :779–83, 1996.
- [81] T. R. Krugh, J. W. Laing, and M. A. Young. Hydrogen-bonded complexes of the ribodinucleoside monophosphates in aqueous solution. proton magnetic resonance studies. *Biochemistry*, 15 :1224–8, 1976.
- [82] J. L. Battiste and G. Wagner. Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear overhauser effect data. *Biochemistry*, 39 :5355–65, 2000.
- [83] T. Scherf, R. Hiller, and J. Anglister. Nmr observation of interactions in the combining site region of an antibody using a spin-labeled peptide antigen and noesy difference spectroscopy. *Faseb J*, 9 :120–6, 1995.
- [84] H. Wang, A. V. Kurochkin, Y. Pang, W. Hu, G. C. Flynn, and E. R. Zuiderweg. Nmr solution structure of the 21 kda chaperone protein dnak substrate binding domain : a preview of chaperone-protein interaction. *Biochemistry*, 37 :7929–40, 1998.
- [85] V. Gaponenko, A. S. Altieri, J. Li, and R. A. Byrd. Breaking symmetry in the structure determination of (large) symmetric protein dimers. *J Biomol NMR*, 24 :143–8, 2002.
- [86] P. P. Borbat, H. S. McHaourab, and J. H. Freed. Protein structure determination using long-distance constraints from double-quantum coherence esr : study of t4 lysozyme. *J Am Chem Soc*, 124 :5304–14, 2002.

- [87] R. Langen, K. J. Oh, D. Cascio, and W. L. Hubbell. Crystal structures of spin labeled t4 lysozyme mutants : implications for the interpretation of epr spectra in terms of structure. *Biochemistry*, 39 :8396–405, 2000.
- [88] N. Tjandra and A. Bax. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by nmr in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, 278 :1111–4, 1997.
- [89] M. R. Hansen, L. Mueller, and A. Pardi. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol*, 5 :1065–74, 1998.
- [90] G. A. Mueller, W. Y. Choy, D. Yang, J. D. Forman-Kay, R. A. Venters, and L. E. Kay. Global folds of proteins with low densities of noes using residual dipolar couplings : application to the 370-residue maltodextrin-binding protein. *J Mol Biol*, 300 :197–212, 2000.
- [91] G. M. Clore. Accurate and rapid docking of protein-protein complexes on the basis of intermolecular nuclear overhauser enhancement data and dipolar couplings by rigid body minimization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 :9021–5, 2000.
- [92] C. Dominguez, R. Boelens, and A. M. Bonvin. Haddock : a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc*, 125 :1731–7, 2003.
- [93] G. M. Clore and C. D. Schwieters. Docking of protein-protein complexes on the basis of highly ambiguous intermolecular distance restraints derived from 1h/15n chemical shift mapping and backbone 15n-1h residual dipolar couplings using conjoined rigid body/torsion angle dynamics. *J Am Chem Soc*, 125 :2902–12, 2003.
- [94] M. P. Williamson, T. F. Havel, and K. Wuthrich. Solution conformation of proteinase inhibitor iia from bull seminal plasma by 1h nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol*, 182 :295–315, 1985.

Chapitre 3

Étude de la MsrB réduite de *N. meningitidis*

Sommaire

3.1	Production et purification	84
3.1.1	Production en milieu minimum	84
3.1.2	Purification	85
3.1.2.1	Désintégration des cellules	85
3.1.2.2	Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	85
3.1.2.3	Filtration sur gel	85
3.1.2.4	Chromatographie échangeuse d'ions	85
3.1.2.5	Chromatographie hydrophobe	86
3.1.2.6	Concentration des protéines	86
3.2	Caractérisation structurale	87
3.2.1	Méthodes bio-informatiques	87
3.2.1.1	Introduction	87
3.2.1.2	Résultats	87
3.2.2	Dichroïsme circulaire	88
3.2.2.1	Introduction	88
3.2.2.2	Résultats	89
3.2.3	RMN bidimensionnelle hétéronucléaire	90
3.2.3.1	Introduction	90
3.2.3.2	Résultats	90
3.3	Étude RMN de la MsrB réduite	92
3.3.1	Attribution des atomes de la MsrB réduite	92

3.3.1.1	Atomes du squelette peptidique	92
3.3.1.2	Atomes des chaînes latérales	93
3.3.2	Note d'attribution : J. Biomol. NMR	96
3.3.3	Prédiction des structures secondaires	98
3.3.4	Expériences NOESY	99
3.4	Conclusion	100
	Bibliographie	102

Chez les bactéries du genre *Neisseria*, il n'existe pas de protéine MsrB. C'est le domaine C-terminal de la protéine PilB qui possède une activité Met-*R*-SO réductase (figure 1.6, page 15). Ce domaine C-terminal se situe après un domaine MsrA, qui réduit les Met-*S*-SO, et un domaine N-terminal, qui réduit les ponts disulfure intramoléculaires des domaines MsrA et MsrB de PilB [3.1]. Il a été montré que le domaine MsrB seul avait la même activité catalytique vis-à-vis du substrat Met-*R*-SO que la protéine PilB [3.2]. Dans la suite du manuscrit, je parlerai de la protéine MsrB de *N. meningitidis* bien que cela ne corresponde qu'au domaine C-terminal de la protéine PilB.

La MsrB sauvage de *N. meningitidis* peut se retrouver sous deux formes stables *in vivo* : la forme oxydée, caractérisée par la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 117 et 63 et la forme réduite, caractérisée par la réduction de ces deux cystéines sous forme thiol. Mon projet fut de résoudre par RMN les structures tridimensionnelles de ces deux formes. En effet, la MsrB venait d'être découverte et aucune donnée structurale était connue. L'intérêt principal de l'étude de la MsrB par RMN est de connaître les différences et les points communs entre les protéines MsrA et MsrB du point de vue structural. En effet, ces deux protéines ont la même fonction MetSO réductase tout en ayant une stéréospécificité particulière au niveau du substrat.

En collaboration avec le laboratoire MAEM, nous avons donc entrepris la production de la MsrB simplement marquée ^{15}N et doublement marquée ^{15}N , ^{13}C . La première étape pour l'étude d'une protéine de taille moyenne par RMN est l'attribution séquentielle du squelette peptidique en utilisant des techniques RMN hétéronucléaires tridimensionnelles. L'étape suivante est l'attribution des atomes des chaînes latérales en vue d'obtenir des corrélations nOe indispensables pour le calcul d'une structure tridimensionnelle.

Avant de pouvoir faire les études par RMN, il nous a fallu produire et purifier la protéine MsrB afin d'obtenir une quantité suffisante de produit de l'ordre de la dizaine de milligramme. Je présenterai brièvement ce travail dans la première partie de ce chapitre. Dans une deuxième partie, nous verrons les différentes études réalisées pour caractériser la structuration de la MsrB réduite. Enfin, dans une troisième partie, je rapporterai l'attribution par RMN des différents types d'atomes de la MsrB réduite ainsi que les prédictions des structures secondaires qui en découlent.

3.1 Production et purification

Comme je l'ai mentionné précédemment, la production et la purification des MsrB a été effectuée avec la collaboration de l'équipe enzymologie du MAEM, dirigée par le Professeur Guy Branlant. C'est sous la conduite du Docteur Alexandre Olry que j'ai pu m'initier aux techniques de production et de purification des protéines.

Dans la première partie de ce chapitre, je parlerai brièvement des méthodes de production et de purification que j'ai utilisé pour obtenir un échantillon pur et marqué de la protéine MsrB de *N. meningitidis*.

3.1.1 Production en milieu minimum

La souche bactérienne utilisée pour la production de la MsrB marquée est celle de *E. coli* BL21 (DE3) : F⁻, *Ompt*, *hdsS_B* ($r_B^- m_B^-$) *gal*, *dcm*. Cette souche contient l'ORF (pour *Open Reading Frame*) codant la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *lac*. Le vecteur plasmidique contenant la séquence du gène MsrB également placé sous le contrôle du répresseur *lac* (pETMsrB) est un phagemide recombinant issu de pET-20b. L'antibiotique de résistance est la kanamycine.

Afin de pouvoir marquer la MsrB, nous avons fait développer les bactéries *E. coli* dans un milieu minimum dont la seule source d'azote est le chlorure d'ammonium (¹⁵NH₄Cl) à 1g/L et, comme unique source de carbone, le glucose (¹³C₆H₁₂O₆) à 4g/L. La composition du milieu est la suivante : NaCl (0,5 g/L), KH₂PO₄ (22 mM), Na₂HPO₄, 7H₂O (50 mM), riboflavine (1 mg/L), nicotinamide (1 mg/L), pyridoxine monohydrochloride (1 mg/L), thiamine (1 mg/L), MgSO₄, 7H₂O (2 mM), FeSO₄, 7H₂O (25 mg/L).

Après la transformation, qui constitue l'intégration du plasmide à l'intérieur des bactéries, celles-ci sont mises à développer sur un milieu solide pendant 12 heures. Une colonie isolée est ensuite prélevée et mise en pré-culture dans un milieu minimum liquide pendant une nuit. Les cultures sont ensuiteensemencées au 1/50^{ème} et incubées à 37°C en présence d'une concentration de 200 mg/mL de kanamycine. L'ajout de kanamycine permet de ne sélectionner que les souches bactériennes ayant intégrées le plasmide recombinant. Lorsque la DO (densité optique) à 600 nm est comprise entre 0,6 et 0,8, la quantité de bactéries est alors suffisante pour induire la synthèse de la T7 ARN polymérase par ajout de 1 mM d'IPTG. Cela conduit à la production, en grande quantité, d'ARN messager correspondant à la protéine MsrB. La culture est arrêtée trois heures après l'induction. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3000 g, lavées dans du tampon A (saccharose 25%, EDTA 5mM, Tris-HCl 50mM, pH 7,5), recentrifugées et conservées à -20°C.

3.1.2 Purification

La purification de la protéine s'effectue en présence de DTT à 50 mM ; ceci permet de conserver un milieu réducteur tout au long de la purification.

3.1.2.1 Désintégration des cellules

Le culot issu d'un litre de culture est repris dans 20 mL de tampon de purification (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2mM, pH 8,0). Les cellules sont ensuite désintégrées à une température de 4°C avec un désintégrateur de cellules (Constant Cell Disruption Systems, Constantsystems). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12000 g durant 45 min.

3.1.2.2 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Le surnageant de sonication est amené à 50% de saturation en sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) et précipité pendant 2 heures sous légère agitation à 4°C. A cette concentration en (NH₄)₂SO₄, les enzymes précipitent et sont récupérées dans le culot après centrifugation pendant 30 min à 12000 g.

3.1.2.3 Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA54 (acrylamide 5%, agarose 4%, BIOSEPRA[®]) dont le domaine de fractionnement se situe entre 5 et 70 KDa. L'élution se fait grâce au tampon de purification et est suivie par la mesure de la DO_{280 nm}. Une mesure de DO à 280 nm permet de confirmer la présence de protéines dans la solution. A l'inverse, la DO à 260 nm correspond à la présence d'ADN. La qualité des fractions est donc contrôlée par le rapport des lectures de DO à 280 et 260 nm et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE, 15%). Les fractions contenant la protéine sont ensuite rassemblées.

3.1.2.4 Chromatographie échangeuse d'ions

La solution protéique issue de la filtration sur gel est déposée sur une colonne échangeuse d'anions Q-Shéparose (agarose 6% sur laquelle sont gréffés des groupements triméthylammonium, Amersham Biosciences[®]). L'élution se fait par un gradient linéaire croissant de KCl de 0 à 200 mM sous un débit de 5 mL/min. La MsrB de *N. meningitidis* est éluée avec 50 mM de KCl.

3.1.2.5 Chromatographie hydrophobe

Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la MsrB de *N. meningitidis* sont amenées à une concentration finale de 1 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl Sepharose préparative (agarose 6% comportant des groupements phenyls, Amersham Biosciences®) équilibrée dans le tampon Tris-HCl (50 mM) EDTA (2 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 M), pH 8,0 et couplée au système FPLC (pour *Fast Protein Liquid Chromatography* : chromatographie liquide rapide pour les protéines). L'enzyme est ensuite éluée par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sous un débit de 5 mL/min.

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de suivre l'évolution de degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification (figure 3.1).

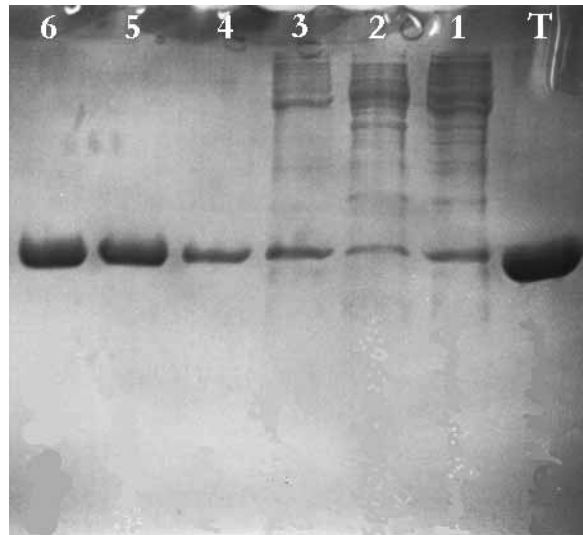


Figure 3.1 – Électrophorèse du mutant MsrB C117S ^{15}N à différentes étapes de purification. Le puit 1 correspond à un extrait du surnageant de sonication ; le puit 2, au surnageant de précipitation à 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ qui sera éliminé par la suite ; le puit 3, au culot de précipitation ; le puit 4, à la sortie de la colonne ACA54 ; le puit 5, à la sortie de colonne Q sépharose ; le puit 6, à la sortie de la colonne Phényl sépharose ; le puit T est le témoin contenant de la MsrB non marquée. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Comassie R-250.

3.1.2.6 Concentration des protéines

La solution enzymatique pure est finalement concentrée par ultra-filtration sous pression à l'aide d'une membrane Amicon YM10 jusqu'à une concentration de l'ordre de 20–25 DO/mL. La protéine est ensuite précipitée en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70% de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservée à -20°C .

3.2 Caractérisation structurale

Dans cette deuxième partie, je parlerai des études préliminaires effectuées pour avoir une idée sur la structuration de la MsrB réduite de *N. meningitidis*. La MsrB possède 146 résidus et à une taille de 16,4 KDa. Elle correspond au domaine C-Terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis* qui est délimité par les résidus Thr377 et Lys522.

3.2.1 Méthodes bio-informatiques

3.2.1.1 Introduction

Grâce à la bio-informatique, de nombreuses méthodes existent pour prédire, sans matériel biologique, les structures secondaires des protéines à partir de leur séquence. Nous avons utilisé un site en ligne *Network Protein Sequence @analysis*¹(NPS@) qui, à partir de plusieurs logiciels de prédiction, propose une séquence consensus des structures secondaires [3.3]. Ces logiciels, pour la plupart, se basent sur la probabilité qu'a un résidu de se retrouver plus facilement dans une structure plutôt qu'une autre. Bien que les logiciels de prédiction ne soient pas performants à 100%, ils permettent de connaître la prédisposition qu'a la protéine de se structurer. Ils nous donnent une information qui ne peut en aucun cas être considérée comme une preuve de la structuration ou non d'une protéine.

3.2.1.2 Résultats

L'analyse de la structure consensus nous donne une proportion de 22% d'hélices et 7,5% de feuillets, le reste (70,5 %) étant non structuré (figure 3.2, page suivante). Si l'on se fie seulement à ces indications, on peut dire que les résidus de la MsrB ne sont pas favorables au repliement de la molécule. Un alignement de séquence sur des séquences de protéines ayant une structure tri-dimensionnelle connue ne donnait que 7% d'identité et 20% d'homologie de séquence. Ce résultat n'est pas suffisant pour avoir une idée du repliement exact de la protéine. Un moyen expérimental simple, nécessitant peu de protéine, pour connaître la structuration globale de la MsrB de *N. meningitidis* est le dichroïsme circulaire.

¹<http://npsa-pbil.ibcp.fr>

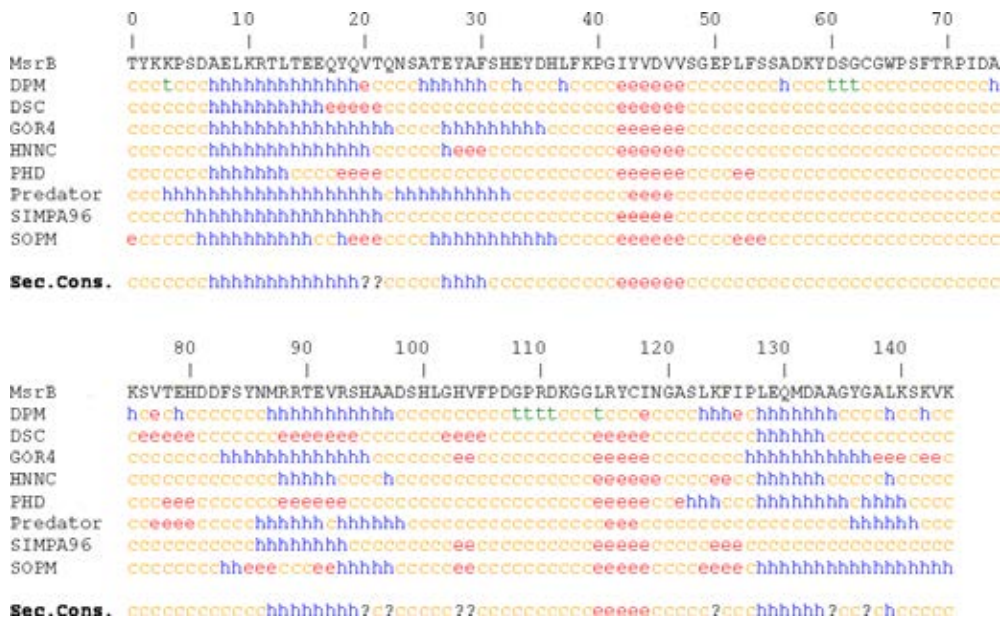


Figure 3.2 – Prédiction des structures secondaires de la MsrB à partir de plusieurs logiciels issus de NPS@. La séquence de la MsrB est située au dessus et sa numérotation est fonction de l’alignement avec la MsrB d’*E. coli*. Pour chaque prédiction, la lettre **c** correspond à la prédiction d’une zone non structurée ; la lettre **h**, à une hélice α ; la lettre **e**, à un brin β et la lettre **t**, à une boucle. La séquence consensus représente une combinaison des huit prédictions.

3.2.2 Dichroïsme circulaire

3.2.2.1 Introduction

Toutes les molécules biologiques sont des chromophores, c’est à dire des molécules qui absorbent la lumière. Dans le cas où ces molécules sont chirales, qui est le cas des protéines, elles peuvent donner naissance à un phénomène appelé dichroïsme circulaire (DC) qui consiste en l’absorption inégale de la composante circulaire droite (A_D) et gauche (A_G) de la lumière ($\Delta A = A_G - A_D$). Pour les protéines, l’essentiel du dichroïsme mesuré résulte de leurs structures secondaires. La contribution de chacun des résidus ayant une activité optique s’ajoute dans un arrangement régulier et, tend à se compenser dans des structures irrégulières.

Le dichroïsme circulaire permet, avec peu de produit, d’estimer le niveau de structuration de la protéine de façon expérimentale. Les structures ordonnées ou dissymétriques comme l’hélice α ou les feuillets β , ont un signal relativement intense et caractéristique. En revanche, le signal de la pelote statistique est relativement plus faible (figure 3.3, page ci-contre)².

²<http://www.food.rdg.ac.uk/online/fs460/lecture6/16i.gif>

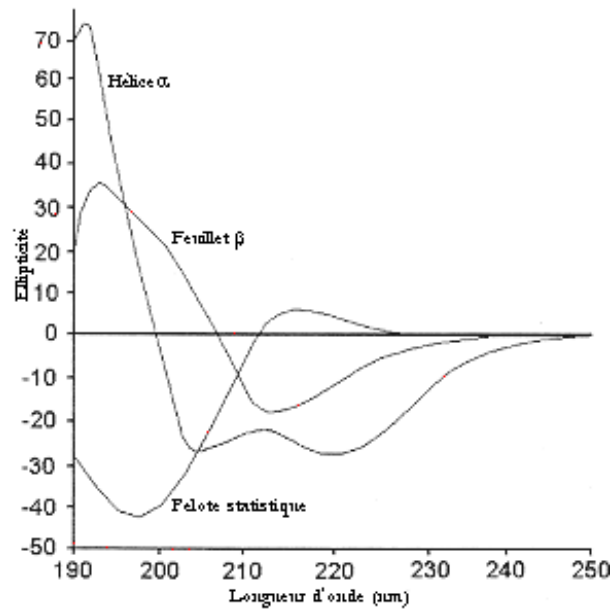


Figure 3.3 – Signaux dichroïques des hélices α , des feuillets β et de la pelote statistique.

L'interprétation des résultats de DC pour connaître le pourcentage de structure repliées d'une protéine est difficile sans l'aide de logiciels adéquats qui optimisent le rmsd entre les données expérimentales et une courbe théorique qui est fonction des pourcentages des différentes structures secondaires.

3.2.2.2 Résultats

Trois méthodes de prédiction ont été utilisées : CONTINLL [3.4, 3.5], SELCON3 [3.6, 3.7] et CDSSTR [3.8]. Le meilleur ajustement a été effectué avec la méthode CONTINLL. La prédiction nous donne alors 6,9 % d'hélices α , 39,2 % de brins β , 20,7 % de boucles et 33,3 % de pelote statistique (figure 3.4, page suivante). La proportion des deux tiers de zones structurées estimée pour la MsrB de *N. meningitidis* est suffisante pour envisager une analyse structurale par RMN.

Les résultats de dichroïsme circulaire entrepris sur la MsrB réduite de *N. meningitidis* contredisent les prédictions faites par les logiciels de bio-informatique en ce qui concerne les proportions d'hélices et de brins. Nous avons préféré tenir compte des résultats expérimentaux sans négliger la prédiction des position des hélices et des feuillets obtenue par NPS@.

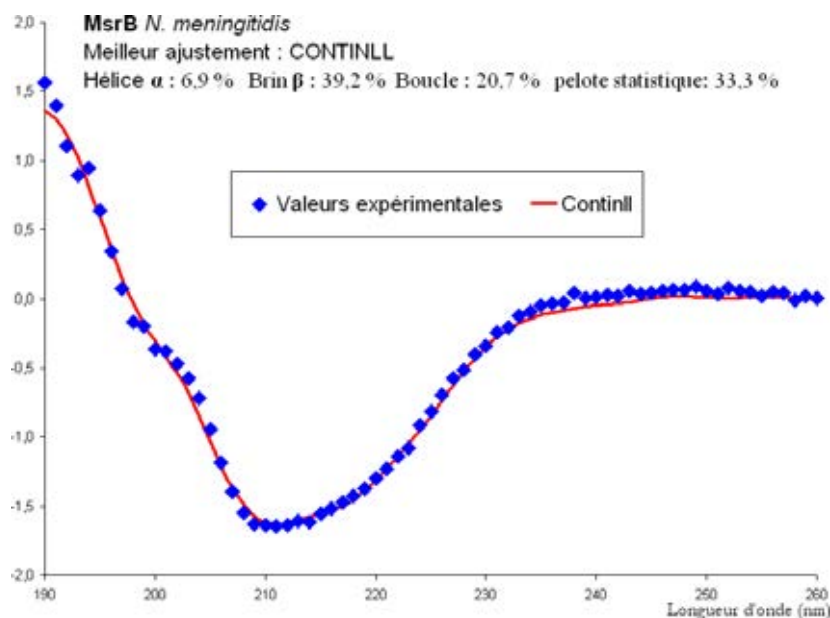


Figure 3.4 – Dichroïsme circulaire de MsrB réduite. La concentration de la protéine est de $5 \mu\text{M}$ dans un tampon KPi 10 mM à pH 7.1 et à 25°C . Les spectres sont réalisés dans une gamme de longueur d'onde allant de 190 nm à 260 nm avec un pas de 1 nm. Les mesures expérimentales sont la moyenne de 6 spectres.

3.2.3 RMN bidimensionnelle hétéronucléaire

3.2.3.1 Introduction

Afin de conclure sur la faisabilité du projet, nous avons entrepris un marquage ^{15}N de la MsrB. Les deux formes de la MsrB que l'on peut isoler facilement sont la forme réduite où les deux cystéines intervenant dans le mécanisme sont sous la forme thiol et la forme oxydée où les deux cystéines forment un pont disulfure intramoléculaire. Nous ne parlerons ici que de la forme réduite, la forme oxydée sera traitée dans le chapitre suivant. L'échantillon de la forme réduite de MsrB est dans un tampon KPi 10 mM, pH 7,1, en présence d'un excès de DTT (50 mM) pour piéger tout l'oxygène dissous, et sous azote (N_2). Le tube est scellé et reste stable durant de nombreuses semaines. Il a été également montré, par des expériences biochimiques, que la MsrB retrouve son activité après un chauffage à plus de 90°C pendant 5 min.

3.2.3.2 Résultats

Le spectre HSQC (^1H , ^{15}N) de la forme réduite (figure 3.5, page ci-contre) présente un assez bon éclatement des raies de résonance caractérisant une structuration de la protéine. Les raies sont suffisamment espacées et il est possible, à part quelques recouvrements, de

visualiser les 137 pics correspondant à l’empreinte des atomes H^N-N du squelette peptidique de la MsrB. D’autres corrélations H^N-N sont également visibles et correspondent aux liaisons $N-H$ des chaînes latérales. Les pics situés à des valeurs de fréquences protoniques supérieures à 9 ppm, partie gauche du spectre, sont déblindés et correspondent à la présence de feuillets β .

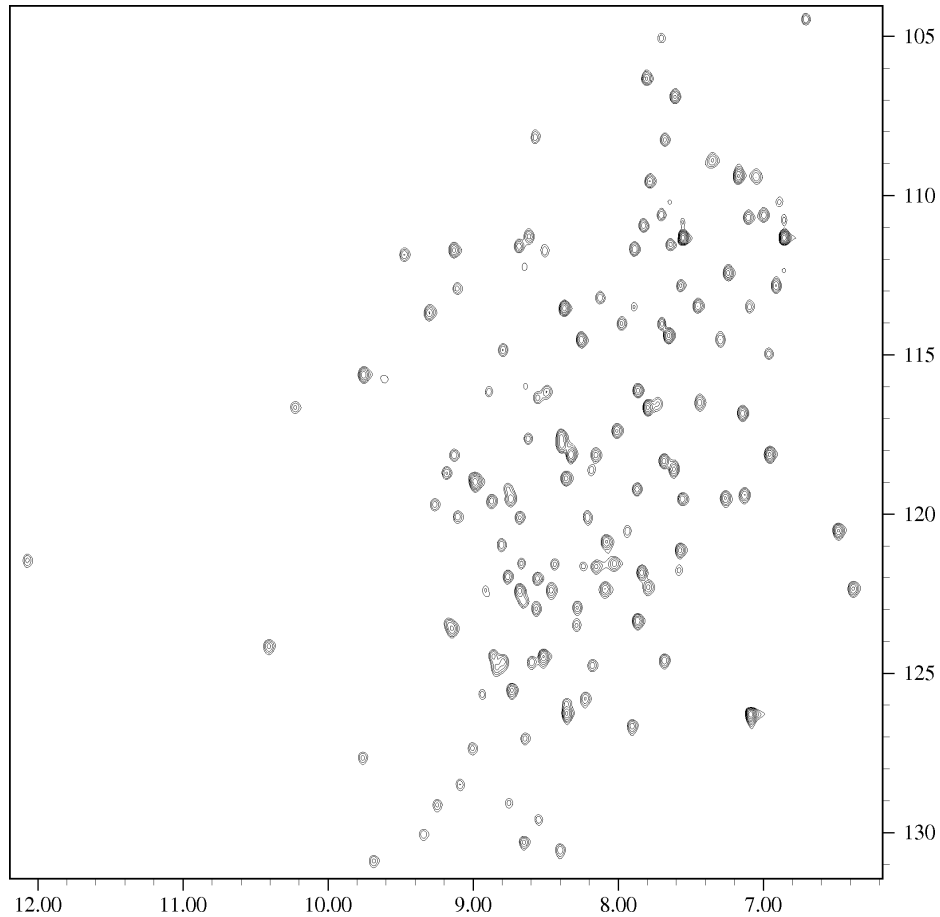


Figure 3.5 – Spectre HSQC (1H , ^{15}N) de la forme réduite de la MsrB ^{15}N à 1 mM enregistrée sur un spectromètre 800 MHz à 25°C et à pH 7,1.

A partir de ces premières mesures, il est envisageable de procéder à l’attribution des raies de résonance des atomes de la MsrB réduite. Les études de dichroïsme circulaire indiquent une structuration majoritaire de la MsrB en feuillets β . De plus, le spectre HSQC (1H , ^{15}N) présente un éclatement des raies suffisamment important pour permettre une attribution séquentielle sans grandes difficultés.

3.3 Étude RMN de la MsrB réduite

La dernière partie de ce chapitre se rapporte à l'étude RMN de la MsrB réduite de *N. meningitidis*. Je parlerai de l'attribution des atomes du squelette et des chaînes latérales ainsi que des prédictions des structures secondaires qui en découlent.

3.3.1 Attribution des atomes de la MsrB réduite

3.3.1.1 Atomes du squelette peptidique

La stratégie d'attribution a consisté à enregistrer les six expériences complémentaires décrites dans le tableau 2.1, page 49. Les expériences ont été effectuées à pH 7.1, à 25°C pour une concentration de MsrB de 1 mM et principalement sur un spectromètre Bruker DRX 600 MHz, équipé d'une sonde triple résonance munie des gradients x, y et z. Les expériences ont été traitées par transformée de Fourier rapide avec le logiciel XWINNMR 3.1 (Bruker). Les spectres ont ensuite été analysés avec le logiciel Xeasy [3.9]. Les caractéristiques des expériences sont résumées dans le tableau 3.1.

Expériences	Acquisition				largeur spectrales			Taille des matrices		
	t ₁	t ₂	t ₃	ns	ω ₁	ω ₂	ω ₃	D ₁	D ₂	D ₃
HNCA	2048	128	96	16	16	45	40	1048	512	256
HN(CO)CA	2048	128	96	16	16	45	40	1048	512	256
CBCANH	2048	18	128	24	16	45	75	1048	256	512
CBCA(CO)NH	2048	56	128	24	14	45	75	1048	256	512
HNCO	2048	96	128	16	16	45	20	1024	256	256
HN(CA)CO	2048	96	128	16	16	45	20	1024	256	256

Tableau 3.1 – Caractéristiques des expériences 3D pour l'enregistrement et le traitement des données effectuées sur un spectromètre 600 MHz. La première dimension (t, ω et D)₁ représente celle des protons, la deuxième celle des ¹⁵N et la troisième celle des ¹³C. Les variables «t» et «D», sont les nombres de points enregistrés et traités respectivement ; ns, le nombre de scans et les largeurs spectrales ω sont exprimées en ppm. Une prédiction linéaire a été appliquée dans les dimensions ¹⁵N et ¹³C afin de prédire la suite de l'interférogramme à la place des points «zéro» ajoutés pour augmenter la résolution spectrale.

La référence des spectres est calibrée avec le signal du TMSp ((CH₃)₃Si-(CD₂)₂-COONa : sel de sodium de l'acide 3-triméthylsilylpropionique tétra deutéré). Ce composé n'interagit pas avec les protéines et donne, pour un spectre proton, un signal unique dans H₂O/D₂O (90/10 v/v) pris comme référence (0 ppm). Les déplacements chimiques ¹⁵N et ¹³C ont été référencés indirectement en appliquant un rapport de fréquence ¹H/X au niveau du point 0 ppm (0.101329118 pour ¹⁵N et 0.251449530 pour ¹³C) [3.10]. Le calcul

des références indirectes est effectué par un sous programme que nous avons inséré dans XWINNMR.

L'éclatement des signaux du spectre HSQC (^1H , ^{15}N) et, l'expérience HNCO effectuée sur le spectromètre Varian Inova 800 MHz de l'IBS à Grenoble m'a permis de retrouver 100% des pics attendus. Dans le cas de la MsrB, le problème de l'attribution provient d'un nombre important de signaux C^α et C^β dont les valeurs des déplacement chimiques correspondantes sont identiques. De plus la sensibilité des expériences était faible par rapport à celle attendue pour des expériences de ce type. Le rapport signal sur bruit, pour les expériences enregistrées, ne dépasse pas 4 pour l'expérience HNCO (1,5 pour CBCANH ; 2,6 pour CBCA(CO)NH). Alors que les autres protéines étudiées au laboratoire dans les mêmes conditions présentent des rapports signal sur bruit supérieurs jusqu'à deux fois plus importants [3.11–3.13].

Après optimisation des expériences, plus de 90% des atomes ont été attribués : H^{N} et N (92%), C^α (97%), C^β (88%) et CO (95%). Un exemple d'attribution séquentielle à partir de l'expérience CBCANH est représenté sur la figure 3.6, page suivante.

L'expérience HNHA a également été enregistrée afin d'obtenir les valeurs des déplacements chimiques des H^α utiles pour la détermination des structures secondaires ainsi que pour l'attribution des atomes des chaînes latérales. La sensibilité de cette expérience, dans le cas de la MsrB, est très faible car seulement 42% des corrélations $\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^\alpha$ sont visibles sur le spectre. La figure 3.7, page 95, montre le spectre HSQC (^1H , ^{15}N) attribué de la protéine.

3.3.1.2 Atomes des chaînes latérales

L'attribution des résonances des atomes ^1H et ^{13}C des chaînes latérales a été effectuée à partir de l'expérience HCCH–TOCSY décrite dans le tableau 2.2, page 52. Cette expérience permet de corrélérer tous les protons des chaînes latérales avec leur carbone. C'est l'équivalence d'une expérience TOCSY utilisée pour les peptides avec en plus un transfert de magnétisation relayé par les ^{13}C .

Les atomes C^α , C^β et H^α sont communs aux expériences utilisées pour l'attribution des atomes de la chaîne peptidique et à l'expérience HCCH–TOCSY. En raison du faible pourcentage des protons H^α attribués, des expériences HSQC–NOESY (^1H , ^{15}N) et (^1H , ^{13}C) ont été utilisées pour lever certaines ambiguïtés ; seulement 60% des chaînes latérales ont pu être attribuées par cette méthode.

L'attribution de la MsrB réduite de *N. meningitidis* a donné lieu à une note d'attribution dans la revue *J. Biomol. NMR*. Les valeurs des déplacements chimiques ont

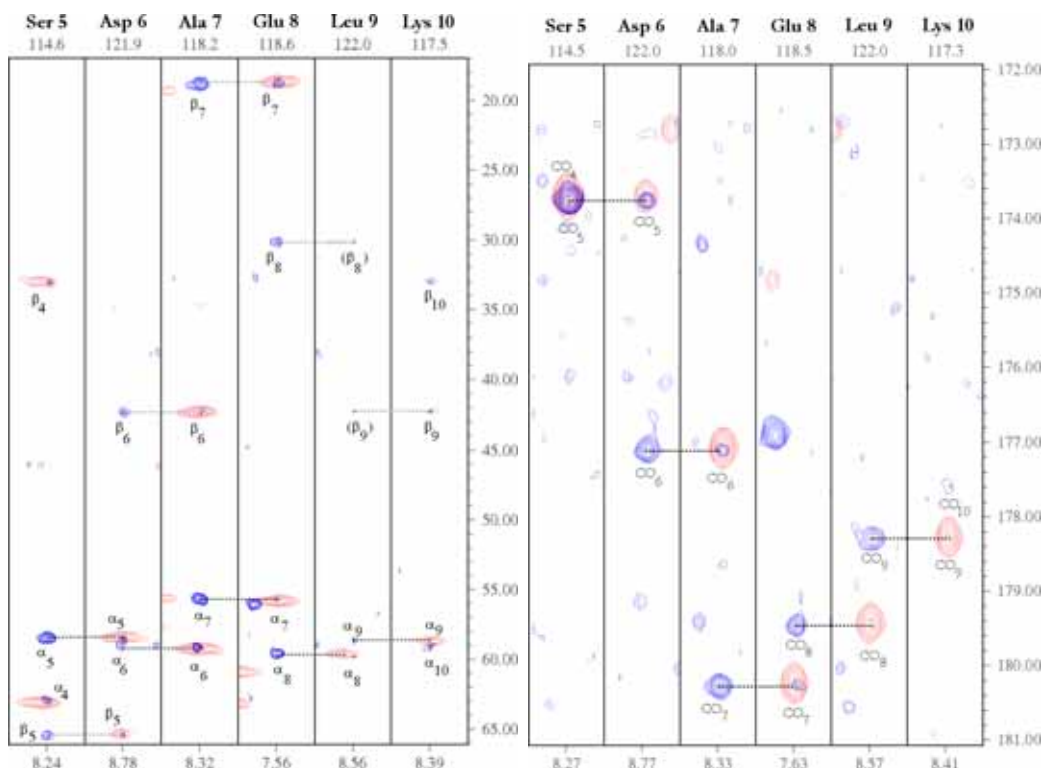


Figure 3.6 – Exemple d’attribution séquentielle pour la séquence S₅–K₁₀ en utilisant les expériences CBCANH et CBCA(CO)NH (gauche) et HN(CA)CO et HNCO (droite). Les pics de corrélation des expériences CBCA(CO)NH et HNCO, ne corrélant que les atomes H^N et ¹⁵N d’un résidu avec les carbones du résidu précédent sont représentées en rouge. Ceux des expériences CBCANH et HN(CA)CO, corrélant les atomes H^N et ¹⁵N d’un résidu avec les carbones du même résidu et du résidu précédent, sont représenté en bleu. Les valeurs en dessous et au dessus de chaque bandelettes correspondent respectivement aux déplacements chimiques en ppm des pics en proton et en azote. La valeur des déplacements chimiques en ppm des carbones est situé à droite de la figure. La faible sensibilité de l’expérience CBCANH ne permet pas toujours d’obtenir les corrélations des C^α et des C^β du résidu précédent (corrélation entre parenthèse).

été déposées dans la base de données BioMagResBank³ (BMRB) sous le numéro d’ordre BMRB-6051.

³<http://www.bmrw.wisc.edu>

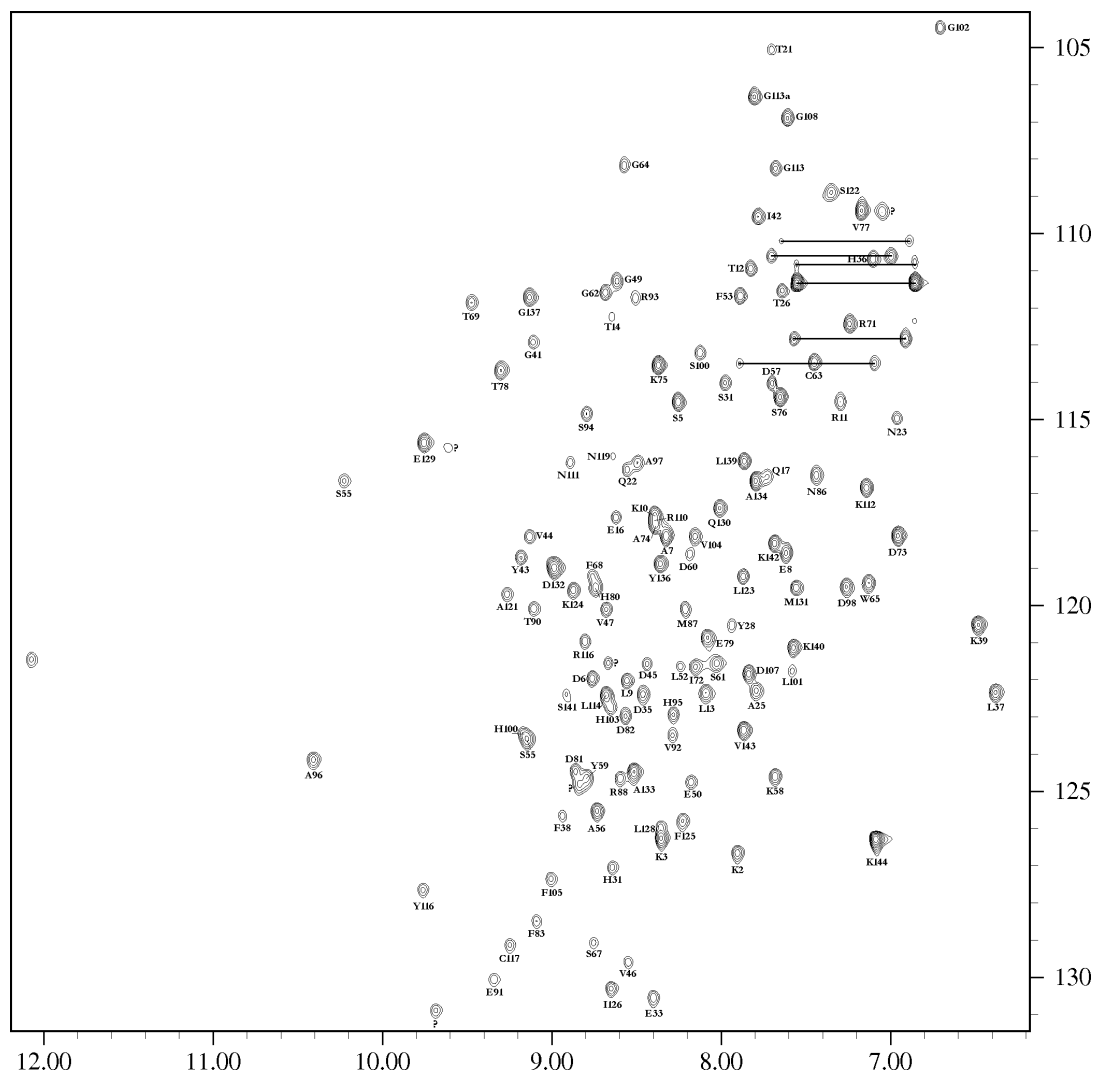


Figure 3.7 – Spectre 2D HSQC (^1H , ^{15}N) attribué de MsrB enregistré sur un spectromètre 800 MHz. Les « ? » correspondent aux pics présents sur l'HSQC mais non attribués.

3.3.2 Note d'attribution : J. Biomol. NMR



Journal of Biomolecular NMR 30: 223–224, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

223

Letter to the Editor: ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*

Aurélien Thureau^a, Alexandre Olry^b, Nicolas Coudeville^a, Saïd Azza^b, Sandrine Boschi-Muller^b, Guy Branlant^b & Manh-Thong Cung^{a,*}

^aLaboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France; ^bMaturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received 23 March 2004; Accepted 2 June 2004

Key words: methionine sulfoxide reductase B, *Neisseria meningitidis*, NMR assignment

Biological context

The aerobic metabolism generates reactive oxygen species (ROS) that can easily oxidize accessible methionine (Met) residues of proteins into methionine sulfoxides (MetSO). This post-translational modification can provoke loss of protein function. Therefore, reduction of MetSO, back to Met, is crucial to protect the cells from the effect of ROS. This is the role of methionine sulfoxide reductases (Msr).

L-Met oxidation into sulfoxide leads to two [*R/S*] epimers at the sulfur atom. In that context, there exists two unrelated-structural classes of Msrs. MsrA reduces the L-Met-*S*-SO whereas MsrB reduces the L-Met-*R*-SO. Both Msrs display a similar new catalytic mechanism that includes formation of a sulfenic acid intermediate and then of an intradisulfide intermediate followed by a thioredoxin (Trx) regeneration step (Boschi-Muller et al., 2000; Olry et al., 2002).

Whereas several X-ray structures of MsrA have been already determined, only one MsrB structure, from *Neisseria gonorrhoeae*, (Lowther et al., 2002) has been described so far. More recently, a preliminary NMR study of the MsrB from *Bacillus subtilis* (Zheng et al., 2003), which presents 53% and 52% amino acid identity with the *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* MsrBs, respectively has been done.

Here we report the backbone and side chain NMR assignment of the MsrB from *N. meningitidis* as well as its secondary structure as a first step in a full 3D structural study aimed at characterizing the amino

acids involved in the MsrB chemical mechanism and MetSO and Trx substrate specificities.

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for MsrB production was BL21 transformed with a plasmidic construction containing the coding sequence under the T7 promoter. Samples of ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labelled were prepared by growing cells in a minimal media with $(^{15}\text{NH}_4)\text{Cl}$ as the sole nitrogen source and with glucose, ^{13}C -labelled or not, as the only carbon source. Purification was done as described by Olry et al. (2002).

The NMR sample contained 2 mM protein concentration (95% H_2O , 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer and 50 mM 1,4-dithiothreitol- d_{10} at pH 7.1. All spectra were acquired at 298 K on Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis TXI probe and on Varian Inova spectrometer (800 MHz) equipped with triple-resonance probes including shielded z-gradients. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels et al., 1995). Backbone amide $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , C^{α} , C' , and side-chain C^{β} resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH and CBCA(CO)NH experiments. Backbone H^{α} , aliphatic sidechain protons and carbons resonances were assigned by analyzing the HNHA, HCCH-TOCSY and ^{15}N - and ^{13}C -NOESY spectra.

Torsion angles (ϕ , ψ) and secondary structure prediction are based on H^{N} , H^{α} , N, C^{α} , C^{β} and C'

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

224

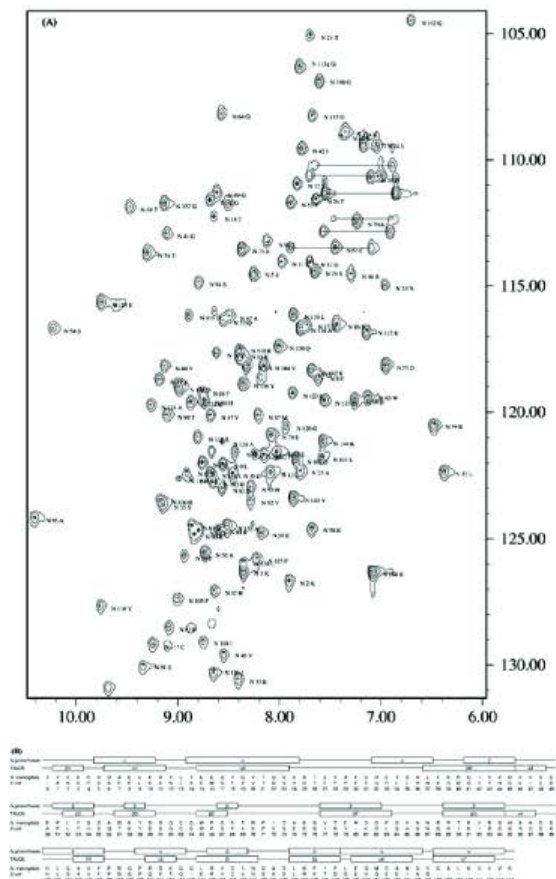


Figure 1. (A) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of MsrB at 298K. The backbone resonances of S67 and G135 are outside the region shown. Side chain amide protons of N and Q residues are indicated by solid horizontal lines. (B) The secondary structures from the X-ray structure of the *N. gonorrhoeae* MsrB and from the TALOS data of the *N. meningitidis* MsrB. The numbering of amino acid residues is based on that of the *Escherichia. coli* MsrB without the N-terminal M.

chemical shifts using the TALOS program (Cornilescu et al., 1999).

Extent of assignments and data deposition

More than 91% of backbone H^{N} , N, C^{α} , C' and C^{β} nuclei are assigned (i.e., 123/138 ^{15}N - H^{N} sites, 140/146 C^{α} , 136/146 C' , 120/135 C^{β}). Proton and carbon chemical shift data for the majority of sidechain groups were determined using a combination of 3D spectra. Comparing the predicted structure with that of the crystal structure of *N. gonorrhoeae* (97% of identity), in overall, the structural elements in solution coincide with X-ray data. 7 α -helices and 10

β -strands were identified: βA (Y1-K3), $\alpha 1$ (D6-R11), $\alpha 2$ (E15-N23), βB (L37-D45), $\alpha 3$ (V46-S48), βC (L52-S54), βD (D57-D60), βE (W65-S67), βF (V77-F83), βG (R89-S94), $\alpha 4$ (H95-A97), βH (H103-F105), $\alpha 5$ (R110-K112), βI (L114-N119), βJ (L123-P127), $\alpha 6$ (E129-A134), $\alpha 7$ (G137-K142).

The main differences are the first β -strand (βA) and the two helices ($\alpha 3$) and ($\alpha 4$) which are only seen in the NMR structure and the α -helix including residues H32 to L37 which is not present.

Some peaks present in the HSQC ^1H ^{15}N spectrum were not found in the other heteronuclear 3D spectra. Moreover the H^{N} chemical shift value of the S67 (12.33 ppm) is unusual. This residue is closed to the active site which includes amino acids Y59, W65, F68 and P66. Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under access number BMRB-6051 (<http://www.bmrwisc.edu>) in which the MsrB primary sequence is numbered from 1 to 146.

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 5436). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the SCBIM Nancy I was deeply appreciated. We thank Dr P. Gans for doing HNCOC, HNCACO spectra on the Varian Inova 800 of the NMR laboratory of the IBS Jean-Pierre Ebel (Grenoble, France). We are grateful to Dr C. Hemmerlin for her excellent technical assistance.

References

- Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 1–10.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A. and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35908–35913.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR*, **13**, 289–302.
- Lowther, W.T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. and Matthews, B.W. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 348–352.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A. and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12016–12022.
- Zheng, D., Cort, J.R., Chiang, Y., Acton, T., Kennedy, M.A. and Montelione, G.T. (2003) *J. Biomol. NMR*, **27**, 183–184.

3.3.3 Prédiction des structures secondaires

Les valeurs des déplacements chimiques sont influencées par les structures secondaires présentes au sein de la protéine. J'ai utilisé l'index des déplacements chimiques (CSI) et le logiciel TALOS pour prédire la position de ces structures au niveau de la MsrB. Le CSI (Δ_i) pour chaque résidu i a été déduit en prenant en compte les valeurs des déplacements chimiques des atomes C^α , C^β , CO et H^α et en utilisant la formule (3.1)

$$\Delta_i = (\delta_i^{C^\alpha} - \delta_i^{C^\beta} + \delta_i^{CO} - \delta_i^{H^\alpha}) - (\delta_{ref}^{C^\alpha} - \delta_{ref}^{C^\beta} + \delta_{ref}^{CO} - \delta_{ref}^{H^\alpha}) \quad (3.1)$$

Avec $\delta_i^{C^\alpha}$, $\delta_i^{C^\beta}$, δ_i^{CO} et $\delta_i^{H^\alpha}$, les déplacements chimiques des atomes du résidu i et $\delta_{ref}^{C^\alpha}$, $\delta_{ref}^{C^\beta}$, δ_{ref}^{CO} et $\delta_{ref}^{H^\alpha}$, les déplacements chimiques de référence publiés sur le site de la BMRB⁴.

Le logiciel TALOS se base sur les déplacements chimiques des atomes N, C^α , C^β , CO et H^α des résidus de 78 protéines dont la structure est connue, pour en déduire 10 valeurs d'angles ϕ et ψ les plus probables pour chaque résidu de la protéine étudiée qu'il reporte sur une carte de Ramachandran.

La combinaison de ces deux méthodes permet d'avoir une idée plus précise sur les structures secondaires qui composent la MsrB (figure 3.8, page ci-contre).

Les prédictions des structures secondaires pour la MsrB de *N. meningitidis* à partir des données de RMN conduisent à des résultats qui ne sont pas très différents de ceux obtenus par cristallographie des rayons X avec la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les trois hélices courtes 3₁₀-2, 3₁₀-3 et 3₁₀-4 décrites dans la structure cristallographique sont absentes dans les prédictions effectuées avec le calcul des CSI et par le logiciel TALOS. Dans le cas de TALOS, on remarque un décalage d'un ou deux résidus entre la prédiction et les données cristallographiques pour certains feuillets β . Deux petits feuillets supplémentaires (Y₁-P₄ et A₂₅-Y₂₈) sont prédits ainsi qu'une hélice (H₉₅-D₉₈). Les résultats obtenus en utilisant le CSI sont moins évidents. Le manque de données, notamment les déplacements chimiques d'un certain nombre de C^β , ne nous a pas permis de prédire l'hélice α 2 et le feuillet β 6. La zone comprenant les deux hélices terminales (α 3 et 3₁₀-5) présente une succession de valeurs positives et négatives des CSI. Ce résultat n'a pas permis de prédire ces structures secondaires.

Globalement, les structures secondaires prédites par l'utilisation des CSI et du logiciel TALOS sont en accord avec celles obtenues par cristallographie pour la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les deux MsrB présentent 97% d'identité; seuls quatre résidus diffèrent : TYR₈₅ ↔ PHE, HIS₉₅ ↔ ARG, SER₁₄₁ ↔ GLY et LYS₁₄₂ ↔ GLU. De par cette consta-

⁴http://www.bmrwisc.edu/ref_info/csishift.txt

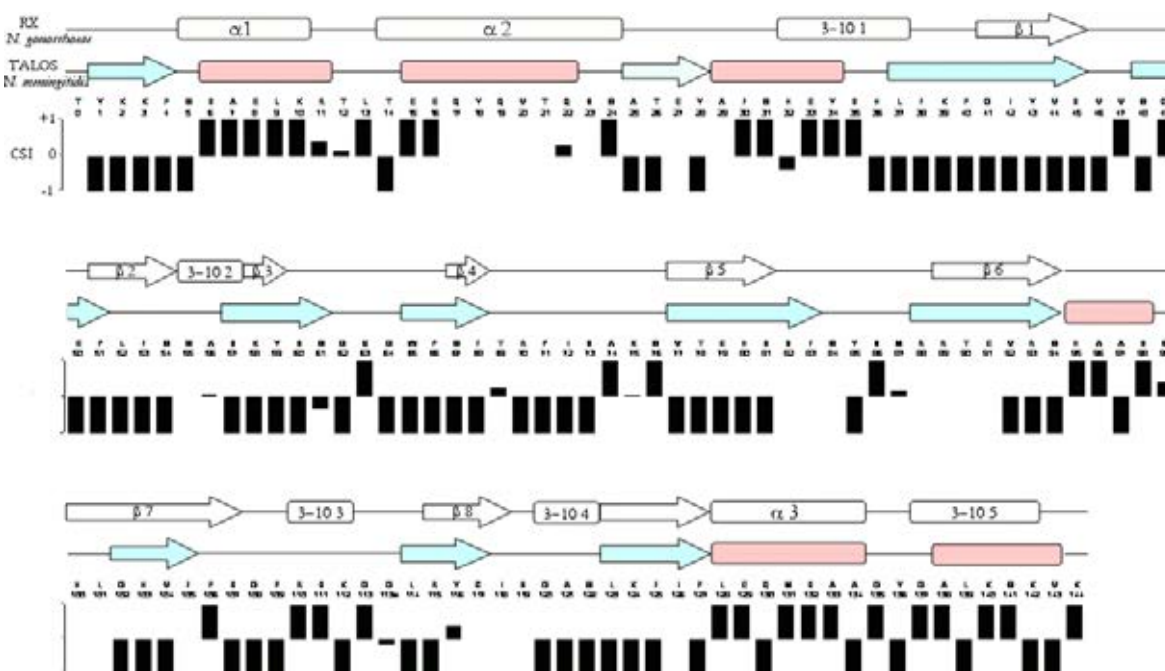


Figure 3.8 – Représentation des structures secondaires prédites par les CSI et par le logiciel TALOS pour la MsrB de *N. meningitidis* comparées avec les résultats obtenus par cristallographie RX sur la MsrB de *N. gonorrhoeae* qui présente 97% d’identité avec celle de *N. meningitidis*. La numérotation de la séquence correspond à celle établie par comparaison avec la séquence de la MsrB issue d’*E. coli*. Les structures secondaires à partir des données cristallographiques et des prédictions du logiciel TALOS sont représentées en rectangle arrondi pour les hélices et en flèche pour les feuillets. Dans le cas des données obtenues à partir de Talos, les feuillets sont en bleu et les hélices en rouge. Au moins quatre couples de valeurs d’angles ϕ/ψ doivent aller dans le même sens pour prédire une structure secondaire. Le CSI pour chaque résidu est représenté sous forme d’histogramme. Les valeurs positives et négatives indiquent respectivement la présence possible d’hélices ou de feuillets, les valeurs supérieures à 1, en absolu, sont tronquées. Si tous les déplacements chimiques ne sont pas disponibles, le CSI n’est pas calculé (zone blanche).

tation, il semble évident que les deux structures tri-dimensionnelles soient très proches l’une de l’autre.

3.3.4 Expériences NOESY

Afin d’aider à l’attribution des chaînes latérales mais également dans le but de déterminer la structure tri-dimensionnelle de la MsrB de *N. meningitidis*, plusieurs spectres 2D NOESY ont été enregistrés à partir de l’échantillon doublement marqué $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ à des temps de mélange τ_m allant de 70 ms à 200 ms. Le tracé des intensités de plusieurs pics H^{N} en fonction du temps de mélange τ_m a montré que la diffusion de spins est négligeable pour une valeur de τ_m de 100 ms.

Deux expériences de RMN 3D ont été effectuées, une NOESY–HSQC (^1H , ^{15}N) et une NOESY–HSQC(^1H , $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$). Cette dernière combine une NOESY–HSQC (^1H , ^{15}N) et une NOESY–HSQC(^1H , ^{13}C) sur la même expérience.

Nous ne sommes pas allés plus loin dans l’analyse des spectres NOESY. Avec le faible pourcentage d’attribution des chaînes latérales et la publication de la structure 3D de la MsrB de *N. gonorrhoeae*, nous avons préféré orienter le sujet de thèse vers les études d’interaction entre la MsrB de *N. meningitidis* et ses différents partenaires.

3.4 Conclusion

La production et la purification de la MsrB réduite de *N. meningitidis* auxquelles j’ai participé se sont faites dans des conditions idéales. La MsrB réduite semble être une protéine stable et les moyens tant matériels qu’humain présents au MAEM m’ont permis d’obtenir la MsrB réduite en quantité pondérale pour les études par spectroscopie RMN.

Les études de dichroïsme circulaire au niveau de la MsrB réduite indique une forme principalement en feuillet β . Les premières études RMN avec la protéine simplement marquée ^{15}N sont encourageantes car le spectre HSQC (^1H , ^{15}N) est représentatif d’une protéine structurée par l’observation de l’éclatement des pics de corrélation H^1/N^{15} . A partir de ces premiers résultats, nous avons effectué l’attribution des atomes du squelette peptidique de la MsrB avec l’échantillon doublement marqué $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. Un nombre important de signaux C^α et C^β sont superposés rendant difficile l’attribution séquentielle. Nous avons obtenu une attribution pour plus de 90 % des atomes du squelette.

En vue de l’étude des spectres NOESY, une expérience HCCH–TOCSY a été enregistrée pour attribuer les atomes des chaînes latérales. A partir des valeurs C^α , C^β et H^α et à l’aide des expériences NOESY, 60% des protons des chaînes latérales ont pu être attribués. La quantité de protons attribués au niveau des chaînes latérales n’est pas suffisant pour avoir un nombre important de corrélations nOe utiles pour la détermination d’une structure tridimensionnelle.

Les prédictions faites par le logiciel TALOS sont en accord avec les expériences de dichroïsme circulaire. On retrouve le même pourcentage en ce qui concerne les feuillets β (40%) et la pelote statistique (35%). Par contre, le pourcentage d’hélices prédites avec le logiciel TALOS (25%) est supérieur à celui obtenu par dichroïsme circulaire (7%). Ceci est dû à la prise en compte des boucles au niveau du dichroïsme circulaire, ce qui n’est pas le cas de TALOS. La somme du pourcentage de boucles et d’hélices pour le dichroïsme (28%) correspond à celui de TALOS pour les hélices.

La publication de la structure cristallographique de la MsrB de *N. gonorrhoeae*, qui présente 97% d'identité avec la MsrB de *N. meningitidis*, nous permet d'avoir une idée encore plus précise de la structure d'une MsrB. La prédiction des structures secondaires chez la MsrB de *N. meningitidis* est en accord avec celle de la structure 3D de la MsrB de *N. gonorrhoeae* obtenue par cristallographie

L'utilisation conjointe de la structure 3D de la MsrB de *N. gonorrhoeae* et l'attribution des atomes du squelette peptidique de la MsrB de *N. meningitidis* va être utile pour comprendre le mécanisme global des MsrB. Pour cela, les études de mutants de la MsrB en interaction avec ses deux partenaires principaux, la molécule de Met-*R*-SO, un petit ligand et la Trx, ont été entreprises et sont détaillées dans le chapitre suivant.

Bibliographie

- [1] J. Wu, F. Neiers, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. 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, 2005.
- [2] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselear, and G. Branlant. Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of pilb, a probable virulence factor from neisseria meningitidis. *J Biol Chem*, 277(14) :12016–22, 2002.
- [3] C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, and G. Deleage. Nps@ : network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*, 25 :147–50, 2000.
- [4] S. W. Provencher and J. Glockner. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20 :33–7, 1981.
- [5] I. H. van Stokkum, H. J. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle, and F. C. Groen. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*, 191 :110–8, 1990.
- [6] N. Sreerama and R. W. Woody. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem*, 209 :32–44, 1993.
- [7] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov, and R. W. Woody. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci*, 8 :370–80, 1999.
- [8] L. A. Compton and Jr. Johnson, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem*, 155 :155–67, 1986.
- [9] C. Bartels, Xia, T., M. Billeter, P. Güntert, and K. Wüthrich. The program xeasy for computer-supported nmr spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR*, 6 :1–10, 1995.
- [10] D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, and B. D. Sykes. ¹h, ¹³c and ¹⁵n chemical shift referencing in biomolecular nmr. *J Biomol NMR*, 6 :135–40, 1995.
- [11] N. Coudeville, A. Thureau, S. Azza, S. Boshi-Muller, G. Branlant, and M. T. Cung. (¹h), (¹³c) and (¹⁵n) resonance assignment of the reduced form of methionine sulfoxide reductase a from escherichia coli. *J Biomol NMR*, 30 :363–4, 2004.

- [12] N. Coudevylle, A. Thureau, C. Hemmerlin, E. Gelhaye, J. P. Jacquot, and M. T. Cung. ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the reduced form of thioredoxin h1 from poplar, a cpc active site variant. *J Biomol NMR*, 30 :229–30, 2004.
- [13] N. Coudevylle, A. Thureau, C. Hemmerlin, E. Gelhaye, J. P. Jacquot, and M. T. Cung. Solution structure of a natural cpc active site variant, the reduced form of thioredoxin h1 from poplar. *Biochemistry*, 44 :2001–8, 2005.

Chapitre 4

Études des interactions

Sommaire

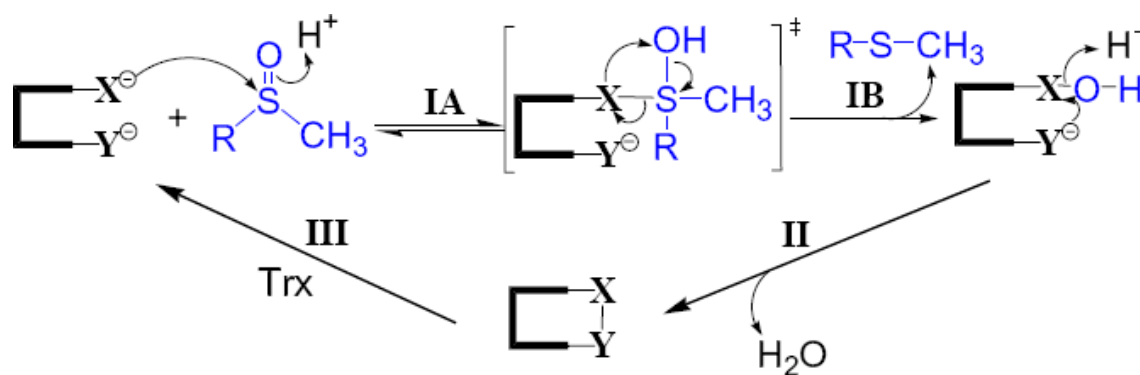
4.1	Interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde	109
4.1.1	Étude du mutant C117S	109
4.1.1.1	Spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C117S	109
4.1.1.2	Résidus perturbés par la mutation	109
4.1.1.3	Répartition spatiale des résidus perturbés	110
4.1.2	Cartographie des déplacements chimiques perturbés	112
4.1.2.1	Protocole	112
4.1.2.2	Résidus influencés par la présence du substrat	114
4.1.2.3	Constante de dissociation	117
4.1.3	Études du pKa des histidines 100 et 103	118
4.1.3.1	Hypothèse sur le rôle des histidines 100 et 103	118
4.1.3.2	Protocole expérimental	118
4.1.3.3	Résultats	120
4.1.4	Discussion	120
4.2	Intermédiaire acide sulfénique	125
4.2.1	Le mutant C63S	125
4.2.1.1	Spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C63S	125
4.2.1.2	Les résidus perturbés par la mutation	125
4.2.1.3	Répartition spatiale des résidus perturbés	127
4.2.2	Étude de la formation de l'acide sulfénique	129
4.2.2.1	Protocole / théorie	129
4.2.2.2	Effet de l'ajout de MetSO	130
4.2.3	Discussion	132

4.3	MsrB oxydée	134
4.3.1	Préparation de l'échantillon	134
4.3.1.1	Oxydation de la MsrB réduite	134
4.3.1.2	Stabilité de l'échantillon oxydé	134
4.3.2	Échantillon doublement marqué	135
4.3.2.1	Attribution des atomes du squelette peptidique	135
4.3.2.2	Prédiction des structures secondaires	136
4.3.3	Échantillon triplement marqué	137
4.3.3.1	Introduction	137
4.3.3.2	Attribution des atomes du squelette peptidique	138
4.3.3.3	Prédiction des structures secondaires	139
4.3.4	Discussion	143
4.4	Interaction de la MsrB oxydée avec la thiorédoxine	146
4.4.1	Rôle de la thiorédoxine vis-à-vis des Msr	146
4.4.1.1	Acquis biochimiques	146
4.4.1.2	Choix des méthodes pour l'étude du complexe	146
4.4.2	Résultats	148
4.4.2.1	Validation du complexe covalent	148
4.4.2.2	Validation du complexe non covalent	149
4.4.2.3	Phénomène d'échange lent	149
4.4.2.4	Constante de dissociation	150
4.4.3	Discussion	151
	Bibliographie	154

La reconnaissance moléculaire des ligands par leurs récepteurs est primordiale pour la compréhension des processus biologiques. Une meilleure connaissance des interactions protéine-protéine et protéine-ligand en solution à l'échelle atomique est devenue réalisable dernièrement grâce à de nouvelles techniques de la spectroscopie RMN. On assiste à un développement récent et accru de méthodes RMN visant à suivre ces interactions par le biais d'informations liées à des changements conformationnels et environnementaux. La RMN devient ainsi une technique de choix dans l'étude des interactions entre une protéine et ses partenaires [4.1].

Après l'attribution des résonances des divers noyaux ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{13}C et ^{15}N) du squelette peptidique d'une protéine, il est possible de suivre le comportement de celle-ci en présence d'un ligand ou d'une autre macromolécule. Tout dépend de la vitesse d'échange. Dans le cas d'une cinétique rapide, la RMN n'imposerait pas, a priori, une réattribution complète des signaux de résonance de la protéine complexée avec son partenaire ; il suffirait d'observer les différences entre les spectres RMN de la forme libre (sans ligand) et de la forme liée (en présence d'un excès de ligand). Ces différences sont liées aux perturbations chimiques de l'environnement engendrées par la présence du ligand. Les spectres HSQC (^1H , ^{15}N) et TROSY (^1H , ^{15}N) sont les plus utilisés car ils permettent d'établir une empreinte de la protéine et sont facilement réalisables. De plus, les résonances des noyaux $^1\text{H}^{\text{N}}$ et ^{15}N sont très sensibles à leur environnement chimique immédiat, indiquant ainsi si un résidu interagit avec le partenaire en présence.

Dans le cycle d'oxydo-réduction décrit schématiquement par le mécanisme suivant, la MsrB interagit avec deux partenaires (MetSO et Trx) et peut se retrouver sous au moins trois états différents :



1. *la forme réduite* : les deux cystéines de la MsrB, intervenant dans la catalyse (Cys 63 : Y⁻ et Cys 117 : X⁻), sont sous les formes thiol ou thiolate ;

2. *l'interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde* : Lors de l'interaction, Cys 117 est sous forme thiolate. C'est une attaque nucléophile du soufre de Cys 117 sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat qui initie la réaction ;
3. *l'intermédiaire acide sulfénique* : la réduction du substrat entraîne une oxydation de la protéine avec formation d'un acide sulfénique au niveau de Cys 117. La molécule de substrat est alors libérée ;
4. *la forme oxydée* : la cystéine régénérative 63 sous forme thiolate attaque l'atome de soufre de la fonction sulfénique de Cys 117. Il se forme un pont disulfure intramoléculaire Cys 117 - Cys 63 caractéristique de la forme oxydée de la protéine.
5. *l'interaction avec Trx* : Trx permet la réduction du pont disulfure Cys 117 - Cys 63. Les deux protéines effectuent un échange de pont disulfure ;

En plus de ces différents états, il existe un état de transition entre la forme réduite et l'intermédiaire acide sulfénique. On suppose un réarrangement sigmatropique 1,3 conduisant à la libération de la molécule réduite de substrat. Cet état est peu stable et n'a pas pu être isolé.

Dans le but d'apporter une meilleure compréhension structurale au mécanisme réactionnel de la MsrB, mon travail a consisté à caractériser puis à valider les cinq étapes précédemment décrites par une approche basée sur la RMN. L'attribution préalable des signaux de résonance de la MsrB sous forme réduite a permis l'étude de l'interaction entre la MsrB et le substrat sulfoxyde ainsi que celle de l'intermédiaire acide sulfénique. Par contre la différence trop importante observée entre les spectres de la MsrB, sous sa forme réduite et sous sa forme oxydée, a nécessité une réattribution du squelette peptidique de la forme oxydée. Cette réattribution était nécessaire pour entreprendre les études d'interaction entre la MsrB et la Trx. Dans ce chapitre, chaque partie traitera d'une étape du mécanisme. L'attribution des spectres de RMN de la MsrB réduite a été développée dans le chapitre précédent.

4.1 Interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde

La cystéine 117 de la MsrB est la cystéine catalytique : c'est elle qui attaque la fonction sulfoxyde du substrat. Afin d'étudier l'interaction sans initier la réaction enzymatique, nous avons dû effectuer la mutation de cette cystéine en sérine ; ce mutant sera représenté par la notation C117S.

Nous commencerons par une attribution du spectre de corrélation $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ du mutant C117S par analogie avec le spectre de la protéine sauvage. Nous étudierons ensuite l'effet du substrat sur l'ensemble de la protéine avant de s'intéresser plus particulièrement au pKa des histidines 100 et 103 en présence ou non du substrat.

4.1.1 Étude du mutant C117S

4.1.1.1 Spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C117S

Le mutant C117S, exprimé au MAEM, a été enrichi en ^{15}N . Les spectres TROSY (^1H , ^{15}N) de la protéine sauvage et du mutant C117S présentent une grande similitude (figure 4.1, page suivante). En superposant les deux spectres correspondants, on retrouve 96% des pics. Cependant, il est normal de ne pas pouvoir attribuer le résidu Ser 117 directement ; l'environnement chimique d'un résidu sérine est différent de celui d'une cystéine. La superposition de certains pics de résonances sur le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant n'a pas permis d'attribuer avec certitude les résidus Glu 15, Tyr 18, Phe 38, Ser 68 et Ala 138. Ces derniers ne semblent pas avoir de liens directs avec la mutation.

4.1.1.2 Résidus perturbés par la mutation

Afin de mieux visualiser les conséquences de la mutation C117S sur l'ensemble des résidus, nous avons appliqué la formule (4.1) qui prend en compte la différence entre les déplacements chimiques des atomes H^{N} et N de la forme sauvage et ceux de la forme mutée pour chaque résidu (figure 4.2, page 111) [4.2].

$$\Delta = |\Delta\delta(^1\text{H}^{\text{N}})| + \frac{1}{\alpha} |\Delta\delta(^{15}\text{N})| \quad (4.1)$$

Avec $\alpha = 8$ pour les glycines et $\alpha = 6$ pour les autres résidus.

Le calcul de la moyenne des différences des déplacements chimiques et des écarts-types a permis d'établir des seuils pour différencier les résidus influencés par la mutation C117S. Les résidus, dont la valeur de différence des déplacements chimiques est supérieur à deux fois celles des écarts-types, sont considérés comme étant fortement perturbés. Les résidus

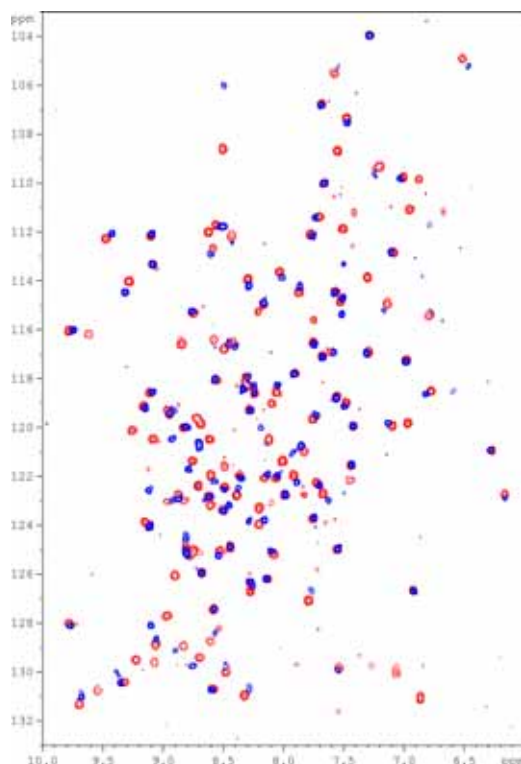


Figure 4.1 – Spectres TROSY (^1H , ^{15}N) de la MsrB sauvage (rouge) et du mutant C117S (bleu).

faiblement perturbés sont ceux dont la valeur est comprise entre un et deux fois celles des écarts-types.

4.1.1.3 Répartition spatiale des résidus perturbés

Étant donné que les structures secondaires de la forme réduite de MsrB prédites par le logiciel TALOS à partir des déplacements chimiques des protons H^{N} et H^{α} , de l'atome d'azote N, et des atomes de carbone C^{α} , C^{β} et CO (§ 3.3.3, page 98) sont très proches de celles déterminées par radiocristallographie, nous avons supposé que la structure 3D de la MsrB réduite en solution ne diffère pas de celle caractérisée par diffraction des RX. J'utiliserai par la suite cette structure RX pour illustrer les interactions de la MsrB réduite avec ses partenaires.

En identifiant les résidus affectés au niveau de la structure de *N. gonorrhoeae* (figure 4.3, page 112), on remarque que ceux autour de la cystéine 63 sont, pour la plupart, fortement perturbés, notamment le Trp 65. Les résidus His 100, His 103, Thr 26 et Phe 105 qui sont impliqués dans le site actif sont également perturbés. En plus, les résidus Val 47 et Ala 96 qui se trouvent à l'opposé du site actif, au niveau du site putatif de fixation

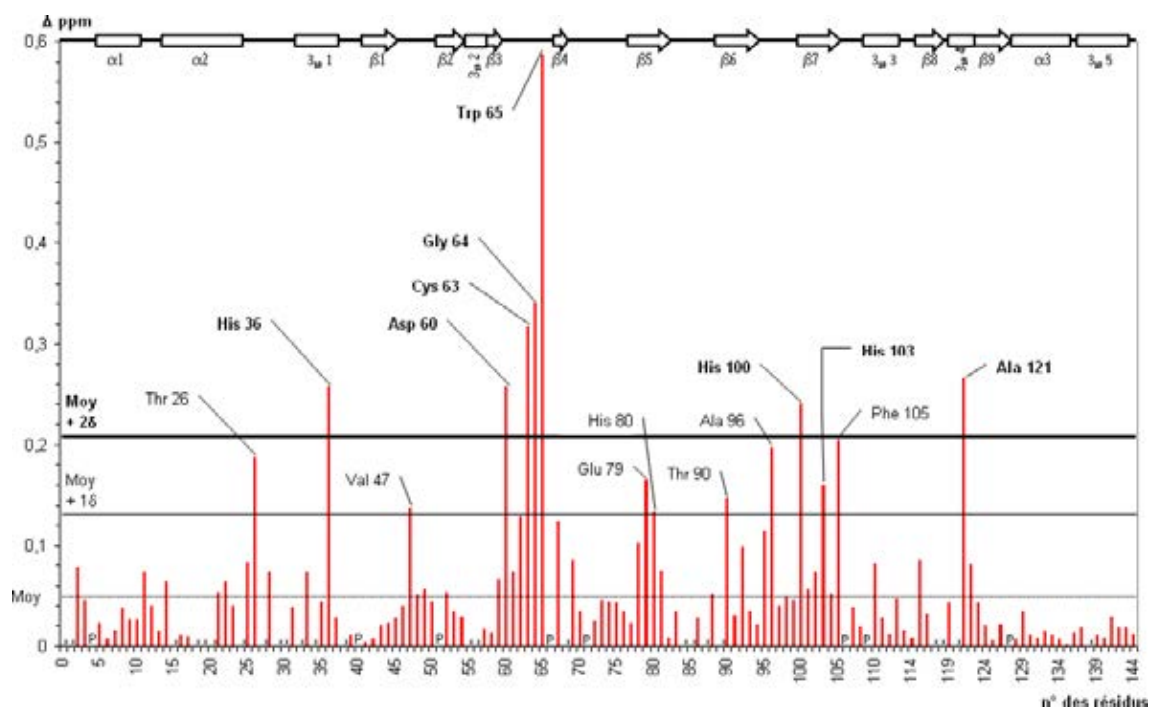


Figure 4.2 – Histogramme montrant la différence des déplacements chimiques (Δ) tels que définis selon la formule (4.1) pour chaque résidu lié à la mutation C117S. Le trait pointillé représente la moyenne des déplacements chimiques (0,05 ppm), le trait plein la moyenne plus la valeur d'un écart type (0,13 ppm) et le trait gras la moyenne plus la valeur de deux écarts types (0,21 ppm). Les structures secondaires, issus de *N. gonorrhoeae*, sont représentées en haut. Les lettres «P» et «X» représentent soit les prolines soit les résidus non attribués ou ambigus, respectivement.

du métal pour certaines MsrB, comme celle d'*E. coli*, subissent une forte perturbation. Les modifications observées au niveau du résidu His 36 s'expliquent par une proximité des résidus Asp 60 et Trp 65. Enfin, les résidus Glu 79, His 80 et Thr 90, qui se trouvent sur les brins $\beta 5$ et $\beta 6$, dont l'implication dans le mécanisme sera expliquée plus en détail ultérieurement, sont aussi concernés. Les résidus situés sur le brin $\beta 8$, qui inclut la Cys 117, ne semblent pas être très perturbés. Il faut noter que les pics de résonance des résidus Ile 118 et Gly 120 n'étant pas attribués sur la protéine sauvage, il est difficile de conclure sur l'effet de la mutation au niveau de ce brin.

L'attribution de 96% des pics de résonance des atomes H^N et N du squelette peptidique du mutant C117S, à partir de la comparaison entre les spectres TROSY (1H , ^{15}N) du sauvage et du mutant, est suffisante pour s'affranchir d'une réattribution complète du squelette peptidique du mutant qui nécessiterait des expériences de triple résonances comme l'HSQC-NOESY. Il est donc maintenant possible d'étudier l'influence du substrat sulfoxyde sur la MsrB mutée C117S.

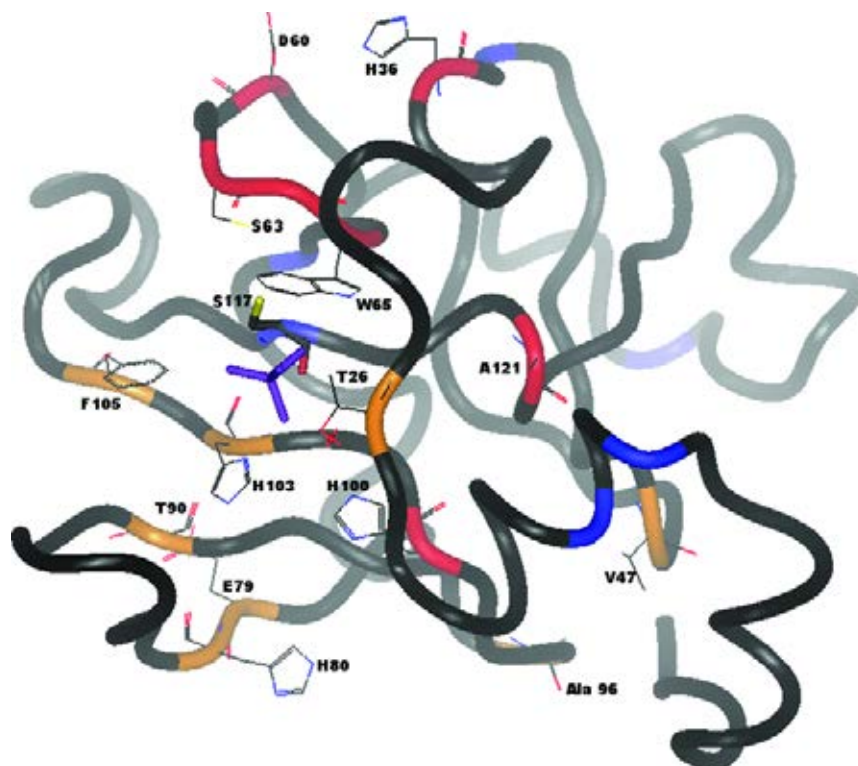


Figure 4.3 – Représentation schématique des perturbations structurales dues à la mutation C117S sur la structure 3D de la protéine sauvage en utilisant celle de *N. gonorrhoeae* comme référence [4.3]. Les résidus dont le ruban est coloré en rouge sont ceux fortement perturbés par la mutation, en orange ceux faiblement perturbés et en bleu les résidus non attribués. Les chaînes latérales des résidus perturbés sont représentés explicitement.

4.1.2 Cartographie des déplacements chimiques perturbés

4.1.2.1 Protocole

Les Msr sont des protéines non spécifiques au niveau des substrats. Tous les résidus méthionine sulfoxydes libres ou incorporés dans une chaîne peptidique sont susceptibles d'être réduits. La synthèse de plusieurs substrats potentiels et l'étude enzymatique de l'influence de ces substrats sur la MsrB ont fait l'objet d'une collaboration entre le MAEM et notre laboratoire [4.4]. Nous avons choisis le substrat Ac-L-Met-[*R,S*]-SO-NHMe qui a la plus grande valeur de $k_{\text{cat}}/K_{\text{sulfoxyde}}$ ($380 \pm 60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) pour la MsrB (figure 4.4, page suivante). k_{cat} correspond à l'efficacité catalytique et est exprimé en s^{-1} et $K_{\text{sulfoxyde}}$ correspond à la concentration du sulfoxyde nécessaire pour atteindre 50% de la vitesse maximale de catalyse. La concentration en substrat du stéréoisomère sulfoxyde [*R*] doit être divisée par deux du fait de la présence des deux stéréoisomères [*R*] et [*S*]. Par la

suite, nous indiquerons seulement la concentration du stéréoisomère [*R*] bien que nous utiliserons un substrat racémique [*R,S*] au niveau de la fonction sulfoxyde.

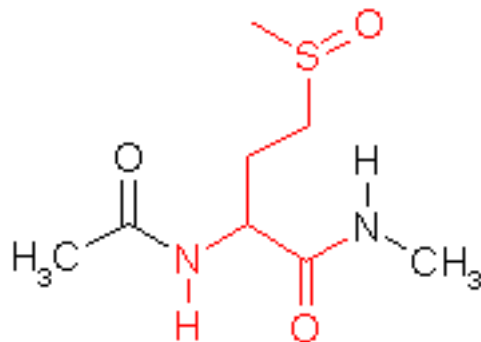


Figure 4.4 – Molécule de Ac-L-Met-SO-NHMe. En rouge est représentée le résidu méthionine sulfoxyde.

A partir d'une solution de 600 μL , tamponnée à pH 8, de MsrB C117S à 0,535 mM, nous avons ajouté une concentration croissante de substrat. En raison de la faible affinité apparente du substrat pour la MsrB, nous sommes partis d'une solution la plus concentrée possible en substrat (0,95 M). Pour chaque ajout du substrat (entre 0,5 μL et 120 μL), nous avons effectué un spectre TROSY (^1H , ^{15}N) avec une résolution de 1024×128 points et 8 scans. Après chaque ajout de substrat, l'échantillon est homogénéisé manuellement pendant au moins 10 minutes, puis laissé 20 minutes dans le spectromètre RMN, afin d'obtenir une température de l'échantillon homogène et stable. Nous avons effectué 18 mesures à des concentrations différentes en substrat (tableau 4.1, page suivante).

La concentration de la protéine diminue significativement (environ 5%) à partir de la 15^{ème} mesure et cette diminution a été prise en compte dans les calculs.

Les résultats obtenus avec les spectres TROSY (^1H , ^{15}N) sont caractéristiques d'un échange chimique rapide entre la MsrB et le substrat (figure 4.5, page 115). On observe un déplacement des pics de résonances sans diminution de leur intensité ($\leq 5\%$). De plus, la trajectoire de ces pics est régulière et linéaire ce qui permet d'exclure un deuxième site de fixation.

Nous avons également réalisé des mesures à une concentration plus faible de MsrB (0,2 mM). On remarque un déplacement identique des pics de résonance pour les mêmes résidus. Par contre, la faible intensité du signal ne nous a pas permis d'obtenir des valeurs de déplacements chimiques suffisamment précises. Nous n'avons donc pas exploité les résultats pour cette faible concentration en protéine.

n°	[S]	[P]	[S]/[P]
1	0,0	0,535	0
2	0,0027	0,535	0,005
3	0,0036	0,535	0,007
4	0,0054	0,534	0,010
5	0,0107	0,531	0,020
6	0,0267	0,530	0,050
7	0,0534	0,529	0,101
8	0,1067	0,528	0,202
9	0,2656	0,536	0,505
10	0,5305	0,525	1,01
11	1,058	0,523	2,02
12	2,642	0,522	5,06
13	5,275	0,522	10,1
14	10,49	0,519	20,2
15	20,76	0,513	40,5
16	40,63	0,502	80,9
17	77,90	0,482	162
18	144,0	0,445	323

Tableau 4.1 – Concentration en mM du substrat [S] et de la protéine MsrB [P] ainsi que le rapport substrat/protéine [S]/[P].

A partir des données obtenues, nous pouvons prévoir les résidus impliqués dans la fixation du substrat et déterminer la constante de dissociation du complexe.

4.1.2.2 Résidus influencés par la présence du substrat

L'implication d'un résidu appartenant à MsrB dans la fixation d'un substrat est mise en évidence en comparant les valeurs des déplacements chimiques de la forme libre de l'enzyme à celles de sa forme complexée dans les conditions de saturation en substrat. Selon le graphe de la figure 4.5, page ci-contre, on peut considérer que la saturation est atteinte dès 100 mM.

On peut estimer, pour chaque résidu, une valeur significative en relation avec l'influence du substrat en se basant sur la formule (4.1). La figure 4.6, page 116 met en valeur plusieurs zones différemment perturbées par la fixation du ligand mettant en évidence les résidus Tyr 59 à Ser 67, Asp 81 à Phe 83, Met 87 à Ala 96 et His 100 à Phe 105. Concernant la zone incluant la cystéine catalytique 117 (mutée en sérine), la faible perturbation observée peut s'expliquer par l'absence d'attribution de la plupart des résidus proches de Ser 117.

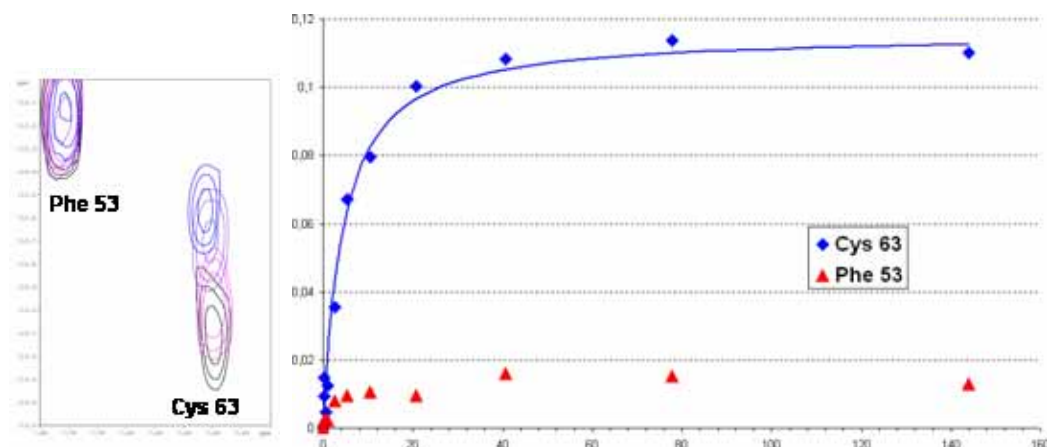


Figure 4.5 – Exemple des déplacements des pics de résonances des résidus Phe 53 et Ser 63 en fonction de la concentration en substrat. À gauche, Les contours noirs correspondent aux pics de résonances de ces résidus sans le substrat, en bleu ceux avec une concentration saturant en substrat (144 mM) et en violet ceux des états intermédiaires. Dans la partie droite de la figure, les courbes sont tracées en utilisant la formule (4.1) qui tient compte des deux fréquences des noyaux $^1\text{H}^{\text{N}}$ et ^{15}N obtenues avec l'expérience TROSY.

On peut classer les différents résidus en quatre catégories en fonction de la perturbation qu'ils subissent lors de la fixation du substrat :

- résidus très fortement perturbés : la valeur du déplacement chimique est supérieure à deux écarts types ;
- résidus perturbés : le déplacement chimique est supérieur à un écart type ;
- résidus faiblement perturbés : le déplacement chimique est supérieur à la moyenne ;
- résidus non perturbés : le déplacement chimique est inférieur à la moyenne.

Si on se réfère à la structure cristallographique de *N. gonorrhoeae*, on remarque que la plupart des résidus perturbés par la fixation du ligand se retrouvent assez proches du site actif (figure 4.7, page 117).

Les résidus Phe 105 et Asn 119 font partie du site actif. Le résidu Phe 105 maintiendrait l'hydrophobicité du site actif alors que Asn 119 stabiliserait le substrat *via* la formation d'une liaison hydrogène avec la molécule d'eau présente dans le site actif. Cette molécule d'eau stabilise le substrat en interagissant avec l'oxygène du sulfoxyde [4.3].

Le résidu Val 92, se situant à la fin du brin β_6 , fait partie du coeur de la protéine. Le résidu Phe 83, localisé dans la boucle β_5 - β_6 , est très exposé au solvant. La boucle de type épingle à cheveux (β -hairpin) β_5 - β_6 , incluant une grande partie des deux brins β_5 et β_6 , est très perturbée et concerne plus de 70% des résidus.

Les résidus Val 47 et Ser 48 ainsi que les résidus His 95, Ala 96 et Ala 97 subissent également l'influence du ligand. Ils se trouvent très éloignés du site actif mais font partie

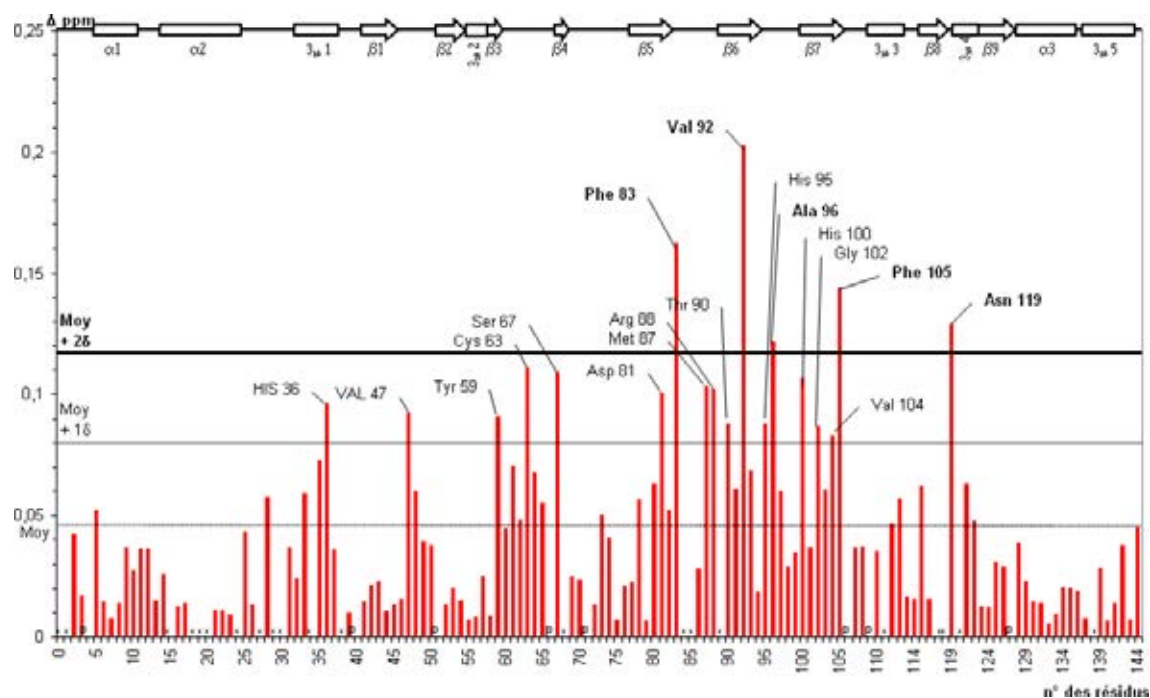


Figure 4.6 – Histogramme montrant la différence des déplacements chimiques, pour chaque résidu, de la MsrB dans ses états libre ou complexée selon la formule (4.1). La ligne en pointillé représente la moyenne de chaque déplacement chimique (0,04 ppm) ; en trait plein, la moyenne plus 1 écart type (0,08 ppm) et en trait gras, la moyenne plus 2 écarts types (0,12 ppm). Les lettres «P» et «X» représentent soit les prolines soit les résidus non attribués ou ambigus.

du site de fixation putatif du métal chez les MsrB de sous-classe I. Les MsrB de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* font partie, elles, de la sous-classe II (§ 1.3.1.2, page 18).

La boucle $\beta 4$ - $\beta 5$, comprenant la cystéine de régénération est également perturbée. Seul le résidu Asp 60 de cette boucle semble ne pas être sensible à la fixation du substrat : l'intensité de son signal est à la limite de la détection. La boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ serait stabilisée par le résidu Ser 67 qui forme une liaison hydrogène avec les résidus Ser 61 et Trp 65. La modification de l'environnement chimique du résidu Tyr 59, assez éloigné du site actif, peut s'expliquer par le mouvement d'ensemble de ses résidus proches.

Au niveau du brin $\beta 7$, comprenant les résidus His 100 et His 103, on note un profond changement perçu par la plupart des résidus. Le résidu His 100 serait plus perturbé que His 103 bien que son éloignement, dans la structure RX, de la molécule de cacodylate soit plus élevé (4,5 Å relativement à 11 Å). En effet, dans la structure cristallographique, on a pu constater que les résidus His 100 et Asn 119 stabilisent la molécule de cacodylate *via* une molécule d'eau.

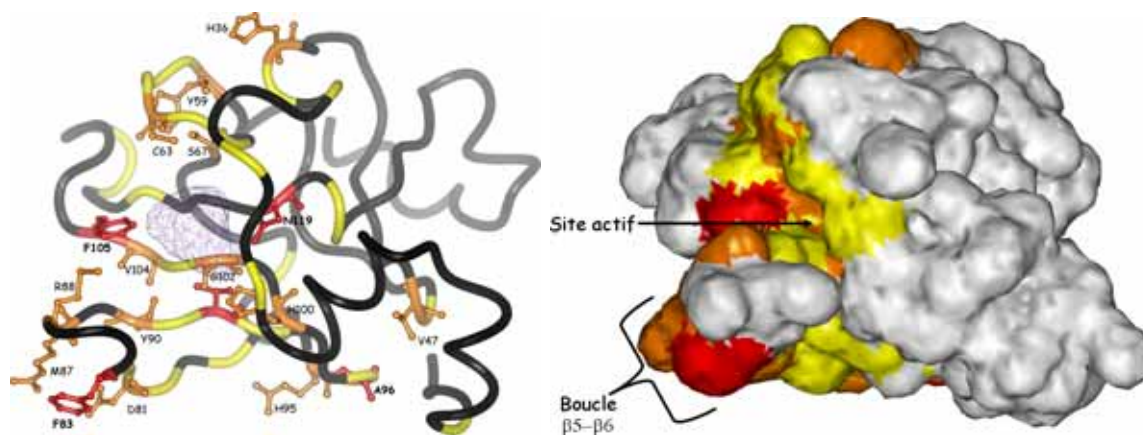


Figure 4.7 – Représentation schématique de l'influence du substrat sulfoxyde sur le mutant C117S en prenant comme référence la structure de la MsrB de *N. gonorrhoeae* obtenue par radiocristallographie [4.3]. Pour la figure de gauche, le squelette de la protéine est représenté sous la forme d'un ruban. Les chaînes latérales des résidus impliqués et fortement impliqués sont représentées en boules et bâtons. Le volume (violet) occupé par la molécule de cacodylate et par la molécule d'eau est déterminé à partir d'une formule simplifiée de l'équation de Connolly. Pour la figure de droite, la surface de MsrB est également calculée par une formule simplifiée de l'équation de Connolly. Pour les deux figures, les couleurs des résidus varient en fonction de la perturbation de leur pics de résonances. Les résidus fortement perturbés sont en rouge, perturbés en orange et faiblement perturbés en jaune. L'histidine 95 est remplacée par une arginine chez *N. gonorrhoeae*. L'orientation de la MsrB est la même pour les deux figures.

4.1.2.3 Constante de dissociation

Dans le cas d'un échange rapide, le déplacement chimique est directement lié au rapport entre les deux populations relatives des deux états de la protéine (libre et complexée) [4.5]. Nous pouvons estimer la valeur de la constante de dissociation (K_D) du complexe à partir de l'équation (2.10), page 60. Le composé Ac-L-Met-[*R,S*]-SO-NHMe est un substrat de petite taille et son influence sur la protéine n'est pas identique vis-à-vis de tous les résidus. Nous avons ainsi pris en compte uniquement les résidus perturbés et fortement perturbés dans le calcul du K_D . Il a été effectué en minimisant, par gradient conjugué, la différence entre les résultats expérimentaux et la courbe théorique [4.6].

Pour chaque résidu nous obtenons une valeur de K_D différente. La moyenne de ces valeurs est de 18 ± 10 mM pour l'isomère *R*. A partir de cette valeur, nous pouvons évaluer à environ 80% de complexes formés pour une concentration de 0,5 mM de protéine et 70 mM de substrat. Pour atteindre 90% de complexes, il faut une concentration en substrat de plus de 160 mM.

4.1.3 Études du pKa des histidines 100 et 103

4.1.3.1 Hypothèse sur le rôle des histidines 100 et 103

L'étape de réduction du substrat sulfoxyde nécessite la présence d'un catalyseur acide (schéma page 107). Selon la structure RX, un des atomes d'oxygène de la molécule de cacodylate se trouve proche d'un atome d'azote de la chaîne latérale de His 103. Le résidu His 100 est également intéressant car il forme une liaison hydrogène avec la molécule d'eau présente dans le site actif (figure 4.8). L'histidine est le seul acide aminé dont la chaîne latérale peut être acide ou basique selon les valeurs physiologiques locales de pH. La connaissance de la valeur des pKa de ces deux histidines peut être intéressante pour la compréhension et la justification du mécanisme catalytique proposé.

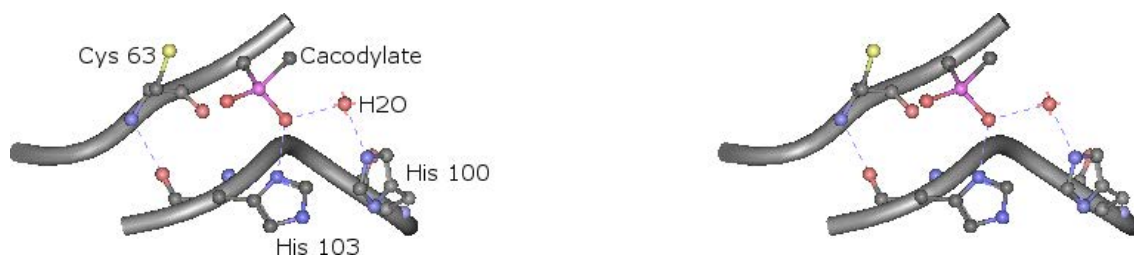


Figure 4.8 – Représentation stéréographique d'une partie du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. L'histidine 103 ainsi que de l'histidine 100 sont dans le voisinage de la molécule de cacodylate. Les traits pointillés bleu représentent les liaisons hydrogène potentielles.

Grâce à certaines expériences de RMN particulières, il est possible de caractériser les protons portés par les carbones δ_2 et ε_1 des histidines représentés sur la figure 4.9, page suivante. Les raies de résonance de ces deux protons apparaissent dans le domaine 6-9 ppm et subissent directement l'influence de la charge positive du noyau imidazolium [4.7]. Cet intervalle de déplacements chimiques correspond également à celui des protons amides et aromatiques. En utilisant de l'eau lourde (D_2O) comme solvant, on s'affranchit des signaux des protons amidiques échangeables. L'avantage de cette méthode est de pouvoir travailler directement avec des protéines non marquées.

4.1.3.2 Protocole expérimental

La MsrB de *N. meningitidis* comporte 6 histidines (His 32, His 36, His 80, His 95, His 100 et His 103). Les deux histidines ayant une implication possible au niveau du mécanisme catalytique sont His 100 et His 103. Plusieurs mutants de MsrB ont été produits pour cette étude :

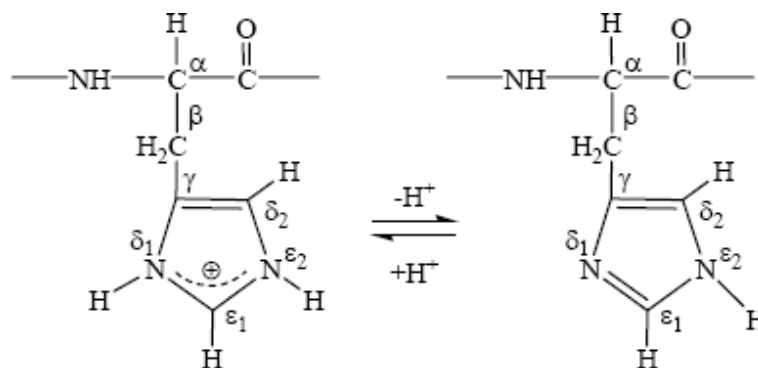


Figure 4.9 – Représentation de l'acide aminé His sous ses formes protonée et non protonée.

- la MsrB sauvage : cette protéine sert de témoin ; en effet nous ne pouvons pas utiliser la protéine sauvage pour les études d'interaction sans initier la réduction du substrat.
- le mutant C117S : la cystéine catalytique est mutée. Nous avons effectué avec ce mutant l'étude comparative de la forme libre (sans substrat) et de la forme liée (avec saturation en substrat).
- les doubles mutants C117S/H103A et C117S/H100A : ces mutants vont nous permettre d'attribuer les raies de résonance correspondant aux atomes H δ_2 et H ϵ_1 de His 100 et His 103 (figure 4.9).

La protéine C117S a été produite et purifiée comme décrit précédemment. Elle a ensuite été lyophilisée, remise en solution dans D₂O puis maintenue 12h à température ambiante avant d'effectuer les expériences RMN. La variation du pH se fait en ajoutant de faibles volumes de DCl et NaOD de l'ordre de 2 μ L. La différence de la mesure du pH dans H₂O et dans D₂O est de 0,4. Cette valeur sera prise en compte pour le calcul du pKa. Pour chaque spectre RMN 1D, nous avons effectué deux mesures pour contrôler le pH : l'une, 10 minutes après avoir ajouté DCl ou NaOD et l'autre, après l'enregistrement du spectre RMN. Ces deux mesures sont moyennées et si la différence entre les deux valeurs de pH est trop importante ($\geq 0,1$) la mesure est rejetée. Afin d'être au maximum de saturation tout en maintenant la lisibilité des spectres, la concentration du substrat a été fixée à 150 mM pour une concentration en protéine de 0,5 mM lors des expériences de saturation (89% de complexe présent). Au dessus de 150 mM de substrat, le rapport substrat/protéine était trop important et entraînait une mauvaise visibilité sur le spectre RMN 1D.

4.1.3.3 Résultats

A partir de l'étude des doubles mutants C117S/H103A et C117S/H100A, il nous a seulement été possible d'attribuer un seul proton de His 103, probablement H^{δ_2} du fait de la valeur de son déplacement chimique ($\approx 6,5$ ppm à pH 8). La caractérisation des autres protons des résidus His 103 et His 100 n'a pu être réalisée, ou bien parce qu'on ne les discerne pas des autres protons aromatiques, ou bien que leurs raies de résonance, à cause d'une dynamique particulière, soient trop élargies pour être visibles.

Nous avons effectué 30 mesures différentes pour le mutant C117S libre (2×15) dans un intervalle de pH allant de 6,65 à 11,15 (figure 4.10, page ci-contre). Par contre, pour le mutant C117S lié, seulement 16 mesures (2×8) ont pu être réalisées. A cause de la concentration importante du substrat (300 fois celle de la protéine) pour des valeurs de pH inférieures à 7,5, un début de précipitation de la protéine nous empêchait d'attribuer correctement les raies de résonance. A partir d'un pH supérieur à 9,5, les valeurs de déplacement chimique n'ont pas été prises en compte : on observe alors une diminution progressive de l'intervalle spectral, caractéristique de la dénaturation de la protéine.

Le calcul du pKa des formes libre et liée a été effectué en utilisant un logiciel libre : le logiciel *pKaFit*¹ qui permet d'ajuster les données RMN de titration à l'équation Henderson-Hasselbach [4.7, 4.8]. Le calcul nous donne une valeur de pKa de $7,2 \pm 0,1$ pour la forme libre et $7,8 \pm 0,2$ pour la forme liée chez le mutant C117S (figure 4.11, page 122). On remarque une augmentation de 0,6 unité du pKa de His 103. La présence du substrat au niveau du site actif permettrait à His 103 de céder un proton pour activer la réaction.

4.1.4 Discussion

En suivant l'évolution des déplacements chimiques des atomes H^N et N du squelette peptidique de MsrB en fonction de la concentration du substrat Ac-L-Met-[R,S]-SO-NHMe, nous nous attendions à observer des perturbations au sein d'un nombre limité de résidus. L'histogramme 4.6, page 116 ainsi que la figure 4.7, page 117 montrent que le nombre des résidus de MsrB impliqués dans la fixation du substrat est plus important et que ces derniers ne concernent pas uniquement ceux du site actif mais aussi ceux de la boucle β_5 - β_6 et ceux situés au niveau du site putatif de fixation du métal.

La valeur de K_D obtenue pour la MsrB avec le substrat Ac-L-Met-[R,S]-SO-NHMe nous indique une faible affinité entre les deux partenaires. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'une reconnaissance non spécifique entre la MsrB et le substrat. En effet, la MsrB n'est pas spécifique d'un substrat mais plutôt d'un ensemble de substrats dont le lien com-

¹<http://www.nmrfam.wisc.edu/~hwa/software.html>

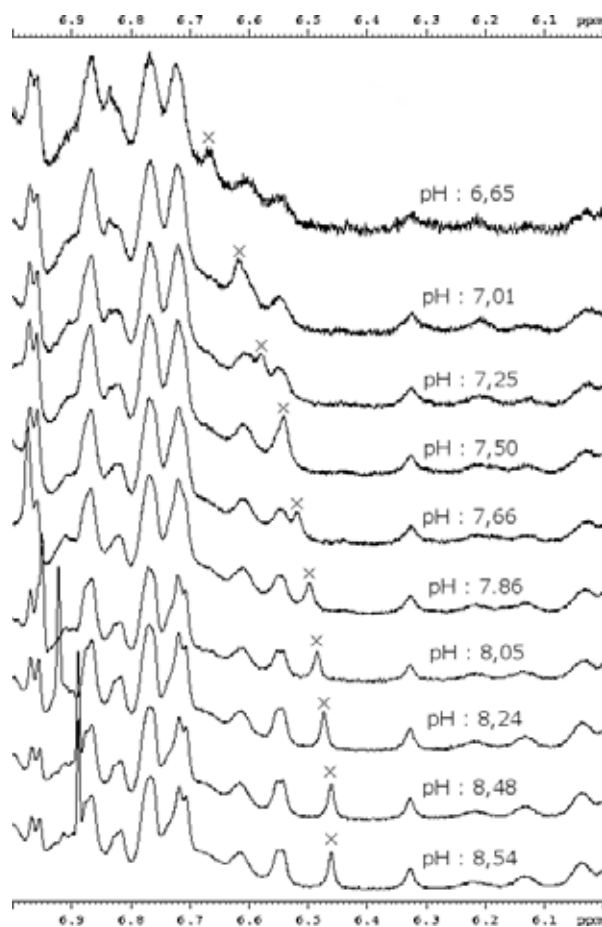


Figure 4.10 – Représentation d’une partie des spectres 1D du mutant C117S dans D_2O à différents pH. La croix indique l’emplacement de la raie de résonance attribuée à l’atome $H^{\delta 2}$ du résidu His103.

mun est la présence d’une méthionine sulfoxyde. Par contre, lorsqu’il y a reconnaissance, l’activité réductase devient très rapide ($\geq 50 \text{ s}^{-1}$) à pH 8 [4.9]. La mutation peut également intervenir dans la valeur du K_D . La présence d’une sérine à la place d’une cystéine pourrait engendrer une modification du site actif, ce qui diminuerait la capacité qu’a la MsrB de fixer un substrat. De plus, on peut s’étonner de la faible implication du résidu Trp 65 dont le rôle serait de stabiliser le méthyle de la chaîne latérale de la MetSO. Une hypothèse est que la mutation C117S engendrerait un déplacement de la chaîne latérale de Trp 65. La chaîne latérale serait éloignée du site actif et entraînerait une diminution de l’affinité avec le substrat.

Plus de 70% des résidus situés sur l’épingle à cheveux $\beta 5$ - $\beta 6$ sont perturbés par la fixation du ligand (25% n’ont pu être attribués). De plus, le résidu le plus perturbé par la fixation du substrat est Val 92 qui est situé sur le brin $\beta 6$. Le résidu Val 92 est proche

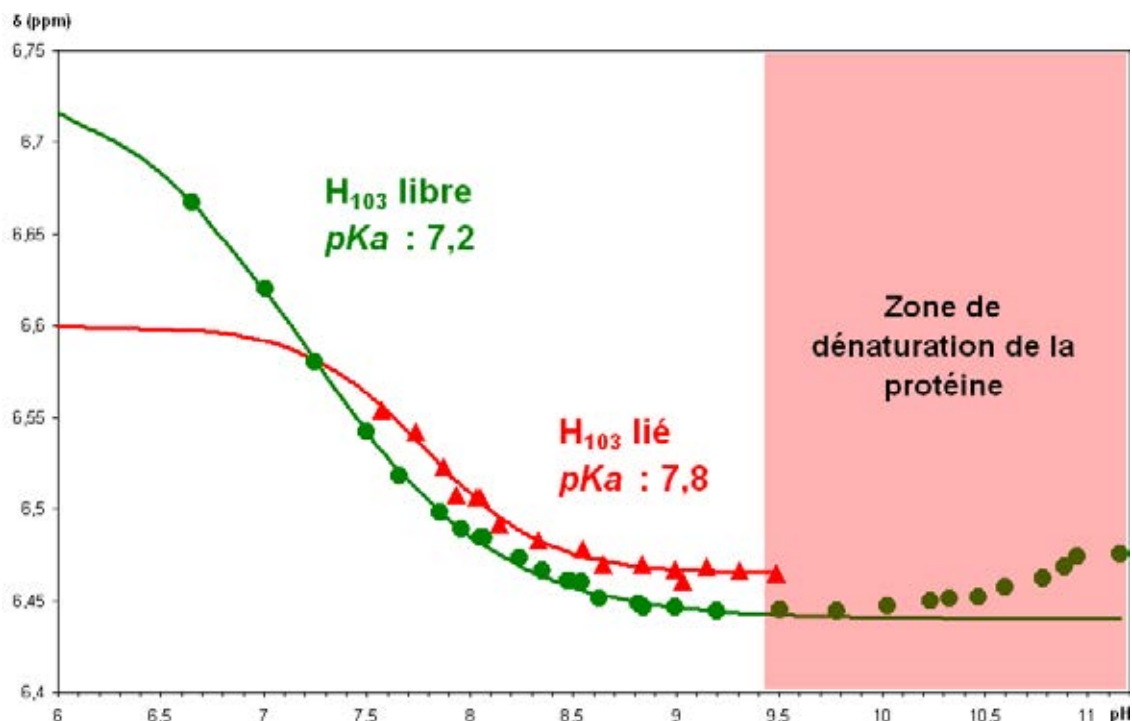


Figure 4.11 – Courbes de titration ($\delta = f(pH)$) de la forme libre (vert) et liée (rouge). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes sont calculées à partir des formules incluses dans le logiciel *pKaFit*.

des résidus His 100 et His 103. L'interaction du substrat avec ces deux histidines pourrait entraîner une perturbation au niveau du résidu Val 92 et donc une modification des interactions entre les brins $\beta 5$ et $\beta 6$. Cette grande boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ est stabilisée par les deux ponts salins Asp 81 - Arg 88 et Glu 91 - Arg 93. La distance entre certains résidus de cette boucle par rapport au site actif exclut une interaction directe avec le substrat. L'hypothèse est que cette boucle aurait une flexibilité suffisante pour autoriser l'entrée d'un substrat dans le site actif. De plus, la mutation de la cystéine catalytique entraîne une variation de l'environnement chimique des résidus Glu 79, His 80 et Thr 90 situés dans la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$. Au niveau de la structure cristallographique (figure 4.12, page ci-contre), la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ semble être à moitié posée sur la molécule de cacodylate. La structure cristallographique représenterait ainsi l'interaction entre la MsrB et le substrat. Dans la forme réduite et sans substrat, cette boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ serait soit, repliée sur la protéine et fermerait le site actif; soit, complètement ouverte et se refermerait plus ou moins en fonction de la taille du substrat. Si on considère que toutes les protéines, possédant une Met-[R]-SO, sont potentiellement des substrats de la MsrB, il semble normal d'envisager un mouvement

de cette boucle. La flexibilité de cette boucle favoriserait l'accès au site actif tout en offrant une surface de contact plus importante entre la MsrB et une autre protéine.

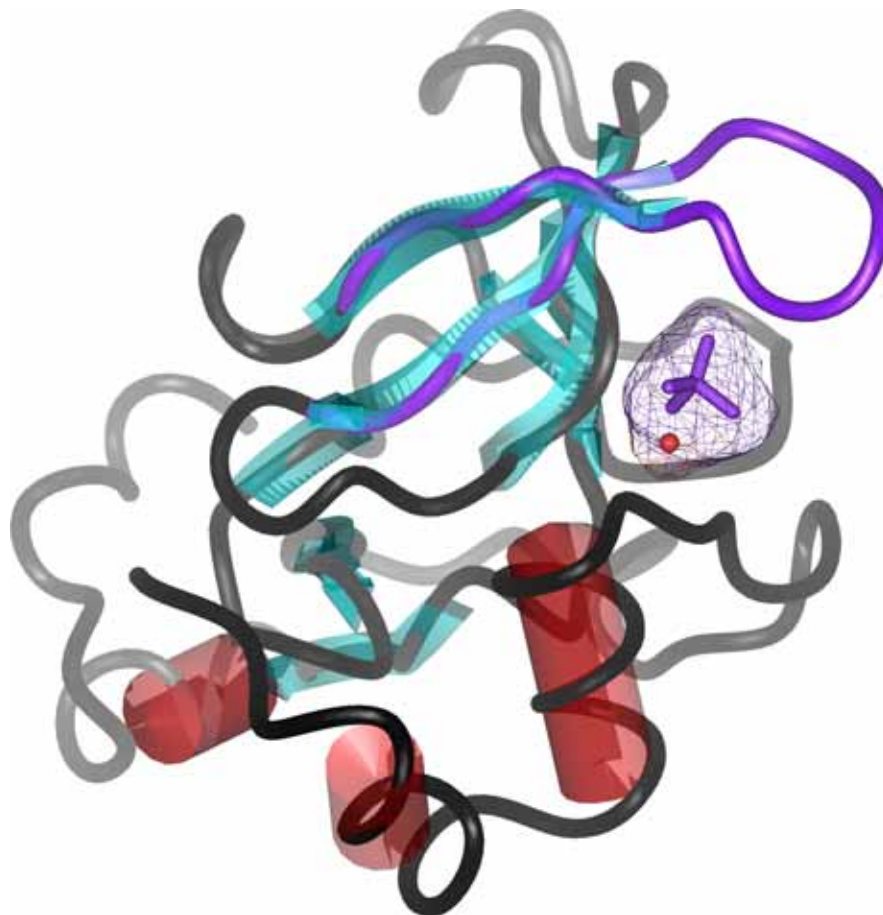


Figure 4.12 – Représentation de la position de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ au niveau de la structure de la protéine MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les structures secondaires sont représentées en bleu (feuillets β) et en rouge (hélice α). La molécule de cacodylate est représentée en violet avec sa surface. Le squelette de l'épingle à cheveux $\beta 5$ - $\beta 6$ est représenté également en violet.

Les résidus Ser 48 et Ala 97, perturbés aussi par la fixation du substrat, sont deux résidus formant le site putatif de liaison du métal. L'interaction MsrB/substrat sulfoxyde générerait alors une perturbation «à longue distance» de ce site. Cela peut s'expliquer par une flexibilité importante de la protéine lors de la fixation du substrat. Au regard des résultats de nos études d'interaction, on pourrait invoquer un effet «mémoire» entre le site de fixation du substrat et le site putatif de fixation du métal. Le rôle du métal chez les MsrB de sous-classe I n'est pas encore bien défini. Si une absence de ce métal chez *E. coli* entraîne une perte de l'activité réductase, par contre une insertion du métal

chez les MsrB de sous-classe II ne modifie pas l'activité réductase mais rend impossible la réduction du pont disulfure par la Trx [4.10].

Pour comprendre plus finement le mécanisme global d'interaction de la MsrB avec son substrat, nous avons entrepris une étude sur le résidu His 103 qui jouerait le rôle d'un catalyseur acide. On observe une augmentation de 0,6 unité de pKa entre la forme libre (7,2) et la forme complexée (7,8). Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par le groupe du Pr. G. Branlant qui obtient une valeur de pKa de 8 pour la forme complexée et attribuée au pKa du résidu His 103 [4.10]. L'importance du résidu His 103 est confirmée par des études de mutagenèse dirigée qui montrent que la vitesse de réaction est diminuée d'un facteur 6000 entre la protéine sauvage ($k_{obs} \approx 30 \text{ s}^{-1}$) et le mutant H103N ($k_{obs} \approx 0,0050 \text{ s}^{-1}$) (communication personnelle). Une augmentation du pKa de 0,6 unité pour His 103 montre bien que ce résidu est le catalyseur acide de la réaction. Le pourcentage d'ionisation du résidu His 103 diminue de 30% en présence du substrat facilitant ainsi la libération d'un proton.

Nos études des interactions mettent en évidence une flexibilité accrue de MsrB à l'approche du ligand en ce qui concerne la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$. La perturbation des résidus présents dans le site putatif de liaison du métal montre également une dynamique particulière de la protéine lors de la fixation du ligand. La fixation du substrat au niveau de ce site putatif de fixation du métal est à exclure car le profil de perturbation des déplacements chimiques est linéaire. Il serait intéressant d'analyser les différences de dynamique entre la forme libre et la forme complexée afin de confirmer le mouvement de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ mais également de comprendre plus précisément le rôle du site putatif de fixation du métal.

4.2 Intermédiaire acide sulfénique

La réduction d'une méthionine sulfoxyde entraîne une oxydation de la MsrB formant ainsi un acide sulfénique au niveau de la cystéine catalytique (Cys 117). Cet intermédiaire a une durée de vie très courte car la cystéine de régénération (Cys 63) forme un pont disulfure intramoléculaire via l'attaque, par son thiolate, au niveau du soufre de l'acide sulfénique de la Cys 117 [4.9, 4.11]. Afin de bloquer cet intermédiaire, nous avons remplacé par mutagenèse dirigée la cystéine de régénération par une sérine afin d'interdire la formation du pont disulfure ; ce mutant sera représenté par C63S.

Dans un premier temps, nous étudierons le mutant C63S pour ensuite comprendre la formation de l'intermédiaire acide sulfénique dû à la réaction entre la MetSO et le mutant C63S.

4.2.1 Le mutant C63S

La production du mutant C63S a été réalisée dans un milieu minimum, enrichi en ^{15}N . L'intérêt de ce mutant est double. Il permet de bloquer le mécanisme catalytique au niveau de l'intermédiaire sulfénique mais va servir également à étudier les possibilités d'interaction de la MsrB avec la Trx. Ce dernier point sera étudié dans la dernière partie de ce chapitre.

4.2.1.1 Spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C63S

L'aspect du spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C63S et la répartition des pics de corrélations $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ des résidus correspondent à un spectre de protéine structurée. La superposition des spectres TROSY du sauvage et du mutant C63S nous permet d'attribuer 97% des résidus par rapport au sauvage (figure 4.13, page suivante). Seuls quatre pics n'ont pas pu être attribués, dont celui du résidu Ser 63. Deux pics ne sont pas identifiables (Tyr 18 et Ala 138) alors que celui de Glu 15 est vraisemblablement superposé avec un autre pic non attribué chez le sauvage. Les propriétés conformationnelles des résidus Glu 15, Tyr 18 et Ala 138, d'après la structure cristallographique, ne semblent pas pouvoir être altérées par la mutation de par la distance qui les sépare avec Cys 63.

4.2.1.2 Les résidus perturbés par la mutation

Le calcul de la différence des déplacements chimiques (Δ) de la protéine sauvage avec ceux du mutant C63S montre un histogramme (figure 4.14, page 127) différent de celui du

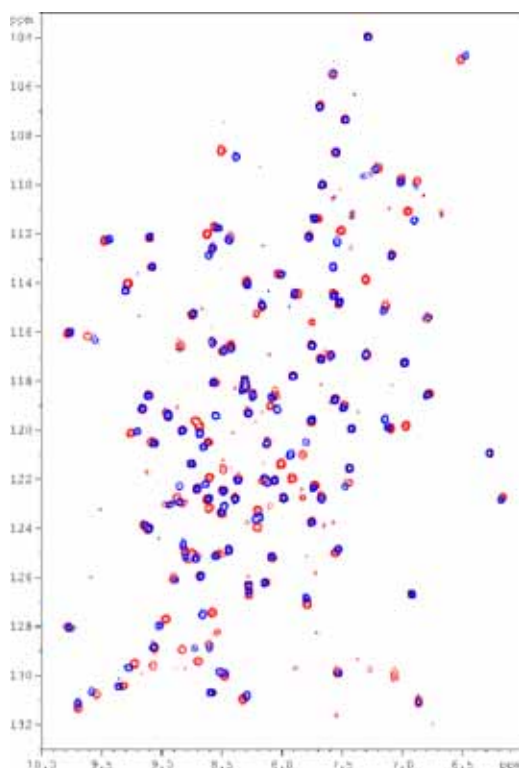


Figure 4.13 – Superposition des spectres TROSY de la MsrB sauvage (rouge) et du mutant C63S (bleu).

mutant C117S (figure 4.2, page 111). La plupart des résidus les plus touchés sont proches de la mutation à l'inverse des résultats observés avec le mutant C117S où les résidus les plus perturbés n'étaient pas ceux au voisinage de Cys 117. Nous avons utilisé la même méthode pour caractériser la perturbation des résidus que celle mise en oeuvre dans le cas du mutant C117S (§ 4.1.1.2).

La zone la plus affectée est la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ qui inclut la cystéine de régénération (celle précisément mutée). Dans le cas de cette mutation, on peut dire qu'elle n'engendre que des perturbations locales. Les deux autres résidus, fortement perturbés, sont Glu 79 et His 103. Si on compare les deux histogrammes des mutants C117S et C63S (figures 4.2, page 111 et 4.14, page suivante), on remarque que les échelles des ordonnées sont différentes. La valeur maximale de la différence des déplacements chimiques du mutant C117S est largement supérieure (0,58 ppm) à celle du mutant C63S (0,23 ppm), mais la moyenne ne varie pas énormément (respectivement 0,05 et 0,04 ppm). Par contre, bien que les sites de mutation soient différents, la zone la plus touchée reste la même (boucle $\beta 3$ - $\beta 4$). Ceci semble indiquer que dans la structure 3D de la protéine sauvage, le résidu Cys 117 se trouverait à proximité de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et du résidu Cys 63

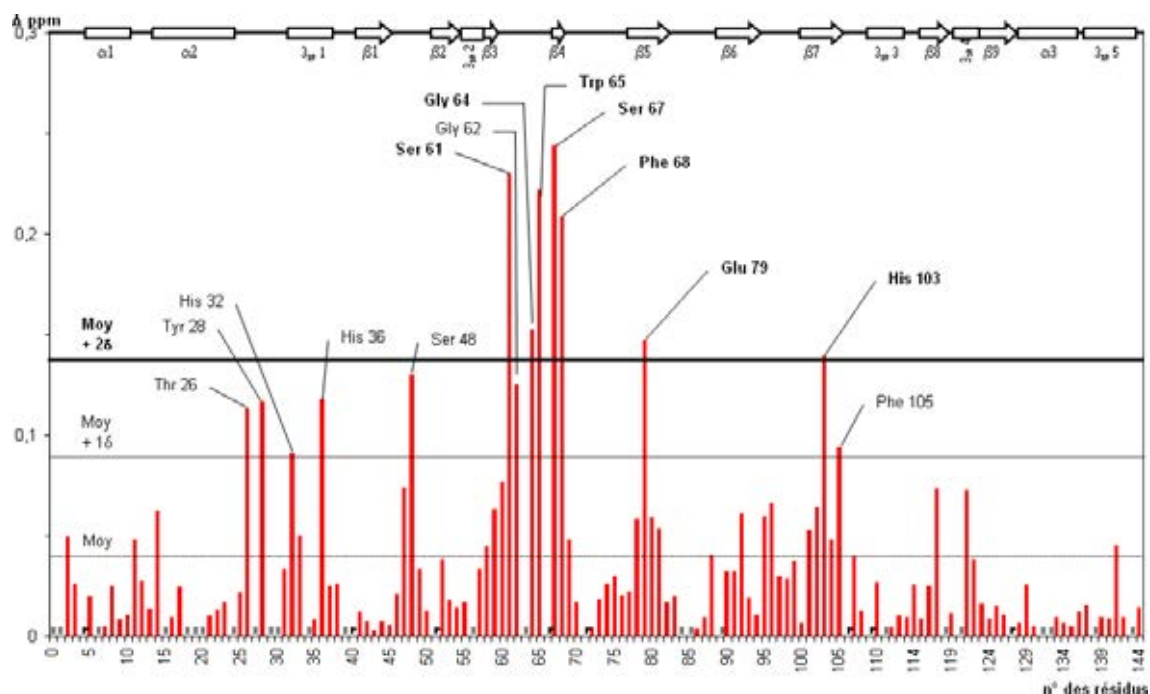


Figure 4.14 – Histogramme montrant la différence des déplacements chimiques (Δ) selon la formule (4.1) pour chaque résidu du mutant C63S. Le trait pointillé représente la moyenne des (Δ) des déplacements chimiques (0,04 ppm), le trait plein la moyenne plus un écart type (0,09 ppm) et le trait gras la moyenne plus deux écarts types (0,13 ppm). Les structures secondaires issues de *N. gonorrhoeae* sont représentées sur la partie supérieure de l’histogramme. Les lettres «P» et «X» représentent soit les prolines soit les résidus non attribués ou ambigus.

4.2.1.3 Répartition spatiale des résidus perturbés

Pour visualiser l’effet de la mutation C63S sur l’environnement chimique des autres résidus, nous avons consigné en différentes couleurs les résidus affectés en fonction de l’amplitude des valeurs Δ sur la structure cristallographique de la MsrB [4.3]. On constate une localisation ciblée de l’effet de la mutation C63S (figure 4.15, page suivante). La plupart des résidus se retrouvent très proches du résidu Ser 63. Certains résidus (Tyr 28, His 32 et His 36) appartenant à la boucle $\alpha2$ - $\alpha3$, sont situés «au dessus» de la boucle $\beta3$ - $\beta4$. Il semblerait que ce soit la perturbation de cette dernière qui entraîne la modification observée au sein de ces résidus. Le résidu Ser 48 qui est très éloigné du site actif est aussi légèrement affecté. Ce résidu appartient au site putatif de fixation du métal mais il est le seul à être affecté de ce site, si bien qu’on ne peut conclure sur une relation qui existerait entre la mutation C63S et le site putatif de liaison au métal comme cela a pu être montré pour le mutant C117S.

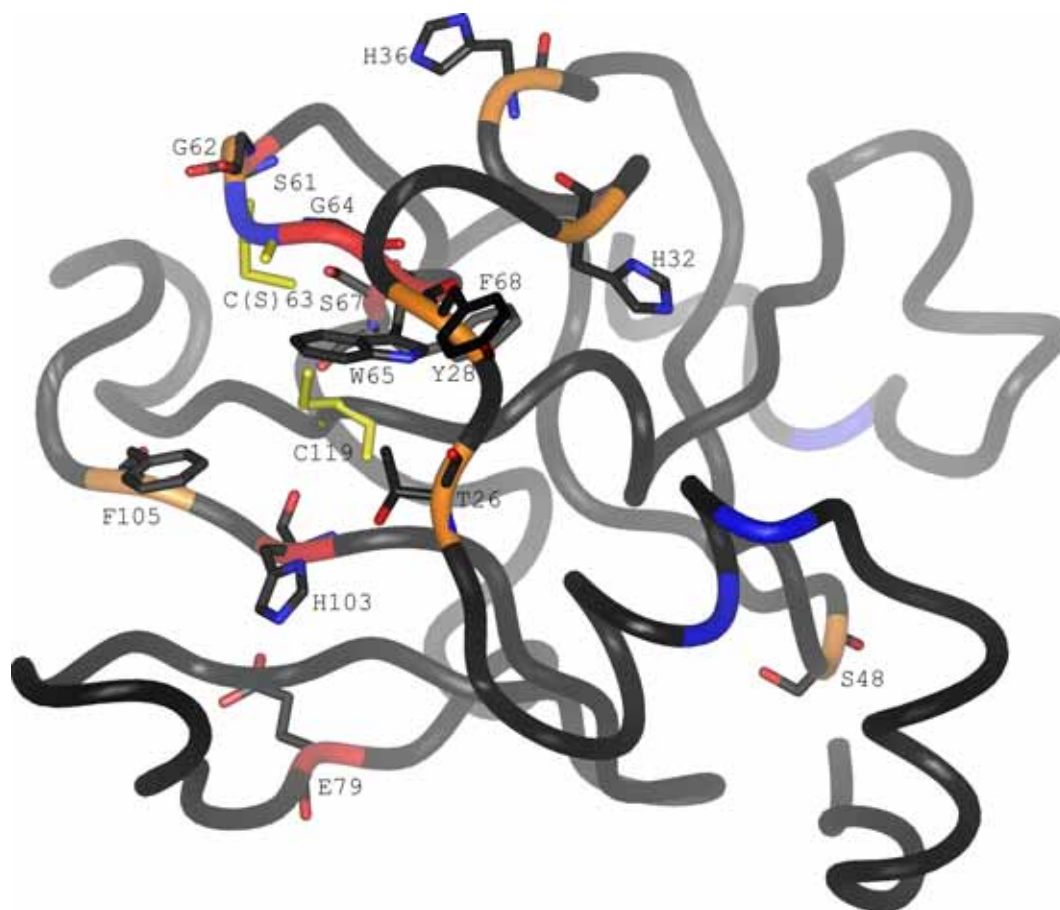


Figure 4.15 – Visualisation des résidus affectés par la mutation C63S. L’ampleur de la perturbation selon les valeurs respectives de Δ est reportée sur la structure tridimensionnelle de le MsrB de *N. gonorrhoeae* obtenue par RX [4.3]. Les résidus dont le ruban est colorié en rouge, sont ceux fortement perturbés par la mutation C63S ; en orange, ceux faiblement perturbés et en bleu, les résidus non attribués. Les chaînes latérales des résidus perturbés sont représentées explicitement sous forme de bâtonnet, celles de Cys (Ser) 63 et Cys 117 sont coloriés en jaune.

En conclusion, par comparaison avec les spectres TROSY de la protéine sauvage, nous avons pu attribuer 97% des résidus dans le spectre TROSY du mutant C63S. La perturbation la plus importante par rapport à la forme sauvage se situe dans la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et ne semble pas influencer l’ensemble de la structure et notamment, celle des deux petits brins $\beta 3$ et $\beta 4$ eux mêmes. L’étude ainsi faite de ce mutant va nous permettre d’étudier les caractéristiques de l’intermédiaire acide sulfénique ainsi que les études d’interaction entre la MsrB et la Trx.

4.2.2 Étude de la formation de l'acide sulfénique

4.2.2.1 Protocole / théorie

A une solution aqueuse de MsrB C63S 0,56 mM, nous avons ajouté, en quantité croissante, de la L-Met-[*R,S*]-SO. Dans ce cas, l'affinité du substrat, n'a pas d'importance car c'est une réaction irréversible et le déplacement vers l'intermédiaire sulfénique est très rapide; nous n'avons donc pas utilisé le substrat doublement protégé sur ses fonctions N et C terminales pour réduire au maximum le signaux du substrat. Nous avons, pour plusieurs rapports [C63S]/[MetSO], effectué un spectre TROSY (^1H , ^{15}N) avec 1024×128 points et 8 scans (tableau 4.2). A chaque ajout, le tube est homogénéisé pendant 10 minutes, puis laissé 20 minutes au sein du spectromètre RMN afin d'obtenir une température homogène et stable de l'échantillon. La réaction est très rapide, elle n'évolue plus cinétiquement lorsque débute l'enregistrement des spectres RMN.

N° expérience	1	2	3	4	5	6	7
[C63S] _{tot} (mM)	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,55	0,55
[L-Met <i>R</i> -SO] (mM)	0	0,03	0,056	0,14	0,28	0,545	1,37
Rapport Substrat / Protéine	0	1/19	1/10	1/4	1/2	1/1	2,5/1

Tableau 4.2 – Concentration des différents mélanges de C63S et de MetSO étudiés par RMN. L'ajout de substrat a entraîné une dilution de la protéine d'environ 2%. On peut ainsi admettre l'effet de cette dilution comme négligeable.

En ajoutant le substrat, d'après le mécanisme catalytique (figure 1.11, page 23), nous allons augmenter la concentration de l'intermédiaire sulfénique au dépend du mutant C63S réduit originel. Au niveau du spectre TROSY (^1H , ^{15}N), cela va se traduire par une diminution de l'intensité des pics de résonance du mutant C63S réduit au profit d'une augmentation de l'intensité des tâches de résonance correspondant à l'intermédiaire sulfénique. Expérimentalement, un certain nombre de résidus ne seront pas influencés par la formation du sulfénique. Ainsi, la fréquence de leurs pics de résonance ne changera pas et l'intensité des pics en question restera par conséquent la même. Par contre, il est plus difficile d'attribuer les tâches correspondant aux résidus proches du site de l'intermédiaire sulfénique surtout pour ceux qui subissent une forte perturbation car les tâches se retrouvent à une position qui pourrait être complètement différente sur le spectre HSQC (^1H , ^{15}N). L'attribution de ces résidus nécessiterait une réattribution de la protéine; c'est

pour cela qu'il est plus simple de ne visualiser que la diminution de l'intensité des pics correspondant au mutant C63S réduit.

4.2.2.2 Effet de l'ajout de MetSO

Après analyse des spectres, 21 résidus n'ont pas été pris en compte dans le calcul de l'intensité des raies de résonance pour deux raisons :

- Ils n'ont pas été attribués chez le mutant ;
- la superposition des pics entraîne une erreur trop importante sur la mesure de l'intensité.

Si on porte le rapport des intensités I/I_0 (avec I , l'intensité du pic affecté et I_0 , l'intensité du pic avant addition de MetSO) du pic d'un résidu donné en fonction de la concentration, on remarque principalement deux tendances qui correspondent aux résidus soit impliqués comme Cys 117 soit non impliqués comme Gly 135 (figure 4.16).

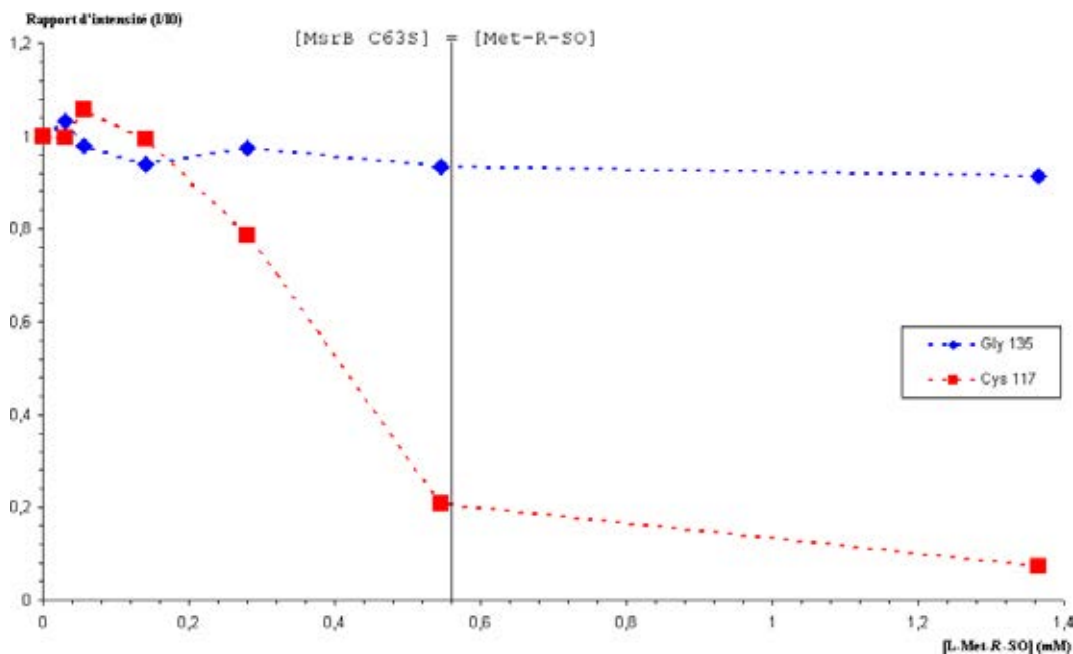


Figure 4.16 – Exemple de deux cas d'évolution du rapport d'intensité I/I_0 des pics de résonance des signaux H^N-N de la forme réduite du mutant C63S sur le spectre TROSY (1H , ^{15}N) en fonction de la concentration en L-Met-R-SO. La concentration de la protéine est constante (0,55 à 0,56 mM). On suppose que la réaction est totale lorsque l'on commence l'enregistrement des spectres.

Nous avons calculé la différence des pics des spectres TROSY des résidus du mutant C63S sans et avec 1,37 mM de substrat L-Met-R-SO. L'histogramme 4.17, page ci-contre

montre que cinq séquences subissent une forte perturbation de leur environnement chimique. Trois d'entre elles (Tyr 60-Arg 70, His 100-Asp 107 et Arg 115-Ala 121) font partie du site actif et intègrent la plupart des résidus impliqués dans la fixation du ligand. Les deux autres séquences (Tyr 28-Lys 39 et Met 88-Arg 93) présentent pas ou peu de résidus impliqués dans le site actif. Les valeurs des différences d'intensités entre I_0 et I_{\max} , comprises entre 0,2 et 0,6, sont liées à un faible changement de l'environnement chimique des résidus perturbé par la formation de l'intermédiaire sulfénique. Dans ce cas, l'intégration des pics du mutant C63S réduit est profondément gênée par la forte contribution des pics associés au sulfénique car leurs signaux respectifs se chevauchent.

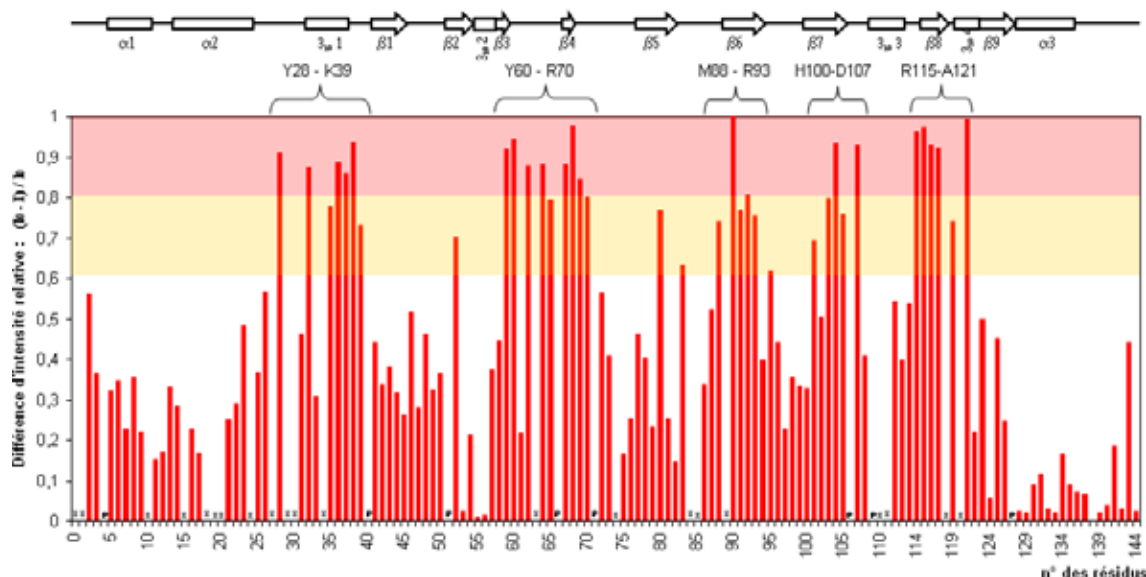


Figure 4.17 – Histogramme montrant la différence des intensités des pics des spectres TROSY (^1H , ^{15}N) des résidus du mutant C63S sans et avec une concentration de 1,37 mM de L-Met-*R*-SO. L'intensité des pics avec 1,37 mM de L-Met-*R*-SO est calculée en fonction de l'intensité résiduelle du pic correspondant au mutant C63S réduit. La concentration totale de protéine reste constante (0,55 à 0,56 mM).

En visualisant les résidus affectés sur la structure cristalline de *N. gonorrhoeae*, on remarque que c'est toute une zone particulière de la protéine qui est structurellement modifiée (figure 4.18, page suivante) : la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ comprenant la cystéine de régénération ; le brin $\beta 7$ comprenant les résidus His 100 et His 103 ; le brin $\beta 8$ comprenant la cystéine catalytique. La perturbation liée à la formation de l'intermédiaire sulfénique ne se localise pas uniquement au voisinage du site actif mais s'étend sur deux autres zones : celle correspondant aux résidus de Tyr 28 à Lys 39 qui interagit avec la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et celle correspondant aux résidus de Met 88 à Arg 93, situés sur le brin $\beta 6$ qui interagit avec le brin $\beta 7$ correspondant à la séquence consensus $\text{H}_{100} \text{LGHVF}_{105}$.

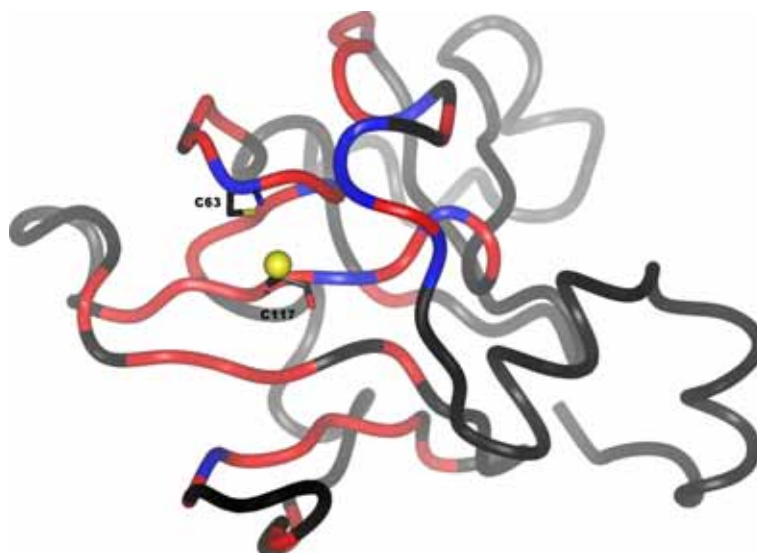


Figure 4.18 – Visualisation des résidus affectés par l’ajout de MetSO en prenant comme référence de la structure cristallographique de MsrB de *N. gonorrhoeae*. Le squelette de la protéine est représenté sous la forme d’un ruban. Les résidus perturbés par la présence de l’acide sulfénique sont colorés en rouge au niveau du squelette. En bleu, sont représentés les résidus non attribués mais proches de résidus perturbés. Les deux cystéines, Cys 63 et Cys 117, sont représentées sous forme bâton. L’atome de soufre portant la fonction sulfénique est représenté sous la forme d’une boule jaune.

4.2.3 Discussion

La formation de l’intermédiaire acide sulfénique est l’étape qui permet le relargage d’une molécule de méthionine et qui précède la formation du pont disulfure. Les résultats montrent une forte modification spatiale de la protéine sous l’influence de la présence de l’intermédiaire acide sulfénique. Le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C63S soumis à la concentration la plus élevée en MetSO met en évidence un regroupement de certaines tâches de résonance au centre du spectre. Ceci est caractéristique d’une déstructuration partielle de certaines zones de la protéine certainement en relation avec la présence de l’acide sulfénique. La partie de la protéine la plus perturbée est celle comprenant les deux cystéines intervenant dans la catalyse. Un réarrangement conformationnel à ce niveau de la protéine pourrait faciliter la formation du pont disulfure intramolécule entre ces deux cystéines. On ne peut cependant pas négliger le fait que la mutation de la cystéine de régénération peut également jouer un rôle sur la déstructuration de la protéine.

De même le substrat, sous ses formes réduite et oxydée présentes dans le mélange, peut participer à la déstabilisation structurale de la protéine. Il n’a pas été possible de caractériser l’effet *a priori* du substrat réduit sur la MsrB à cause de sa faible solubilité

dans l'eau. Il est donc possible que les résultats obtenus soient la conséquence de deux phénomènes : la présence de la fonction sulfénique sur le résidu Cys 117, mais également, l'interaction entre le substrat et la protéine.

En conclusion, la formation de l'intermédiaire sulfénique et sa présence engendre une perturbation importante autour des deux cystéines Cys 63 et Cys 117. Cette perturbation faciliterait la formation du pont disulfure intramoléculaire et ainsi celle de la forme oxydée de la MsrB. Par contre, l'hypothèse d'un début de déstructuration du site actif de la protéine sous sa forme sulfénique n'explique pas la proximité des deux cystéines dans la structure cristallographique. En effet, la distance de 3,25 Å entre les deux atomes de soufre est en accord avec l'hypothèse d'une formation rapide et facile du pont disulfure sans changements structuraux importants.

Une solution à la compréhension de ces différences serait d'étudier plus précisément la distance entre les deux cystéines lorsque la MsrB est sous sa forme réduite puis après la formation de l'intermédiaire sulfénique. Une étude dynamique permettrait également de mieux comprendre l'implication des séquences affectées et situées à une distance importante de Cys 117 sous forme acide sulfénique.

4.3 MsrB oxydée

L'intermédiaire MsrB acide sulfénique qui réagit avec la MetSO a une durée de vie très courte. La cystéine de régénération, Cys 63, attaque, *via* son atome de soufre, le soufre de la fonction sulfoxyde de la Cys 117. La réaction forme un pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines avec le relargage d'une molécule d'eau. Sans la présence de réducteurs chimiques ou biologiques, le pont disulfure de la MsrB de *N. meningitidis* reste stable.

Dans cette partie, je parlerai des nombreuses difficultés rencontrées pour obtenir des spectres de la protéine MsrB oxydée analysable en RMN et je discuterai ensuite des résultats d'attribution obtenus.

4.3.1 Préparation de l'échantillon

4.3.1.1 Oxydation de la MsrB réduite

La MsrB oxydée est préparée par l'équipe enzymologie du MAEM. La MsrB de *N. meningitidis* obtenue sous sa forme réduite est oxydée sous forme de pont disulfure par ajout d'un large excès de MetSO pendant 10 min à 25°C. Une dialyse dans du tampon KPi 10 mM permet d'éliminer les molécules de MetSO excédentaires. L'échantillon est ensuite dégazé sous azote et scellé.

Pour une concentration de MsrB oxydée supérieure à 1 mM, un dépôt blanc se formait à l'intérieur du tube. A forte concentration de MsrB, le pont disulfure intramoléculaire serait probablement rompu en faveur d'un pont disulfure intermoléculaire, induisant la formation d'un dimère.

4.3.1.2 Stabilité de l'échantillon oxydé

Plusieurs spectres HSQC (^1H , ^{15}N) ont été effectués à des concentrations différentes de MsrB oxydée. L'empreinte HSQC de la MsrB ne varie plus pour des concentrations inférieures à 0,5 mM (figure 4.19, page ci-contre). A cette concentration, on n'observe plus de dépôt blanc au fond du tube. Le nombre de corrélations visibles sur le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) à 0,5 mM est, par contre, en dessous du nombre attendu. De nombreux pics sont superposés au centre du spectre ce qui rend l'attribution des pics difficile.

En dessous d'une concentration de 0,5 mM il semblait difficile d'envisager l'attribution séquentielle de la protéine en utilisant un spectromètre 600 MHz sans cryosonde.

La production de MsrB oxydée était difficilement reproductible. Plusieurs échantillons enrichis en ^{15}N ont été préparés à des concentrations semblables mais ils ne présentent

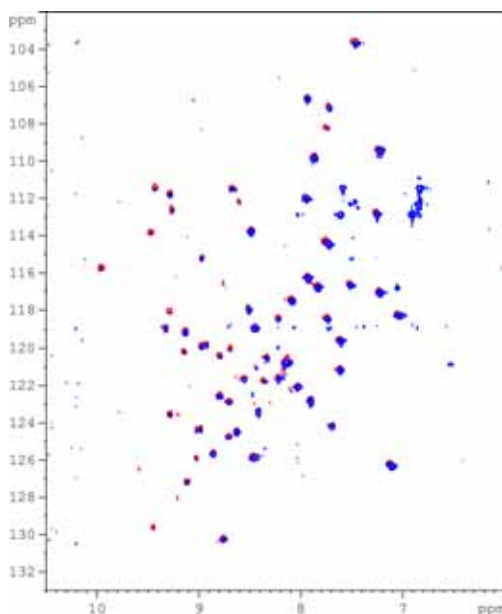


Figure 4.19 – Superposition de deux spectres 2D hétéronucléaires ^1H , ^{15}N à des concentrations différentes de MsrB oxydée. Le spectre HSQC (^1H , ^{15}N) en bleu a été enregistré avec une concentration de MsrB oxydée ^{15}N de 0,2 mM. Le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) a été enregistré avec une concentration de MsrB oxydée ^{15}N de 0,5 mM. Au dessus de 0,5 mM, la majorité des pics se regroupe au niveau du centre du spectre caractérisant une dénaturation de la protéine.

pas la même empreinte au niveau des expériences HSQC (^1H , ^{15}N) (figure 4.20, page suivante). Une différence de la structuration de la MsrB oxydée pourrait être à l'origine de cette différence. La possibilité d'avoir plusieurs états au sein de l'échantillon est également possible et de faibles variations au niveau du protocole de production et de purification semble favoriser un état plutôt qu'un autre.

4.3.2 Échantillon doublement marqué

Un échantillon doublement marqué ^{15}N , ^{13}C de la MsrB oxydée a été préparé pour l'attribution complète des signaux ^1H , ^{13}C et ^{15}N .

4.3.2.1 Attribution des atomes du squelette peptidique

Nous avons réalisé les six expériences décrites dans le tableau 2.1, page 49, pour l'attribution séquentielle des atomes du squelette. Les expériences ont été effectuées à 25°C et à pH 7,1. Nous avons utilisé le même protocole d'enregistrement des spectres que celui établi pour l'attribution de la MsrB réduite (§ 3.3.1, page 92).

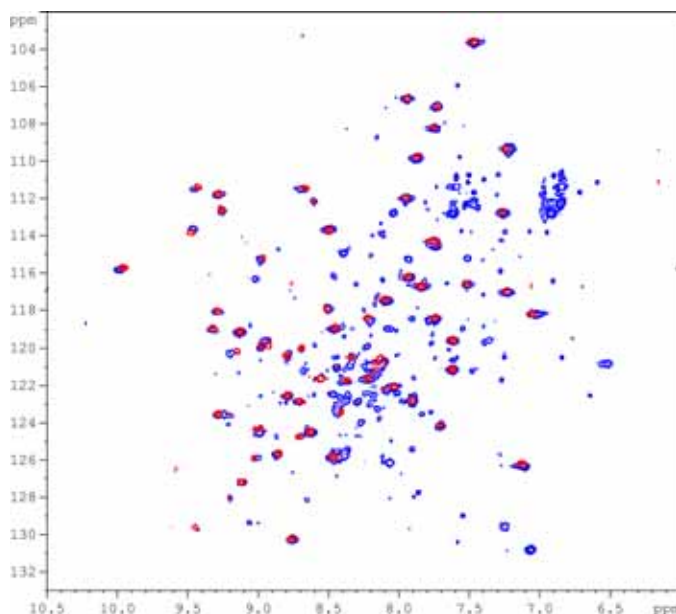


Figure 4.20 – Exemple de spectres 2D hétéronucléaires enregistrés pour deux échantillons de MsrB oxydée à la même concentration. La totalité des pics ne sont pas superposés.

L'expérience TROSY (^1H , ^{15}N) ne permettait pas de retrouver tous les pics attendus pour la MsrB oxydée. L'utilisation de l'expérience HNC0 a permis de situer certaines superpositions.

Au regard de l'expérience TROSY (^1H , ^{15}N), on remarque une dénaturation partielle de la MsrB oxydée. Il était donc difficile d'obtenir une attribution complète de la protéine en raison d'une superposition importante des pics.

Une première série d'expériences m'a permis d'attribuer environ 65% des atomes H^{N} et N. Les résidus non attribués sont disséminés le long de la séquence primaire de la protéine. Il n'y a pas de zones importantes non attribuées.

4.3.2.2 Prédiction des structures secondaires

Avec 65% des atomes H^{N} et N et 80% des atomes C^{α} , C^{β} et CO attribués, nous avons utilisé le logiciel TALOS pour obtenir des informations structurales sur les parties attribuées de la protéine (figure 4.21, page ci-contre). Avec les données complémentaires de l'expérience HNHA nous avons pu affiner la prédiction des structures secondaires pour seulement 20% des résidus.

La prédiction des structures secondaires pour la MsrB oxydée ne correspondait pas à ce que l'on attendait. Le cœur de la protéine, composé des feuillets β , ne semble pas structurer à l'inverse des structures secondaires situées à l'extérieur de la protéine. Ces

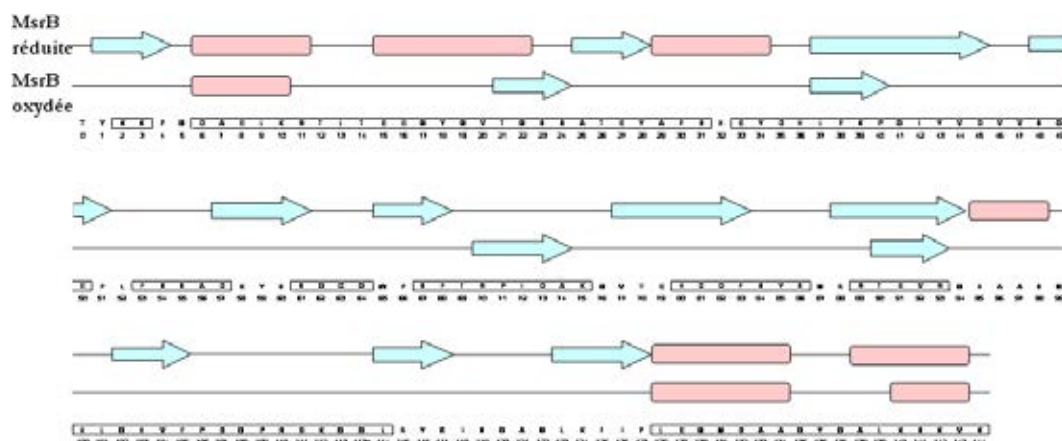


Figure 4.21 – Comparaison des prédictions des structures secondaires obtenues par le logiciel TALOS entre les *MsrB* réduite et oxydée de *N. meningitidis*. Les résidus encadrés sont ceux dont les valeurs des déplacements chimiques des atomes du squelette ont été pris en compte pour le calcul.

résultats indiqueraient une déstructuration complète des feuillets β de la protéine lors de la formation du pont disulfure.

4.3.3 Échantillon triplement marqué

4.3.3.1 Introduction

Au vu des résultats obtenus sur la *MsrB* oxydée doublement marquée et de la qualité des spectres, nous avons entrepris la production d'un échantillon triplement marqué ^{15}N , ^{13}C et ^2H pour tenter de diminuer l'élargissement des pics et compléter ainsi l'attribution du squelette de la protéine. La production et la purification de l'échantillon triplement marqué ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles de la *MsrB* oxydée doublement marquée en remplaçant l'eau des solutions de préparation par de l'eau lourde (D_2O) pour éliminer toute présence d'hydrogène dans la protéine. L'échantillon obtenu est lyophilisé puis redissout dans H_2O trois fois de suite pour échanger tous les atomes de deutérium labiles. La *MsrB* oxydée triplement marquée a été produite à une concentration de 0,5 mM.

Une première expérience TROSY (^1H , ^{15}N) a été effectuée à Nancy sur le 600 MHz. La carte 2D ne présente pas la même empreinte que celle de la *MsrB* oxydée doublement marquée et cette empreinte indiquerait une meilleure structuration pour l'échantillon triplement marqué (figure 4.22, page suivante). Nous avons donc décidé de procéder à une réattribution complète de la *MsrB* oxydée.

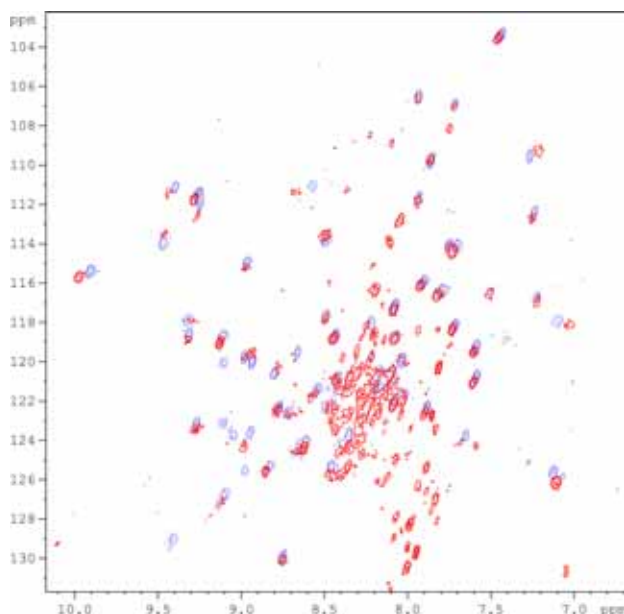


Figure 4.22 – Comparaison des spectres TROSY (^1H , ^{15}N) obtenus avec un échantillon de MsrB oxydée doublement marquée (^{15}N , ^{13}C) en rouge et triplement marquée (^{15}N , ^{13}C , ^2H) en bleu.

4.3.3.2 Attribution des atomes du squelette peptidique

L'équipement à Nancy ne nous permettait pas d'irradier le deutérium au cours des expériences RMN 3D de triple résonance. Nous avons demandé un accès au spectromètre de RMN à 800 MHz du Laboratoire de RMN de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif sur Yvette pour effectuer ces expériences. Pour des raisons de temps à l'accès, nous avons seulement effectué les expériences HNCO, HNCACO et HNCACB. L'expérience CBCANH n'est pas possible car le transfert d'aimantation se fait à partir des protons H^β qui ne sont pas présent dans le cas d'une protéine deutériée. L'expérience HNCACB permet d'obtenir les mêmes résultats que l'expérience CBCANH mais avec une sensibilité nettement plus faible.

L'éclatement du spectre et l'utilisation d'un spectromètre à plus haut champ a permis de retrouver plus facilement les corrélations $\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ présent sur le spectre HSQC (^1H , ^{15}N). Par contre l'utilisation de l'expérience HNCACB sans l'expérience complémentaire HN(CO)CACB a rendu plus difficile l'attribution séquentielle. Seules 53% des corrélations $\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ pour la MsrB oxydée triplement marquée ont pu être attribuées de cette manière.

En reportant les résidus attribués sur la structure 3D de *N. gonorrhoeae* (figure 4.23, page ci-contre), on remarque que les résidus proches des deux cystéines ne sont pas du tout attribués.

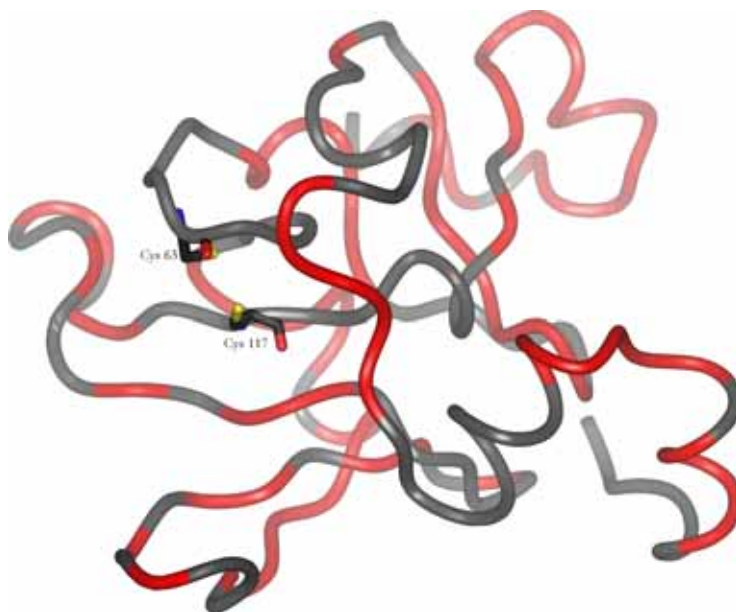


Figure 4.23 – Localisation des résidus attribués pour la MsrB oxydée triplement marquée sur la structure RX de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les résidus dont les atomes H^N et ^{15}N sont attribués, sont colorés en rouge sur le squelette de la structure 3D de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Les chaînes latérales des deux cystéines sont également représentées.

La comparaison des déplacements chimiques des atomes H^N et ^{15}N des MsrB réduite et oxydée peut nous donner une indication sur les perturbations de l'environnement chimique dû à la formation du pont disulfure intramoléculaire. D'après la figure 4.24, page suivante, on remarque que les zones peu perturbées par la formation du pont disulfure intramoléculaire sont les feuillets $\beta 1$, $\beta 2$, la boucle $\beta 4$ – $\beta 5$ et les deux hélices C-terminales $\alpha 3$ et 3_{10} -5. Au vu de la structure cristallographique de *N. gonorrhoeae*, ces zones sont loin des deux cystéines formant le pont disulfure.

La partie N-terminale semble être très perturbée par la formation du pont disulfure ainsi qu'une partie des brins $\beta 6$ et $\beta 7$.

4.3.3.3 Prédiction des structures secondaires

A partir des résultats précédents, nous avons essayé de prédire les structures secondaires à partir de l'index des déplacements chimiques et du logiciel TALOS pour les résidus attribués. Au vu des spectres analysés, on peut penser à une modification non négligeable de la structuration de la MsrB oxydée par rapport à la MsrB réduite. Les structures secondaires prédites sont reportées sur la figure 4.25, page 141.

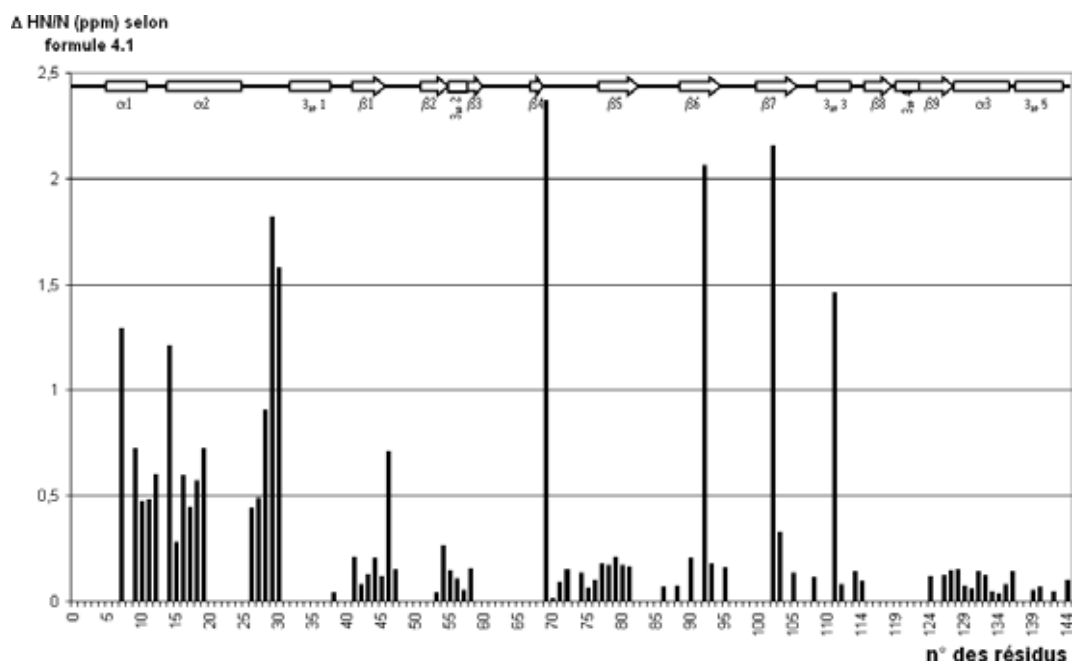


Figure 4.24 – Histogramme montrant la différence des déplacements chimiques des atomes H^N et ^{15}N selon la formule (4.1) entre la MsrB réduite et oxydée. Les structures secondaires issues de l'étude par RX de la MsrB de *N. gonorrhoeae* sont représentées en haut de la figure.

La comparaison des structures secondaires prédites pour la MsrB oxydée avec celles prédites pour la MsrB réduite confirme une perturbation au niveau de la partie N-terminale. Malgré l'attribution de la séquence D₆–Q₂₂, il n'a pas été possible de prédire les deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Il n'en est pas de même pour les brins $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ qui eux ne sont pas prédits à cause du manque d'attribution. Si on ne tient pas compte de la partie N-terminale, il semble que la MsrB oxydée adopte et conserve en partie les structures secondaires observées pour la MsrB réduite.

Par compte en comparant les valeurs des déplacements chimiques sur le spectre HSQC (1H , ^{15}N) des atomes H^N et N, il semble que la structure 3D ne soit pas conservée dans son ensemble.

Les pics non attribués sont situés dans la zone centrale du spectre HSQC (1H , ^{15}N) et les résidus correspondants peuvent alors être considérés comme faisant partie d'une zone déstructurée.

Afin de mieux situer les zones qui conservent une structuration tridimensionnelle, nous avons effectué des gradients de température pour les formes oxydées et réduites de la MsrB. La méthode consiste à enregistrer plusieurs spectres en faisant varier graduellement la température. Dans la plupart des cas, la valeur du déplacement chimique diminue lorsqu'on augmente la température. Par contre, si un proton est impliqué dans une liaison

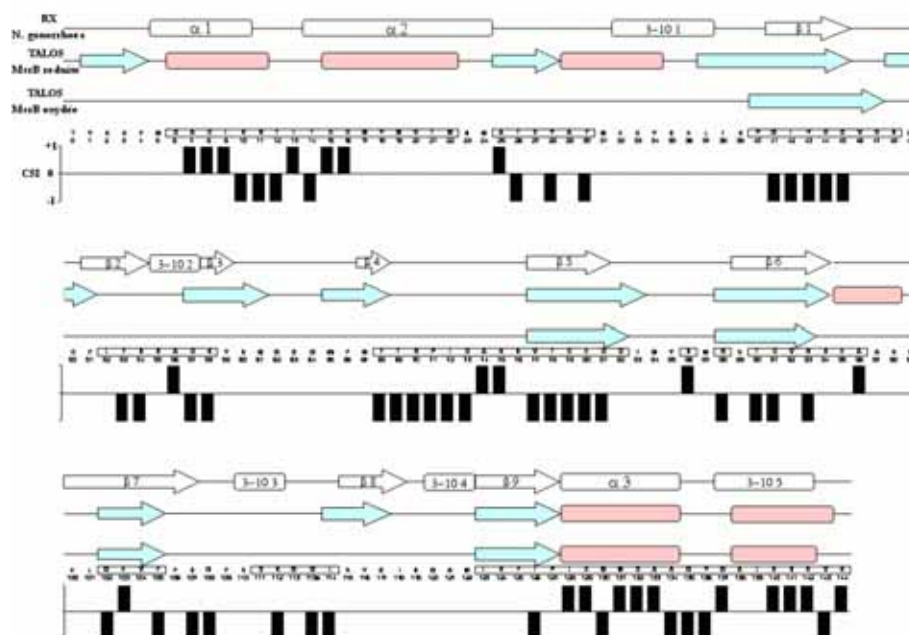


Figure 4.25 – Représentation des structures secondaires prédites par CSI et le logiciel TALOS pour la MsrB oxydée de *N. meningitidis* comparées avec celles obtenues par cristallographie RX sur la MsrB de *N. gonorrhoeae* et prédites par le logiciel TALOS pour la MsrB réduite de *N. meningitidis*. Les structures secondaires à partir des données cristallographiques et des prédictions du logiciel TALOS sont représentées en rectangle arrondi pour les hélices et en flèche pour les feuillets. Dans le cas des données obtenues à partir de TALOS, les feuillets sont en bleu et les hélices en rouge. Au moins quatre couples de valeurs d'angles ϕ/ψ doivent aller dans le même sens pour prédire une structure secondaire. Le CSI pour chaque résidu est représenté sous forme d'histogramme. Les valeurs positives et négatives indiquent respectivement la présence possible d'hélices ou de feuillets. Les valeurs supérieures à 1, en absolu, sont tronquées. Si tous les déplacements chimiques ne sont pas disponibles, le CSI n'est pas calculé (zone blanche).

hydrogène intramoléculaire, l'influence de la température sur la valeur de son déplacement chimique sera moindre jusqu'à la rupture de la liaison. Par cette méthode et en effectuant des expériences de type HSQC (^1H , ^{15}N), il est possible d'identifier les atomes H^{N} impliqués dans une liaison hydrogène. En comparant les résultats obtenus pour les formes réduite et oxydée de la MsrB, on espérait identifier plus facilement les zones de déstructuration de la MsrB lors de la formation du pont disulfure intramoléculaire. Pour chaque forme de la protéine, six expériences ont été effectuées pour des températures allant de 7°C à 32°C (figure 4.26, page suivante). La mesure de la température a été calibrée avec les tubes tests, méthanol à 4% pour des températures inférieures à 20°C et l'éthylène glycol à 80%

pour les hautes températures et en utilisant respectivement les formules suivantes :

$$T = (4,109 - \Delta)/0.008708 \text{ pour le méthanol} \quad (4.2)$$

$$T = (4,218 - \Delta)/0.009132 \text{ pour l'éthylène glycol} \quad (4.3)$$

Avec T, la température en degrés Kelvin.

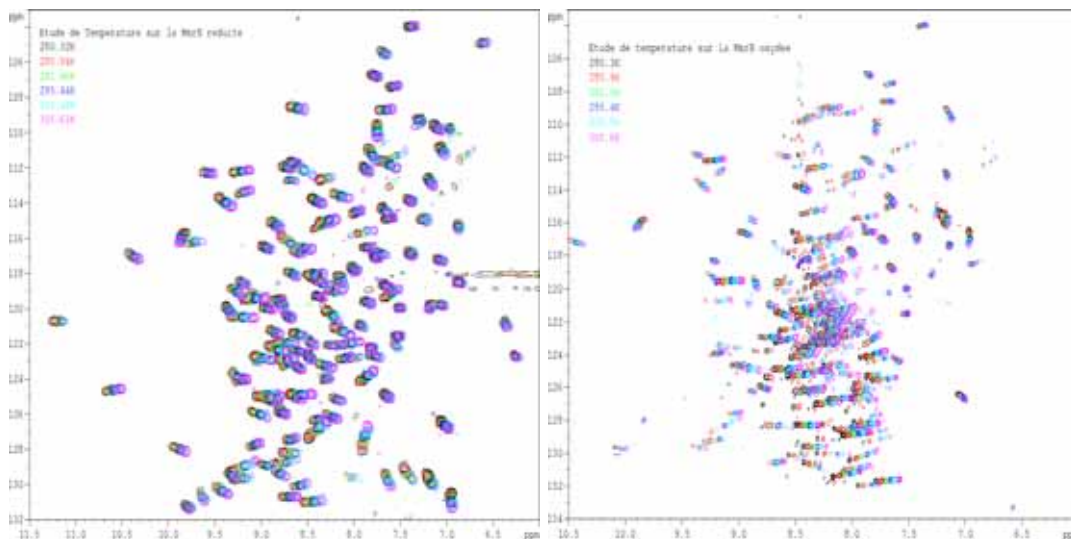


Figure 4.26 – Superpositions de spectres TROSY (^1H , ^{15}N) effectués à différentes températures pour les MsrB réduite (gauche) et oxydée (droite).

Les variations des déplacements chimiques en fonction de la température sont plus importants, dans la plupart des cas, pour la forme oxydée. On peut donc en déduire que la MsrB réduite contient plus de liaisons hydrogène intramoléculaires ou que les protons amidiques correspondants sont moins exposés au milieu aqueux. Pour un proton donné, en calculant la pente de la droite représentant le déplacement chimique du proton en fonction de la température, on peut en déduire si ce proton est impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Si la pente est comprise entre 0 et -5, la variation du déplacement chimique en fonction de la température est faible, le proton en question se trouve dans une liaison hydrogène. Par contre une valeur de la pente supérieure à 5 en valeur absolue correspondrait à un proton exposé au solvant aqueux.

En appliquant cette méthode pour les protons amides attribués dans les deux formes de la MsrB, on remarque un plus grand nombre de liaisons hydrogène dans le cas de la MsrB réduite, 79 et 32 respectivement. Les atomes H^{N} conservant une liaison hydrogène se situent principalement dans la zone opposée à celle comprenant les deux cystéines.

La création du pont disulfure entraînerait donc une désorganisation de la structure de la *MsrB* dans la partie proche des deux cystéines.

4.3.4 Discussion

La *MsrB* oxydée est caractérisée par la présence d'un pont disulfure entre les cystéines 63 et 117. On obtient cette forme de la protéine en faisant réagir la *MsrB* réduite avec son substrat : la Met-*R*-SO. La *MsrB* oxydée peut ensuite être réduite par intervention d'une thiorédoxine ou par le DTT, un agent réducteur. La conservation d'un milieu non réducteur au sein de l'échantillon permet de préserver ce pont disulfure.

La spectroscopie RMN est une technique peu sensible et il faut donc de grandes quantités de protéine pour effectuer une étude structurale par RMN. A des concentrations supérieures à 0,5 mM, on observe un dépôt blanc au fond du tube RMN. La formation de ce dépôt est sûrement due à une dimérisation de la protéine *via* la formation de pont disulfure intermoléculaire.

A une concentration de 0,5 mM, l'empreinte HSQC de la *MsrB* correspond à celle d'une protéine partiellement structurée. L'éclatement de certains pics de corrélation sur les spectres HSQC (^1H , ^{15}N) ou TROSY (^1H , ^{15}N) montre une certaine structuration de la protéine mais on ne peut pas négliger la présence d'un grand nombre de pics de corrélation présents au centre des spectres 2D RMN qui indiquent une déstructuration partielle de la *MsrB*. Les déplacements chimiques de ces pics sont très proches et l'attribution séquentielle n'a pas pu être complète.

En plus d'une déstructuration partielle de la protéine, l'empreinte HSQC de la *MsrB* oxydée est différente en fonction de la production de cette dernière. Nous avons été obligés de reprendre complètement l'attribution séquentielle de la *MsrB* oxydée avec l'échantillon triplement marqué (^2H , ^{15}N , ^{13}C) car le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) était différent de celui correspondant à l'échantillon de *MsrB* oxydée doublement marquée (^{15}N , ^{13}C). Le spectre RMN 2D de la protéine triplement marquée semblait correspondre à une protéine mieux structurée que celui de la *MsrB* oxydée doublement marquée.

La prédiction des structures secondaires de la *MsrB* oxydée doublement marquée à partir de l'attribution de 80% des carbones C^α , C^β et CO indique que le cœur composé de feuillets β de la protéine est déstructuré. Seules les deux hélices α_3 et 3_{10} -3 de la partie C-terminale de la protéine semble conserver leur structure. En ce qui concerne la *MsrB* triplement oxydée, un nombre plus important de feuillets β semble être conservé dans la structure. De plus, il faut noter que la prédiction des autres feuillets n'est pas possible à cause du manque d'attribution dans les zones concernées. La partie C-terminale est mieux

structurée que la partie N-terminale. Le cœur de la MsrB est composé de deux groupes de feuillets : $\beta 9/\beta 1/\beta 2$ et $\beta 4/\beta 8/\beta 7$. Aucun des deux groupes n'est conservé d'après les prédictions des structures secondaires réalisées à partir des déplacements chimiques obtenus pour la MsrB oxydée triplement marquée.

Au niveau du spectre HSQC, tous les pics de corrélation qui apparaissent éclatés sont attribués. Les pics non attribués correspondent donc principalement à des résidus situés dans des zones non structurées. A partir de cette constatation, nous pouvons en conclure que la formation du pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines 63 et 117 entraîne une déstabilisation de la MsrB. L'échantillon observé peut également être celui de la protéine dimérisée. L'hypothèse n'a pas pu être complètement vérifiée. Les expériences RMN ne montrent pas de dédoublement des pics qui seraient la conséquence de la présence de deux états de la MsrB oxydée et les gels d'électrophorèse lors des vérifications du bon déroulement de la purification indique une protéine sous forme monomère. Une autre hypothèse serait la présence d'un équilibre entre la MsrB réduite et oxydée. Cette hypothèse semble peu probable car le spectre proton 1D de l'échantillon indique la présence de substrat non oxydé.

Les mesures de gradient de température entre les formes réduite et oxydée de la MsrB montrent une diminution du nombre de liaisons hydrogène pour la forme oxydée. La disparition de ces liaisons hydrogène dans la forme oxydée pourrait être la conséquence d'une désolidarisation des brins β lors de la formation du pont disulfure.

L'hypothèse d'une déstructuration de la protéine lors de la formation du pont disulfure n'est pas en accord avec les résultats sur la MsrB de *N. gonorrhoeae* obtenus par diffraction des RX. La distance des deux atomes de soufre dans la structure cristallographique est seulement de 3,25 Å est en faveur d'une formation rapide et sans changements structuraux importants d'un pont disulfure. Par contre le profil d'élution de la figure 4.27, page ci-contre, montre une différence entre les formes oxydée et réduite de la MsrB. La forme oxydée est éluée avant la forme réduite. La colonne de gel filtration sépare les protéines suivant leur taille : les petites protéines sont retenues plus facilement et sortent donc en dernières. Dans le cas de la protéine MsrB, les deux formes ont le même poids moléculaire et seule la structure globale de la protéine peut influencer le temps de migration. A partir de ce profil d'élution, on peut conclure que la forme réduite est plus compacte que la forme oxydée. La MsrB réduite, compacte, correspondrait à une protéine structurée alors que la MsrB oxydée aurait une structure moins compacte à cause de la déstructuration d'une partie de ces feuillets β qui engendrerait un nombre plus important de boucles flexibles au niveau de la MsrB oxydée.

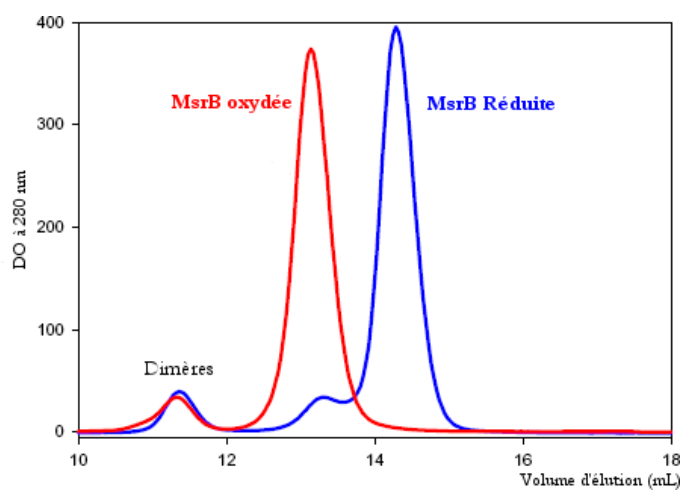


Figure 4.27 – Profils des deux éluations sur colonne de gel filtration analytique SUPERDEX 75 de la MsrB de *N. meningitidis* sous forme réduite (bleu) et oxydée (rouge). Les chromatographies ont été réalisées à température ambiante dans le tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Le débit a été fixé à 0,4 mL/min. Dans tous les cas, un pic mineur correspondant à la formation de dimères est observé.

4.4 Interaction de la MsrB oxydée avec la thiorédoxine

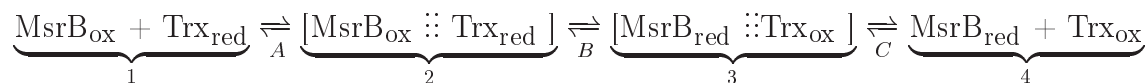
Malgré une attribution non complète des atomes H^N, N, CO, C^α et C^β de la MsrB oxydée, nous avons entrepris des études de son interaction avec la Trx. Un des problèmes auquel nous devons faire face est l'absence d'attribution au voisinage du pont disulfure.

Dans cette partie, nous discuterons du rôle de la Trx pour les Msr et des options choisies pour l'étude de l'interaction. Ensuite je présenterai les résultats obtenus par les différentes méthodes utilisées.

4.4.1 Rôle de la thiorédoxine vis-à-vis des Msr

4.4.1.1 Acquis biochimiques

La Trx est une protéine ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus biologiques. Son rôle principal est la réduction des ponts disulfures présents dans de nombreuses protéines. Au niveau des Msr, il n'existe pas, à ce jour, d'informations permettant d'établir la structure tridimensionnelle du complexe MsrB/Trx. Des données enzymatiques, sur la réduction du pont disulfure intra-moléculaire de la MsrB par la Trx, montrent que cette étape est irréversible. Ce serait même, dans le processus réactionnel supposé, l'étape de dissociation du complexe (C) qui serait l'étape cinétiquement limitante [4.9].



Les auteurs pensent que la réduction du pont disulfure serait accompagnée d'un changement conformationnel du complexe MsrB réduite-Trx oxydée (3). Dans ce cas, un changement conformationnel semblable doit se produire avant la dissociation, soit au niveau du complexe MsrB oxydée-Trx réduite, soit au niveau de la MsrB oxydée (2).

Les résultats préliminaires de RMN sur la MsrB oxydée sont en faveur de l'hypothèse d'un réarrangement conformationnel au niveau de la formation du pont disulfure intramoléculaire de la MsrB.

4.4.1.2 Choix des méthodes pour l'étude du complexe

Pour étudier les interactions possibles entre les deux partenaires, deux solutions étaient envisageables.

La première option consistait à créer une liaison covalente, *via* par exemple un pont disulfure, entre les deux partenaires MsrB oxydée et Trx. L'avantage de cette méthode

était d'avoir une population stable d'un complexe et de s'affranchir d'une titration. Le principal désavantage était de caractériser ce complexe : par exemple, savoir quelles étaient les cystéines qui participent au pont disulfure intermoléculaire sciemment fermé. Au niveau de la Trx, il est admis que la cystéine catalytique est Cys 32 alors que la Cys 35 est celle permettant de former le pont disulfure intramoléculaire au sein de la Trx. Par contre, pour connaître la cystéine de MsrB attaquée par la Cys 32 de Trx, l'équipe du Pr. G. Branlant du MAEM a résolu le problème en mettant au point une méthode faisant appel à la spectrométrie de masse. Ils ont ainsi pu déterminer que Cys 117 de MsrB était attaquée par Cys 32 de Trx [4.10, communication personnelle]. Les mutants C63S pour MsrB et C35S pour Trx ont été utilisés, dans ce cas, pour synthétiser chimiquement le pont disulfure intermoléculaire MsrBCys117-TrxCys32 (figure 4.28 A).

La deuxième option visait à établir un complexe non covalent entre les deux partenaires. Il était possible, dans ce cas, d'étudier le complexe avec des rapports variables de concentration Trx/MsrB et ainsi de déterminer une constante de dissociation. Cette option nécessite une quantité importante de produit car les constantes d'affinité apparentes sont de l'ordre du millimolaire [4.9]. De plus, dans ce cas, l'utilisation d'une Trx mutée était nécessaire afin de ne pas initier l'étape finale du mécanisme putatif conduisant à la réduction de la MsrB. Le mutant C32A de Trx a été utilisé afin d'empêcher l'attaque de la Trx réduite sur la MsrB oxydée (figure 4.28 B).

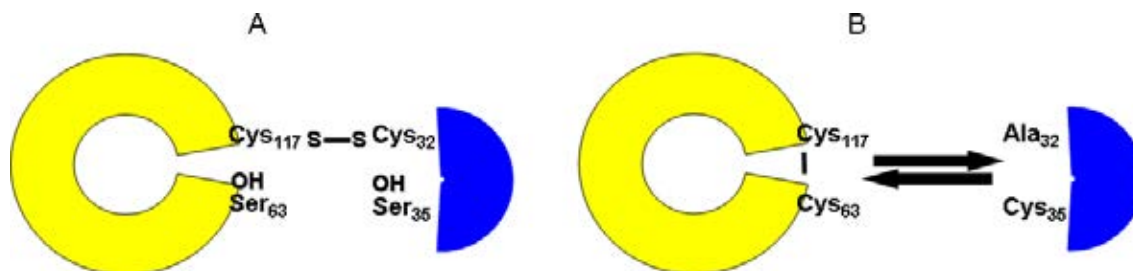


Figure 4.28 – Choix des méthodes pour analyser le complexe MsrB/Trx. (A) Il y a formation d'un complexe covalent entre MsrB et Trx chimiquement insensible à toute évolution par suite de l'utilisation d'un mutant C63S au niveau de MsrB. (B) Formation d'un complexe non covalent entre MsrB oxydée et le mutant C32A de Trx.

L'étude d'un complexe en RMN est rendu difficile du fait de la grande masse totale de ce dernier. La MsrB a une masse de 16,4 kDa, celle est de la Trx de 11,7 kDa soit une masse totale de 28,1 kDa qui entraînerait un élargissement des signaux voire la disparition de certains. Pour s'affranchir de ces inconvénients, nous avons utilisé l'expérience TROSY afin d'affiner les signaux et de bien les caractériser. La MsrB est celle de *N. meningitidis* alors que la Trx provient d'*E. coli*. Il a été montré que l'utilisation de la Trx d'*E. coli*

n'engendrait pas de changement au niveau de l'activité enzymatique pour les deux partenaires. De plus, l'attribution des pics de résonance et la structure RMN de la Trx chez *E. coli* sont connues, ce qui n'est pas le cas pour la Trx de *N. meningitidis*.

4.4.2 Résultats

Dans les deux options précédemment décrites, seule la MsrB de *N. meningitidis* a été enrichie en ^{15}N . Les spectres HSQC (^1H , ^{15}N) ou TROSY (^1H , ^{15}N) ne présenteront que les empreintes des signaux $\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ de la MsrB bien que la Trx est présente dans le milieu.

4.4.2.1 Validation du complexe covalent

L'aspect du spectre TROSY (^1H , ^{15}N) du complexe covalent nous indique une dénaturation de la MsrB C63S liée covalentement à la Trx C65S. La faible largeur spectrale protonique (1 ppm), comparée à celle du mutant non lié (4 ppm), est caractéristique d'un environnement chimique identique pour la plupart des résidus (figure 4.29). Cet environnement chimique homogène se produit lorsque la protéine se dénature et la plupart des atomes se retrouvent alors tous en contact avec le solvant.

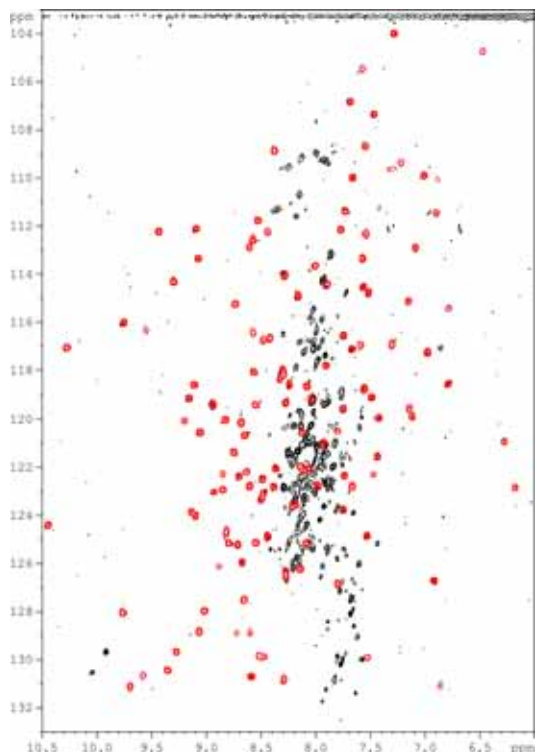


Figure 4.29 – Spectres TROSY (^1H , ^{15}N) du mutant C63S (rouge) et du complexe covalent MsrB C63S-C35S Trx (noir).

A partir de cet exemple et dans ces conditions, il semble difficile d'envisager l'attribution des résonances des atomes du squelette peptidique de la composante MsrB du complexe.

4.4.2.2 Validation du complexe non covalent

Le complexe non covalent a nécessité l'utilisation du mutant C32A de Trx. Afin de vérifier que la mutation n'entraîne pas une perte de la reconnaissance des deux partenaires, nous avons réalisé un spectre TROSY (^1H , ^{15}N) de la MsrB oxydée seule à 0,5 mM et un spectre avec la même quantité de MsrB oxydée en présence de 2 mM de Trx C32A. Les spectres des deux formes libre et complexée de la MsrB oxydée sont superposables (figure 4.30, page suivante). Une très grande majorité des pics de résonance ne voient par leurs fréquences modifiées par l'ajout de la Trx. On n'observe pas d'apparition de nouveau pic. Par contre, comparé au spectre de la forme libre, il semble y avoir une diminution importante de l'intensité des raies de résonance de la forme complexée due à une augmentation de la largeur des raies de résonance. Celle-ci provient probablement soit de l'augmentation de la vitesse de relaxation transversale T_2 qui reste dépendante de la taille du complexe malgré l'utilisation de la séquence TROSY soit d'un échange intermédiaire entre les deux partenaires. Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi le complexe non covalent pour les études d'interaction entre la MsrB et la Trx.

4.4.2.3 Phénomène d'échange lent

Nous avons préparé 10 tubes avec une concentration fixe en MsrB dans lesquels nous avons ajouté de la Trx à des concentrations différentes allant de 0 à 2 mM (tableau 4.3). Nous avons réalisé plusieurs spectres HSQC (^1H , ^{15}N) à partir de ces 10 mélanges.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[Trx]	0	0,05	0,1	0,175	0,25	0,35	0,5	0,75	1,25	2
[Trx]/[MsrB]	0	0,1	0,2	0,35	0,5	0,7	1	1,5	2,5	4

Tableau 4.3 – Concentration (mM) de Trx pour chaque tube et rapport molaire Trx/MsrB. La concentration en MsrB est fixe et égale à 0,5 mM.

En analysant les spectres, on remarque une diminution de l'intensité des pics de résonance de MsrB en fonction de l'augmentation de la concentration en Trx (figure 4.31, page 151).

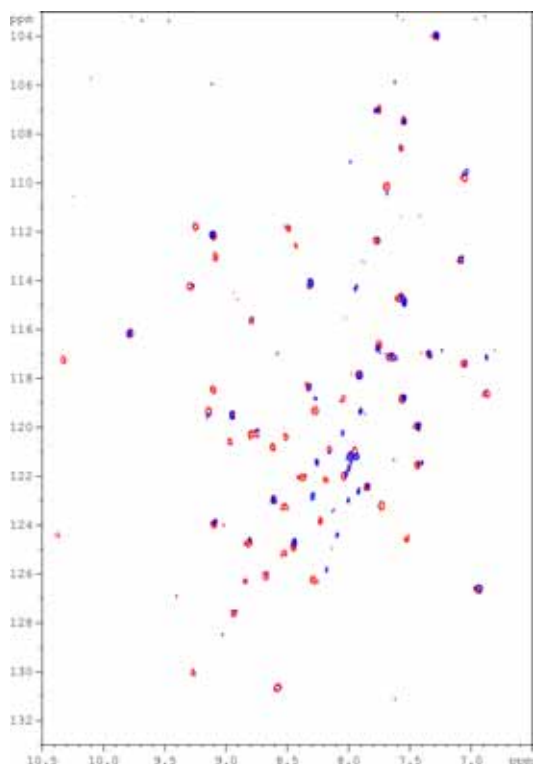


Figure 4.30 – Spectres TROSY (^1H , ^{15}N) de la MsrB oxydée libre (rouge) et du complexe MsrB/TrxC32A (bleu).

Ceci est caractéristique d'un échange chimique lent en relation directe avec une dissociation lente du complexe. La dissociation de ce complexe n'existe pas *in vivo*, puisque la reconnaissance entre MsrB oxydée et Trx réduite s'accompagne d'un échange de ponts disulfures suivi d'une dissociation entre la MsrB réduite et la Trx oxydée. Par contre, une dissociation lente de ce complexe est en accord avec une reconnaissance spécifique des deux partenaires avant la réaction chimique conduisant à l'échange des deux ponts disulfures.

En RMN, lors d'un échange lent, on visualise en général les deux formes de la protéine (libre et complexée). Dans le cas du complexe MsrB oxydée/Trx C32A, sa taille est trop importante pour que les pics de résonance correspondant à la MsrB complexée soient observés car ils sont trop élargis sur le spectre HSQC (^1H , ^{15}N).

4.4.2.4 Constante de dissociation

L'intensité des pics de résonance peut être reliée à la valeur du K_D à partir de la formule (2.12) en prenant en compte la concentration des deux partenaires.

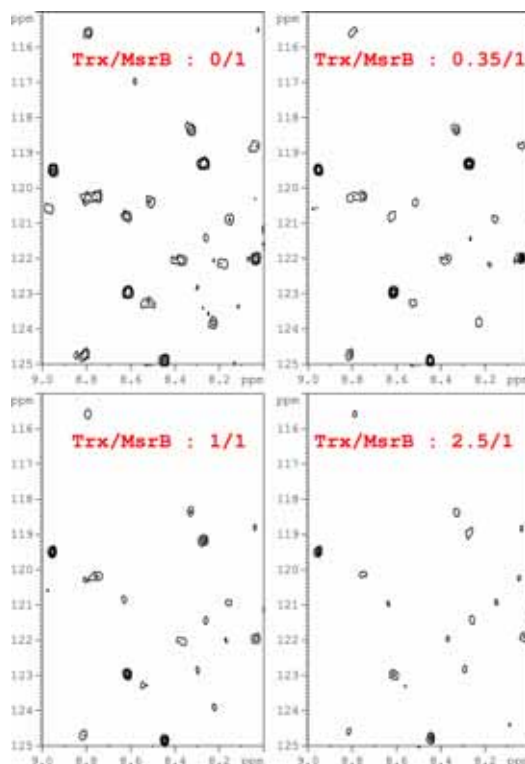


Figure 4.31 – Extrait de spectres HSQC (^1H , ^{15}N) de la MsrB oxydée ^{15}N pour des concentrations différentes en Trx non enrichie. Plus la concentration de Trx est importante, plus l'intensité des pics diminue. Ce phénomène est caractéristique d'un échange lent entre les deux partenaires.

L'attribution partielle des spectres de la MsrB oxydée nous a permis d'identifier 66 pics sur les 138 possibles. Sur la base de ces 66 pics, nous avons estimé une valeur moyenne de K_D , pour l'interaction MsrB oxydée/Trx C32A égale à $330 \pm 100 \mu\text{M}$ (figure 4.32, page suivante).

4.4.3 Discussion

L'interaction entre la MsrB et la Trx est la dernière étape conduisant au recyclage de la MsrB. C'est une étape nécessaire pour la cellule afin de se protéger efficacement contre l'oxydation des Met. Du point de vue cinétique, l'étape limitante est celle qui concerne la dissociation du complexe MsrB réduite/Trx oxydée. La faible vitesse observée s'expliquerait par un réarrangement conformationnel d'au moins une des deux protéines au moment de la dissociation. S'il y a un changement conformationnel lors de la dissociation, il est fort probable qu'une modification structurale ait eu lieu avant la dissociation.

Le complexe covalent MsrB C63S-C35S Trx peut être considéré comme une des étapes de l'interaction MsrB/Trx. Le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) de la MsrB correspond à ce-

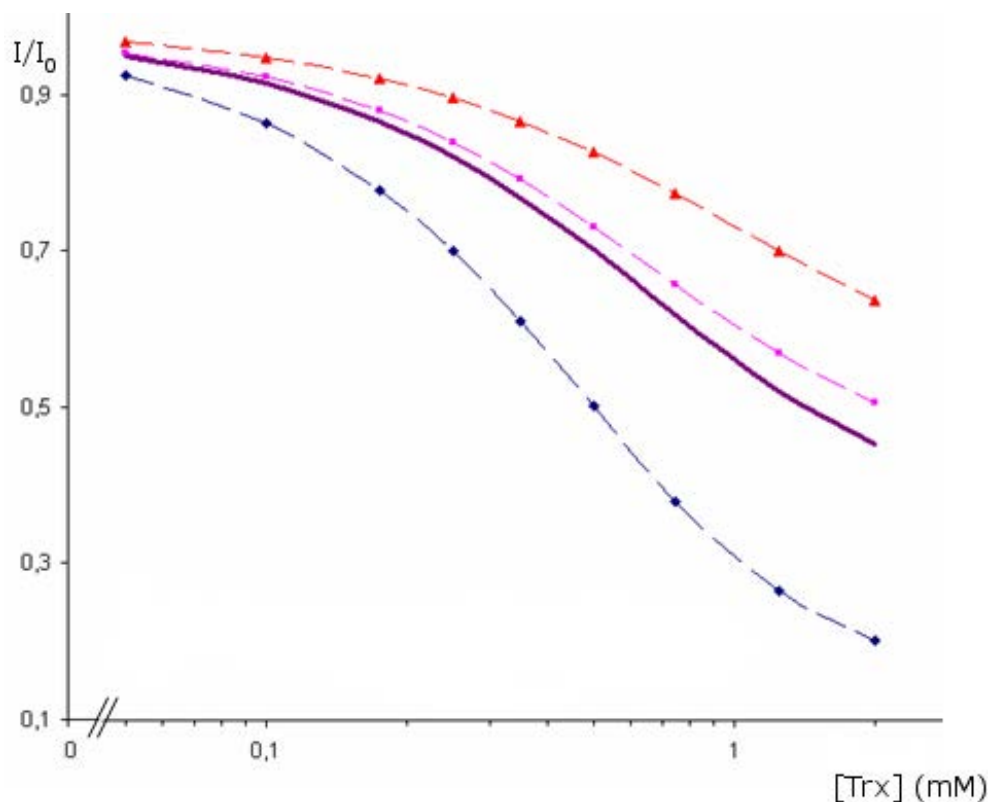


Figure 4.32 – Représentation de l'intensité des pics de trois résidus (rouge, violet et bleu) de la MsrB en fonction de la concentration en Trx. Les points représentent les données expérimentales et les traits en pointillé, les courbes théoriques prenant en compte le K_D calculé pour chaque résidu. En trait gras violet, la courbe théorique prenant en compte la valeur moyenne de K_D obtenue pour l'ensemble de la protéine. Les courbes rouge et bleu représentent les valeurs extrêmes de K_D obtenues pour la MsrB.

lui d'une protéine dénaturée. Plusieurs hypothèses sont envisageables. La première serait une formation inadéquate du complexe covalent qui entraînerait une dénaturation de la protéine MsrB. La production du complexe n'a pas été reconduite car la purification de ce complexe est compliquée et les rendements obtenus lors du premier essai étaient très faibles. De plus, l'ajout de DTT au niveau de ce complexe a permis la réduction du pont disulfure intermoléculaire. Le spectre TROSY (1H , ^{15}N) de l'échantillon est identique à celui du mutant MsrB C63S sous sa forme structurée initiale. La dénaturation du complexe, serait donc réversible et la forme dénaturée observée serait une conséquence de la liaison covalente entre les deux protéines. Dans ce cas, il n'est pas interdit de penser que c'est l'interaction entre la MsrB et la Trx et notamment la formation du pont disulfure intermoléculaire qui entraînerait la déstructuration de la MsrB. Celle-ci serait déjà présente au niveau de la formation du pont disulfure intramoléculaire au niveau de la MsrB

oxydée. Cette déstructuration partielle dans la zone du site actif de la MsrB qui découle de la formation du pont disulfure intramoléculaire C117-C63 permettrait la création d'un arrangement spatial favorable à l'échange des ponts disulfure avec la Trx.

L'étude du complexe non covalent MsrB oxydée/Trx C32A nous indique une reconnaissance spécifique des deux partenaires. La valeur du K_D est de l'ordre du mM ce qui implique une reconnaissance spécifique moyenne. Pour cette valeur, il faut tenir compte de la mutation de la cystéine catalytique de la Trx (C32A) qui peut influencer sur l'affinité entre les deux protéines. L'ajout de DTT au niveau de ce complexe permet de réduire la MsrB oxydée. L'échantillon contient alors un mélange de MsrB réduite et de Trx C32A. Le spectre TROSY (^1H , ^{15}N) de ce mélange correspond à celui de la MsrB réduite avec aucune diminution significative de l'intensité des pics. Cette manipulation additionnelle constitue une preuve qui permet d'écarter l'hypothèse d'une interaction non spécifique entre la MsrB réduite et la Trx.

La caractérisation des résidus impliqués dans l'interaction n'a pas été possible à cause du phénomène d'échange lent entre les deux partenaires. De nouvelles méthodes de dynamique sont actuellement développées qui font notamment appel à des mesures de relaxation T_2 . Cependant, elles concernent principalement l'influence de grosses protéines sur des protéines plus petites [4.12, 4.13]. Dans notre cas ce ne sont pas des méthodes applicables car les tailles de nos protéines sont du même ordre de grandeur, 16,4 kDa et 11,7 kDa pour la MsrB et la Trx respectivement.

Bibliographie

- [1] B. Meyer and T. Peters. Nmr spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 42 :864–90, 2003.
- [2] L. M. Rooney, Sachchidanand, and J. M. Werner. Characterizing domain interfaces by nmr. *Methods Mol Biol*, 278 :123–38, 2004.
- [3] W. T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, and B. W. Matthews. The mirrored methionine sulfoxide reductases of neisseria gonorrhoeae pilb. *Nat Struct Biol*, 9 :348–52, 2002.
- [4] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselear, and G. Branlant. Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of pilb, a probable virulence factor from neisseria meningitidis. *J Biol Chem*, 277 :12016–22, 2002.
- [5] E. M. Phizicky and S. Fields. Protein-protein interactions : methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59 :94–123, 1995.
- [6] A. M. Brown. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a microsoft excel spreadsheet. *Comput Methods Programs Biomed*, 65 :191–200, 2001.
- [7] J. L. Markley. Observation of histidine residues in proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 8 :70–80, 1975.
- [8] W.H. Press, S.A. Teukolsky, Vetterling W.T., and B.P. Flannery. *Numerical Recipes in C : The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 1992.
- [9] A. Olry, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase b from neisseria meningitidis. *Biochemistry*, 43 :11616–22, 2004.
- [10] A. Olry. *Mécanisme et spécificité structurale des Méthionine sulfoxyde réductases (Msr) de Neisseria meningitidis et rôle du métal dans les MsrB*. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy, 2005.
- [11] M. Antoine, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase a from neisseria meningitidis. *J Biol Chem*, 278 :45352–7, 2003.
- [12] H. Matsuo, K.J. Walters, K. Teruya, T. Tanaka, G.T. Gassner, S. J. Lippard, Y. Kyogoku, and G. Wagner. Identification by nmr spectroscopy of residues at contact surfaces in large, slowly exchanging macromolecular complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 121 :9903–4, 1999.

- [13] M. J. Howard, H. J. Chauhan, G. J. Domingo, C. Fuller, and R. N. Perham. Protein-protein interaction revealed by nmr t(2) relaxation experiments : the lipoyl domain and e1 component of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of bacillus stearothermophilus. *J Mol Biol*, 295 :1023–37, 2000.

Discussion générale et conclusion

L'étude du mécanisme d'oxydation et de régénération de la MsrB par RMN s'est faite en plusieurs étapes. La première fut d'obtenir l'attribution des atomes ^1H , ^{15}N et ^{13}C pour la MsrB réduite. Cette étape m'a permis de me familiariser avec les techniques de RMN et ainsi obtenir un protocole d'étude pour les protéines suivantes examinées au laboratoire. La MsrB, par sa taille moyenne, ne doit pas constituer un problème pour une étude par RMN. L'un des principaux problèmes rencontrés est un nombre important de superpositions des pics pour la dimension «carbone». De plus le rapport signal sur bruit était faible pour les expériences utilisées en comparaison avec d'autres protéines étudiées au laboratoire. Malgré ces difficultés, j'ai obtenu plus de 90% d'attribution pour les atomes du squelette de la MsrB réduite.

A ce niveau, deux solutions m'étaient offertes pour continuer l'étude de la MsrB.

- La première solution consistait au calcul de la structure 3D de la MsrB réduite de *N. meningitidis* en utilisant les données collectées à partir des cartes NOESY. Cette solution n'a pas été retenue car nous avons obtenu seulement 60% d'attribution pour les atomes des chaînes latérales de la MsrB réduite. De plus, les données tirées de la structure obtenue par RX en 2002 par l'équipe de Matthews pour la MsrB de *N. gonorrhoeae* semblent être en accord avec les prédictions des structures secondaires déduites des déplacements chimiques des atomes de la MsrB de *N. meningitidis*. Nous avons donc préféré utiliser la structure de la MsrB de *N. gonorrhoeae* comme référence pour la suite de l'étude.
- La deuxième solution était d'utiliser l'attribution des atomes du squelette de la MsrB réduite de *N. meningitidis* pour mener des études d'interaction et de comprendre les effets et les conséquences de la MetSO et de la Trx sur la structure de la MsrB. Nous avons donc commencé par l'étude de la MsrB réduite en interaction avec le substrat Ac-L-Met-[*R,S*]-SO-NHMe. Afin de ne pas faire évoluer la réaction vers la forme oxydée de la MsrB, nous avons utilisé le mutant C117S. La seconde étude a porté sur l'étude de l'intermédiaire de réaction qui correspond à la formation d'un acide sulfénique sur la cystéine catalytique. Cet intermédiaire a été rendu stable par

la mutation de la cystéine de régénération en sérine (mutant C63S). La troisième étude est celle de la MsrB comprenant un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 117 et 63, dite MsrB oxydée. Enfin la quatrième étude a consisté en l'étude de l'interaction entre la MsrB oxydée et la Trx. Cette dernière étape est indispensable pour que la MsrB retrouve son activité réductase.

L'étude de l'interaction de la MsrB avec la MetSO doublement protégée montre une affinité faible de la MsrB avec ce ligand. la région du site actif n'est pas la seule région affectée par la fixation du ligand. En effet, la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ impliquant une partie des deux brins est également perturbée. Au vue de la structure cristallographique, cette boucle peut se positionner de façon telle qu'elle empêche l'accès du site actif au substrat. La perturbation des résidus présents sur cette boucle peut s'expliquer par un mouvement de cette dernière lors de l'approche du substrat afin de faciliter l'accessibilité du site actif. Il se peut également que la boucle se referme sur le substrat quand ce dernier se situe à l'intérieur du site actif. Dans notre cas, le substrat est une petite molécule mimant un résidu méthionine sulfoxyde entouré de deux autres résidus. *In vivo*, la MsrB réduit les résidus méthionine sulfoxyde se situant à la surface d'une protéine; l'accessibilité au site actif doit donc être important et non spécifique. Le mouvement de cette boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ serait donc logique pour augmenter l'interface d'interaction. La valeur du K_D (18 ± 10 mM) est compatible avec une interaction seulement spécifique à la présence d'une fonction sulfoxyde sur les méthionines [4.4]. Une perturbation à longue distance a également été observée au niveau du site putatif de fixation du métal. Ce site de fixation n'est pas conservé chez toutes les MsrB, ce qui est le cas de la MsrB de *N. meningitidis*. L'hypothèse serait que la présence du métal aurait un rôle de stabilisation de la structure de la MsrB. Le fait que celui-ci ne soit pas présent chez la MsrB de *N. meningitidis* peut engendrer une faible modification de la structure au niveau du site putatif de fixation.

La formation de l'intermédiaire oxydée acide sulfénique de la MsrB entraîne une modification non négligeable de l'empreinte HSQC (^1H , ^{15}N) en comparaison avec la MsrB réduite. On remarque une augmentation du nombre de tâches de corrélations au centre du spectre RMN 2D. Ceci est caractéristique d'une déstructuration partielle de la MsrB. Lors du calcul de la surface des pics de corrélation correspondant à ceux de la MsrB réduite, on remarque que la surface des pics situés proche du site actif diminue à chaque ajout croissant de MetSO. Par contre les pics les plus éloignés spatialement ne semblent pas être affectés. La perturbation des résidus n'est pas seulement localisée aux résidus du site actif mais se localise sur toute une zone de la protéine. Il semblerait que la formation de l'acide sulfénique au niveau de la cystéine 117 entraîne une déstructuration d'une partie de la MsrB. Par contre, à l'inverse de ce que l'on pouvait observer lors de l'interaction de

la MetSO avec la MsrB, dans le cas de la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, la structure du site putatif de fixation du métal ne semble pas être perturbée.

L'attaque de la cystéine 63 sur la fonction sulfénique de la cystéine 117 entraîne la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. La difficulté pour obtenir une protéine MsrB oxydée stable à des concentrations élevées, indispensables pour l'étude par RMN, fut difficile. La présence d'un milieu oxydant au sein de l'échantillon à de fortes concentrations en protéine semble favoriser la formation de dimères sûrement due à la création de ponts disulfure intermoléculaires. L'obtention de plusieurs échantillons de MsrB oxydée ne présentant pas de dépôt a pu être réalisée. Ces échantillons ne présentaient pas toujours la même empreinte HSQC (^1H , ^{15}N). Malgré cela, tous révélaient un spectre HSQC (^1H , ^{15}N) comparable à des protéines partiellement dénaturées. En fonction de l'échantillon, le pourcentage d'attribution des atomes du squelette est plus ou moins important sans être complet. A partir de l'attribution, on remarque que peu de structures secondaires sont conservées et la déstructuration ne serait pas seulement localisée au niveau du site actif mais sur l'ensemble de la protéine. A partir de ces résultats, on peut penser que la formation du pont disulfure intramoléculaire entraînerait une déstructuration de la MsrB. Cette déstructuration serait initiée au moment de la formation de l'acide sulfénique. La déstructuration de la MsrB lors de la formation du pont disulfure est confirmée par un gel filtration où les volumes d'élution correspondant à la MsrB réduite et oxydée sous forme de pont disulfure ne sont pas identiques. Cette différence est liée au volume occupé par la protéine dans l'espace. Celui de la MsrB oxydée est plus important et serait donc lié à la présence de boucles plus nombreuses à la surface. Lorsque l'on ajoute de la Trx à l'intérieur de l'échantillon, le spectre HSQC (^1H , ^{15}N) de la MsrB est superposable à celui de la MsrB réduite. La déstructuration partielle de la MsrB est donc réversible. On peut expliquer cette déstructuration par la nécessité qu'à la Trx d'avoir accès au pont disulfure intramoléculaire de la MsrB afin de favoriser la réduction de ce dernier. Cette hypothèse est confirmée par des études de mutagenèse effectuées au laboratoire du MAEM où l'insertion d'un ion métallique au niveau du site putatif de fixation d'un métal chez la MsrB de *N. meningitidis* entraîne une stabilité très importante de la structure de la MsrB oxydée mais interdit la réduction du pont disulfure par la Trx.

Enfin, l'interaction de la MsrB oxydée sous forme de pont disulfure avec la Trx a été effectuée malgré l'attribution partielle des atomes du squelette de la MsrB oxydée. La première méthode pour étudier l'interaction a été de créer une liaison covalente entre les deux protéines *via* la formation d'un pont disulfure. L'empreinte HSQC (^1H , ^{15}N) de la MsrB de ce complexe nous indique que la protéine est complètement dénaturée. La largeur spectrale pour les protons amidiques est égale à 1 ppm. Pour la deuxième

méthode, nous avons utilisé plusieurs mélanges MsrB oxydée / Trx C32A en faisant varier la concentration de Trx. Dans ce cas, nous avons calculé un K_D de $330 \pm 110 \mu\text{M}$. La valeur de cette constante indique une affinité moyenne entre les deux partenaires. Les études de cinétiques menées par le laboratoire MAEM indiquent que ce serait la dissociation du complexe MsrB/Trx qui serait l'étape limitante du mécanisme globale de la MsrB. Cette hypothèse impliquerait que la MsrB, ou la Trx, subirait un réarrangement structural lors de la dissociation.

Les résultats obtenus par RMN sur l'ensemble du mécanisme catalytique de la MsrB semblent suggérer qu'un premier réarrangement structural interviendrait lors de la formation du pont disulfure intramoléculaire de la MsrB. Ce réarrangement pourrait même être initié par la formation de l'acide sulfénique au niveau de la chaîne latérale de la cystéine 117. Cette «désorganisation» structurale faciliterait la reconnaissance de la MsrB avec la Trx. Après l'échange de ponts disulfures entre la MsrB et la Trx, la dissociation du complexe MsrB réduite / Trx oxydée permettrait à la MsrB de retrouver sa structure 3D initiale pour réduire de nouveau un autre résidu méthionine sulfoxyde.

Pour ce qui est de l'étude de l'interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde, il serait intéressant de visualiser l'interface d'interaction en utilisant d'autres substrats. L'idée serait d'utiliser un peptide d'un dizaine de résidus contenant une méthionine sulfoxyde appartenant à la séquence d'une protéine reconnue par la MsrB. L'utilisation d'un substrat plus important permettrait de mieux comprendre le rôle de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$. De plus des expériences de NOESY transférée et de STD pourraient également être entreprises afin de mieux visualiser la géométrie spatiale du site actif.

En parallèle de ces études d'interactions, des mesures de dynamiques de la protéine à partir du calcul des temps de relaxation T1 et T2 ainsi que des mesures des nOe hétéronucléaires permettraient de mieux comprendre la dynamique particulière de cette protéine à chaque étape du mécanisme. Les études de dynamique ont été mises au point par Nicolas Coudevylle qui travaille sur la MsrA d'*E. coli* dont le principal objectif est de comprendre comment se forme le pont disulfure de cette protéine alors que les deux cystéines sont espacées de plus de 11 Å. Les études de dynamique pourraient confirmer ou infirmer l'hypothèse proposée pour la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ mais également de comprendre la déstructuration de la MsrB lors de son oxydation.

Pour les études du mécanisme, il serait intéressant d'utiliser la technique du marquage par intéine décrit dans le chapitre 2. Dans ce cas, nous pourrions étudier l'ensemble de la protéine PilB en ne marquant que spécifiquement la MsrB. Nous avons pu constater que la MsrB seule est flexible et à tendance à se déstructurer lors de son oxydation. Ce phénomène

peut être dû à l'absence des deux autres domaines : le domaine MsrA et le domaine N-terminal. Dans ce cas là, la dynamique de la protéine pourrait être complètement différente et les effets du substrat, notamment sur la boucle $\beta 5-\beta 6$ mais également à longue distance, sur le site putatif de fixation du métal pourraient s'en trouver modifier. Évidemment, la déstructuration lors de l'oxydation de la MsrB pourrait être diminuée par la présence des deux autres domaines ainsi que l'interaction avec la Trx. Le domaine N-terminal étant susceptible de réduire la MsrB, deux possibilités sont envisageables : 1) utiliser seulement les domaines MsrA et MsrB et ainsi s'abstenir de l'effet du domaine N-terminal lors de l'étude de l'interaction entre la MsrB et la Trx et 2) ne pas utiliser la Trx pour réduire la MsrB mais étudier l'effet du domaine N-terminal.

Enfin, la détermination de la structure de la MsrB sous sa forme réduite et oxydée peut également être envisagée. A partir des résultats actuels il semble difficile d'obtenir une structure de la MsrB oxydée. Mais si nous prenons en compte la MsrB incluse dans la protéine PilB, il serait envisageable d'obtenir une structuration plus importante de la MsrB oxydée ce qui faciliterait l'attribution des atomes. Par contre, en ce qui concerne la MsrB sous sa forme réduite, le pourcentage de l'attribution des atomes des chaînes latérales ne nous permet pas d'envisager l'obtention d'une résolution optimale pour la structure pour l'instant. D'autres expériences RMN seront nécessaires pour augmenter le pourcentage d'attribution.

Résumé

L'exposition des protéines aux entités oxygénées actives entraîne la formation de méthionine sulfoxydes (MetSO). L'oxydation des protéines au niveau des méthionines peut conduire à des modifications conformationnelles et à une modulation de leur activité. Leur réduction en méthionines est catalysée par les méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Elles peuvent avoir un rôle bénéfique dans la lutte contre le vieillissement mais également néfaste dans le cas de certaines bactéries pathogènes pour l'homme. Ces enzymes sont divisées en deux classes, MsrA et MsrB, structurellement différentes qui sont spécifiques de la configuration absolue du substrat.

Nous nous sommes intéressés à l'étude conformationnelle, par RMN, de la Msr de classe B de *Neisseria meningitidis* par RMN. L'objectif de cette thèse est de caractériser le mécanisme catalytique de la MsrB et de comprendre les liens qui existent entre la MsrB et ses partenaires (MetSO et la thiorédoxine).

A partir de l'attribution de chacun des atomes ^1H , ^{13}C et ^{15}N de la MsrB sous sa forme réduite, nous avons constaté que la structure prédite était en accord avec celle obtenue par cristallographie RX pour la MsrB de *N. gonorrhoeae*. L'étude de l'interaction de la MsrB avec un substrat sulfoxyde montre que le site d'interaction n'est pas le seul à être perturbé par la fixation du substrat. Les deux intermédiaires qui se succèdent au cours de la réaction sont la MsrB sous forme acide sulfénique et celle possédant un pont disulfure. Leur étude montre une réorganisation structurale de la protéine lors de son oxydation. L'interaction spécifique de la Trx avec la MsrB oxydée conduit à la réduction de cette dernière qui retrouve sa structure 3D de départ.

Abstract

Methionine sulfoxides (MetSO) are easily formed in proteins exposed to reactive oxidative species commonly present in cells. Structural modification and modulation of their activity are the consequence of the oxidation of the protein methionines. Their reduction, back to methionines, is catalyzed by methionine sulfoxide reductases (Msr). These enzymes play a beneficial role in aging process but are involve in the virulence of some bacteria. Msr's are divided in two classes, named MsrA and MsrB, which display opposite stereoselectivities toward the sulfoxide center site.

In this PhD thesis, we present studies of the conformational changes of the *Neisseria meningitidis* MsrB by NMR with the purpose of characterising the catalytic mechanism of the MsrB and of understanding the interaction between MsrB and its partners (MetSO and thioredoxin).

From the ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the reduced form of MsrB, we conclude that the predicted secondary structures are in agreement with those obtained from the X-ray data of the *N. gonorrhoeae* MsrB. Interaction studies of MsrB with a sulfoxyde substrat show that the active site is not the only one perturbed by the binding. The two next intermediates which are formed along the reaction are a MsrB which possesses a sulfenic acid and a MsrB with a locally specific disulfide bridge. Studies of these two intermediates reveal a structural change during the protein oxidation. Specific interaction between Trx and the oxidized MsrB leads to the reduction of the latter which recovers its starting 3D structure.