HAL
open science

Etude structurale, dynamique et fonctionnelle par résonance magnétique nucléaire de la méthionine sulfoxyde réductase A d'Escherichia coli :

Nicolas Coudevylle

To cite this version:

Nicolas Coudevylle. Etude structurale, dynamique et fonctionnelle par résonance magnétique nucléaire de la méthionine sulfoxyde réductase A d'Escherichia coli :. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2005. Français. NNT : 2005INPL110N . tel-01752522

HAL Id: tel-01752522

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752522

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Ecole doctorale RP2E

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

(Spécialité Génie des Procédés)

par **Nicolas Coudevylle**

Etude structurale, dynamique et fonctionnelle par Résonance Magnétique Nucléaire de la Méthionine Sulfoxyde Réductase A d'*Escherichia coli*

Soutenue publiquement le 9 Décembre 2005

Membres du jury :

Président :	M. G. Chassaing	Directeur de Recherche, Paris VI
Rapporteurs :	M. E. Guittet	Directeur de Recherche, ICSN, Gif sur Yvette
	M. J.M. Lancelin	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
Examinateurs :	M. G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M. M. T. Cung	Directeur de Recherche, INPL, Nancy
	M. P. Mutzenhardt	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR CNRS-INPL 7568

1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy CEDEX

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le professeur Edith Dellacherie qui dirigeait le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire lors de mon arrivée au sein de cette unité, ainsi que Mesdames les professeurs Anne Jonquière et Brigitte Jamart-Grégoire qui sont respectivement les actuelles directrice adjointe et directrice du laboratoire, de m'avoir accueilli au sein du LCPM (UMR CNRS-INPL 7568).

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à Monsieur le docteur Manh Thong Cung, directeur de recherche au CNRS, qui fut mon directeur de thèse durant ces trois années. Je ne le remercierais jamais assez de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer une thèse, mais aussi de m'avoir formé à la RMN et communiqué sa passion pour cette technique. Il fut un directeur de thèse toujours disponible, patient, bienveillant et particulièrement confiant en mes capacités, ce qui m'a permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Toute ma gratitude va à Monsieur le docteur Eric Guittet, directeur de recherche au CNRS, ainsi qu'à Monsieur le professeur Jean-Marc Lancelin, qui me font l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Et également à Monsieur le docteur Gérard Chassaing, directeur de recherche au CNRS, d'avoir accepter de participer au jury de cette thèse.

Je remercie également Monsieur le professeur Guy Branlant, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire du laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire (UMR 7567, CNRS UHP), qui est l'initiateur de la thématique Msr à Nancy et dont la collaboration fructueuse et de longue date avec l'équipe biostructure du LCPM est à l'origine de cette thèse. Je lui suis aussi reconnaissant de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je remercie vivement Monsieur le professeur Pierre Mutzenhardt du Laboratoire de Méthodologie RMN (UMR CNRS-UHP 7565) d'avoir collaboré à ce travail, travailler à son contact fut extrêmement enrichissant et j'ai beaucoup apprécié toute l'aide et les conseils qu'il m'a promulgué.

Je remercie messieurs les professeurs Jean Pierre Jacquot et Eric Gelhay du Laboratoire Interactions Arbres Microorganismes (UMR 1136 INRA-UHP) avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer au début de ma thèse.

Je remercie Monsieur le docteur Guy Lippens de l'institut Pasteur de Lille (UMR 8525 CNRS-Lille 2) pour m'avoir accueilli une semaine dans son laboratoire en « stage » d'observation, et tout particulièrement le docteur Jean-Michel Wieruszeski pour tout ses conseils de « RMNiste » confirmé. Je remercie également messieurs les docteurs Eric Guittet et Nicolas Birlirakis du laboratoire de RMN de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (UPR CNRS 2301) pour l'accès national au spectromètre 800 MHz.

Je remercie également toute l'équipe d'Enzymologie Moléculaire du MAEM. En particulier Madame le professeur Sandrine Boschi-Muller, pour sa contribution a ce travail. Monsieur le docteur Saïd Azza et particulièrement Monsieur Mathias Antoine, pour avoir produit l'essentiel des échantillons utilisés dans le cadre de ces travaux, et qui fut un collaborateur très agréable, toujours disponible et réactif à toutes les idées farfelues que j'ai pu lui soumettre. Au sein de ce laboratoire j'ai eu l'occasion de rencontrer bien des personnes fort sympathiques : Arnaud, Adeline, Fabrice, Lionel, les deux Séverine, Alex K, François, Jimmy, Aïleen, Houdda, Allan et tout particulièrement Alexandre Olry et ma chère Karine que je remercie pour sa présence, son soutien et son aide inconditionnelle.

Je remercie tout le personnel du groupe synthèse organique et biostructures, du LCPM et de l'ENSIC que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années. En particulier Madame le docteur Marie-Christine Averlant-Petit pour ces coups de mains et surtout pour m'avoir donné l'occasion d'effectuer des enseignements de RMN, ainsi que Monsieur le docteur Guy Boussard, de même que tout ceux avec qui j'ai pu former des liens d'amitié : Annsof, Olivier, Axelle, Chrystel, Alex H., Isa, Aurélien, Marco, Sophie qui a beaucoup contribué à ce travail, Ced, Fred, Caro, Guillain, Steff, Marie, Maud.

Je remercie mes chers potes Ch'ti : Etienne, Kevin, Maïa, Marie, Juju, Julien, Mimou, Sophie, Dédé, Julie qui sont mes racines, pour tous les excellents moments qu'on a passés ensemble et pour être des amis toujours présents malgré la distance.

Enfin, je remercie toute ma famille, mes parents pour leur soutien et pour m'avoir encouragé et cru en moi dans tout ce que j'entreprenais, mon petit frère, mes oncles et tantes, cousins et cousines et ma grand-mère Denise ainsi que mes grands parents disparus qui ne verront malheureusement pas l'aboutissement de ce travail. Merci à tous pour leur amour et leur soutien.

Abréviations :

COSY : COrrelation SpectroscopY

CPMG : Carr Purcell Meiboom Gill

CSA : Chemical Shift Anisotropy

Da : Dalton

DOSY : Diffusion Ordered SpectroscopY

DTT : DiThioThréitol

nOe : Nuclear Overhauser effect

ERN : Espèces Réactives de l'azote

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

INEPT : Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire

IUAPC : International Union of Aplied and Pure Chemistry

NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

Msr : Méthionine Sulfoxyde Réductase

Met : Méthionine

MetSO: Méthionine SulfOxyde

PDB : Protein Data Bank

PCR : Polymerase Chain Reaction

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TOCSY : Total Correlation SpectroscopY

TROSY : Transverse Relaxation Optimised SpectroscopY

Trx : Thiorédoxine

TSP : TriméthylSilyl Propionate

Watergate : WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation

Table des matières

AVANT PROPOS **1**

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **3**

I-1 LES METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASES (MSR) **5**

I-1.1 ESPECES CHIMIQUES REACTIVES ET DOMMAGES OXYDATIFS CELLULAIRES 5

I-1.1.1 Les espèces chimiques réactives *5*

I-1.1.2 Oxydation de cibles cellulaires *13*

I-1.1.3 Conséquences de l'oxydation des méthionines d'une protéine *16*

I-1.1.4 Mécanismes de réparation des protéines oxydées *18*

I-1.2 LES METHIONINES SULFOXYDE REDUCTASES 19

I-1.2.1 Rôles physiologiques des Msr *20*

I-1.2.2 Intérêt de l'étude des Msr *23*

I-1.3 CARACTERISATION DES MSR 23

I-1.3.1 Mécanisme catalytique *23*

I-1.3.2 Les différentes classes et sous-classes de Msr *24*

I-1.3.3 Spécificité de substrat *27*

I-1.3.4 Etudes structurales *28*

I-1.4 CONCLUSION 36

I-2 LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PROTEINES **37**

I-2.1 ETUDE RMN D'UNE PROTEINE DE GRANDE TAILLE 38

I-2.1.1 Limites de la technique RMN appliquée à l'étude des protéines *39*

I-2.1.2 Méthodologie appliquée à l'étude d'une protéine par RMN *40*

I-2.1.3 Avancées méthodologiques et technologiques *52*

I-2.2 LA DYNAMIQUE DES PROTEINES EN RMN 55

I-2.2.1 Phénomènes d'échange *55*

I-2.2.2 Dynamique des protéines et relaxation *58*

I-2.3 CONCLUSION 62

I-3 OBJECTIF DES TRAVAUX **63**

CHAPITRE II : ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DE LA FORME REDUITE ET D'UNE FORME OXYDEE (CYS_{51}-CYS_{198}) DE LA MSRA D'*ESCHERICHIA COLI* 80

II-1 INTRODUCTION 82

II-2 ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DE LA FORME REDUITE DE LA MSRA D'ESCHERICHIA COLI 84

II-2.1 ETUDE PRELIMINAIRE 84

II-2.1.1 Examen de la séquence de $MsrA^{E.coli}$ 85

II-2.1.2 Premiers spectres RMN 86

II-2.2 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE DU SQUELETTE PEPTIDIQUE 86

II-2.3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE EN SOLUTION 90

II-2.3.1 Attribution des spectres NOESY et calcul de la structure tridimensionnelle 91

II-2.3.2 Statistiques structurales 92

II-2.3.3 Description de la conformation globale 94

II-2.3.4 Description du site actif et de l'extrémité C-terminale 96

II-2.3.5 Comparaison de la structure en solution avec les structures cristallines connues 100

II-2.4 ETUDE DYNAMIQUE 106

II-2.4.1 Vitesses de relaxation et paramètre nOe hétéronucléaire 107

II-2.4.2 Mobilité interne 110

II-2.5 RELATION STRUCTURE FONCTION 114

II-2.6 CONCLUSION 115

II-3 ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE D'UNE FORME OXYDEE (CYS51-CYS198) DE LA MSRA D'ESCHERICHIA COLI 116

II-3.1 ETUDE PRELIMINAIRE 116

II-3.1.1 Le mutant C86S, C206S réduit 118

II-3.1.2 Le mutant C86S, C206S oxydé 122

II-3.2 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE DU SQUELETTE PEPTIDIQUE 123

II-3.3 OBTENTION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE EN SOLUTION 127

II-3.3.1 Attribution des spectres NOESY et calcul de la structure 128

II-3.3.2 Statistiques structurales 129

II-3.3.3 Description de la conformation globale 131

II-3.3.4 Description du site actif et de l'extrémité C-terminale 133

II-3.3.5 Comparaison des structures tridimensionnelles en solution de la forme réduite et de la forme oxydée Cys_{51}-Cys_{198} 137

II-3.4 ETUDE DYNAMIQUE 140

II-3.4.1 Vitesses de relaxation et paramètre nOe hétéronucléaire 142

II-3.4.2 Mobilité interne 144

II-3.5 RELATION STRUCTURE FONCTION 147

II-3.6 CONCLUSION 150

II-4 MATERIELS ET METHODES 151

II-4.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS 151
II-4.2 SPECTROSCOPIE 151
II-4.3 MESURE DE LA DIFFUSION TRANSLATIONNELLE 152
II-4.3 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE 152
II-4.4 ETUDE STRUCTURALE 153
II-4.5.1 Contraintes de distance 153
II-4.5.2 Contraintes angulaires 153
II-4.5.3 Expériences d'échange 154
II-4.5.4 Modélisation moléculaire 154
II-4.5 ETUDE DYNAMIQUE 154
II-4.6.1 Mesure des vitesses de relaxation 154
II-4.6.2 Mesure du paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N 155
II-4.6.3 Calcul de la mobilité interne 155

CHAPITRE III : ETUDE DES INTERMEDIAIRES DU CYCLE CATALYTIQUE DE LA MSRA D'*ESCHERICHIA COLI* 160

III-1 INTRODUCTION 162

III-2 ETUDE DU COMPLEXE ENZYME/SUBSTRAT 164
III-2.1 LE MUTANT C51A 165
III-2.2 TITRAGE PAR LE SUBSTRAT 169
III-2.2.1 Titrage de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat doublement protégé 171
III-2.2.2 Cartographie de déplacement chimique 176
III-2.3 CONCLUSION 180

III-3 ETUDE DE L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 181
III-3.1 LE TRIPLE MUTANT C86S, C198S, C206S DE $MSRA^{E.COLI}$ 181
III-3.2 L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 185
III-3.2.1 Cartographie de déplacement chimique 185
III-3.2.2 Comportement cinétique de l'intermédiaire acide sulfénique 188
III-3.2.3 Etude Dynamique 189
III-3.3 CONCLUSION 192

III-4 MATERIEL ET METHODES 193
III-4.1 ETUDE DU COMPLEXE EMZYME/SUBSTRAT 193
III-4.2 ETUDE DE L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 194

CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES 197

ANNEXES **202**

A1 ANNEXE I : FIGURES COMPLEMENTAIRES **204**

A2 ANNEXE 2 : OBTENTION D'ECHANTILLONS DE MSRA MARQUES **208**

A2.1 INTRODUCTION 208

A2.2 MATERIEL BIOLOGIQUE ET MILIEUX DE CULCTURE 210

A2.2.1 Souches bactériennes *210*

A2.2.2 Vecteur plasmidique *210*

A2.2.3 Milieux *211*

A2.3 CLONAGE DU GENE SAUVAGE DE MSRA ET TRAVAUX DE MUTAGENESE DIRIGEE 211

A2.3.1 Amplification du gène sauvage de la MsrA d'Escherichia coli *211*

A2.3.2 Insertion du gène dans un vecteur et production d'ADN plasmidique *212*

A2.3.3 Mutagenèse dirigée *213*

A2.4 PRODUCTION ET PURIFICATION DES ECHANTILLONS DE MSRA MARQUEES 214

A2.4.1 Production des protéines recombinantes *214*

A2.4.2 Purification des protéines recombinantes *215*

A2.4.3 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées *216*

A3 ANNEXE III : PREPARATION DU SUBSTRAT SULFOXYDE PROTEGE **218**

A4 ANNEXE IV : EXPRESSION DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION (K_D) ET DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES ESPECES ISSUES DU TITRAGE D'UNE ENZYME PAR SON SUBSTRAT **219**

A5 ANNEXE V : ARTICLES **221**

A5.1 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE B FROM *NEISSERIA MENINGITIDIS* 222

A5.2 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE REDUCED FORM OF THIOREDOXIN H1 FROM POPLAR, A CPPC ACTIVE SITE VARIANT 224

A5.3 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE REDUCED FORM OF METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE A FROM *ESCHERICHIA COLI* 226

A5.4 SOLUTION STRUCTURE OF A NATURAL CPPC ACTIVE SITE VARIANT, THE REDUCED FORM OF THIOREDOXIN H1 FROM POPLAR 228

A5.5 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE N-TERMINAL DOMAIN OF PILB FROM *NEISSERIA MENINGITIDES* 236

A5.6 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF AN OXIDIZED FORM (CYS_{51}-CYS_{198}) MSRA FROM *ESCHERICHIA COLI* 240

Avant propos

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERN) sont des entités chimiques très réactives synthétisées par le métabolisme cellulaire et impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la réponse immunitaire, la transduction du signal ou le maintien de l'homéostasie en oxygène. De nombreuses situations physiologiques, comme la réponse immunitaire contre les microorganismes pathogènes, conduisent à une augmentation anormale de la concentration cellulaire en espèces réactives. Une telle situation est appelée stress oxydant. Les conséquences d'un stress oxydant sont l'oxydation de cibles cellulaires comme l'ADN, les lipides ou les protéines. La méthionine est un acide aminé particulièrement sensible à l'oxydation par les ERO/ERN, son oxydation conduit à la méthionine sulfoxyde (MetSO) dont il existe deux énantiomères de la fonction sulfoxyde : la méthionine-(*S*)-sulfoxyde et la méthionine-(*R*)-sulfoxyde. Les conséquences de l'oxydation des méthionines d'une protéine en MetSO sont l'altération fonctionnelle, l'agrégation ou encore la dégradation. L'oxydation des méthionines d'une protéine en MetSO pourrait ainsi être impliquée dans de nombreuses pathologies telles que certains cancers, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) sont une famille d'enzymes capables de réduire la MetSO en méthionine. Il existe deux classes de Msr, les MsrA réduisant spécifiquement la Met-(*S*)-SO et les MsrB réduisant spécifiquement la Met-(*R*)-SO. Ces enzymes possèdent un mécanisme catalytique original en trois étapes impliquant trois cystéines catalytiques, un intermédiaire acide sulfénique et la formation successive de deux ponts disulfure. La dernière étape du mécanisme est la régénération de l'enzyme *via* la réduction du pont disulfure par la thiorédoxine.

Actuellement, trois structures cristallines de MsrA sont connues, celle d'*Escherichia coli*, celle de *Bos taurus* et celle de *Mycobacterium tuberculosis*. Pour ces trois structures, les

distances entre les atomes C^{β} des trois cystéines sont incompatibles avec la formation de ponts disulfure. Trois hypothèses peuvent expliquer ce désaccord entre les structures cristallines et le mécanisme catalytique : (i) l'état cristallin conduit à une conformation non native de l'extrémité C-terminale, qui comprend les deux cystéines de recyclage, la structure tridimensionnelle en solution pourrait posséder une conformation différente de son extrémité C-terminale ; (ii) l'extrémité C-terminale est animée de larges mouvements qui pourraient permettre le rapprochement des cystéines et la formation des ponts disulfure ; (iii) lors d'une des étapes du cycle catalytique, la protéine subit un réarrangement conformationnel rapprochant les différentes cystéines et permettant la formation des ponts disulfure.

Dans le but de vérifier ces trois hypothèses et de déterminer les propriétés structurales, dynamiques et fonctionnelles de la MsrA d'*Escherichia coli* permettant l'activité catalytique de cette enzyme, nous avons entrepris une étude structurale, dynamique et fonctionnelle par résonance magnétique nucléaire.

Chapitre I

Introduction bibliographique

Sommaire du Chapitre I

I-1 LES METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASES (MSR) 5

I-1.1 ESPECES CHIMIQUES REACTIVES ET DOMMAGES OXYDATIFS CELLULAIRES 5

I-1.1.1 Les espèces chimiques réactives 5

I-1.1.2 Oxydation de cibles cellulaires 13

I-1.1.3 Conséquences de l'oxydation des méthionines d'une protéine 16

I-1.1.4 Mécanismes de réparation des protéines oxydées 18

I-1.2 LES METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASES 19

I-1.2.1 Rôles physiologiques des Msr 20

I-1.2.2 Intérêt de l'étude des Msr 23

I-1.3 CARACTERISATION DES MSR 23

I-1.3.1 Mécanisme catalytique 23

I-1.3.2 Les différentes classes et sous-classes de Msr 24

I-1.3.3 Spécificité de substrat 27

I-1.3.4 Etudes structurales 28

I-1.4 CONCLUSION 36

I-2 LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PROTEINES 37

I-2.1 ETUDE RMN D'UNE PROTEINE DE GRANDE TAILLE 38

I-2.1.1 Limites de la technique RMN appliquée à l'étude des protéines 39

I-2.1.2 Méthodologie appliquée à l'étude d'une protéine par RMN 40

I-2.1.3 Avancées méthodologiques et technologiques 52

I-2.2 LA DYNAMIQUE DES PROTEINES EN RMN 55

I-2.2.1 Phénomènes d'échange 55

I-2.2.2 Dynamique des protéines et relaxation 58

I-2.3 CONCLUSION 62

I-3 OBJECTIF DES TRAVAUX 63

I-1 Les Méthionine Sulfoxyde Réductases (Msr)

Dans des conditions physiologiques normales, il existe dans les cellules des espèces chimiques fortement réactives appelées espèces radicalaires. Ces radicaux, dérivant de l'oxygène ou de l'azote, sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. Sous l'influence de facteurs exogènes ou de pathologies, ils peuvent s'accumuler dans des proportions anormales conduisant à une situation de stress oxydant. Les conséquences d'un stress oxydant sont multiples. En effet, ces espèces réactives sont susceptibles de réagir de manière incontrôlée avec de nombreuses cibles cellulaires dont les protéines. La méthionine est un acide aminé particulièrement sensible à l'oxydation par les espèces radicalaires, son oxydation conduisant à la méthionine sulfoxyde. Lorsque les méthionines d'une protéine sont oxydées sous forme de méthionine sulfoxyde, il en résulte généralement une perte de fonction, voire une dégradation. Ces dégradations peuvent être dramatiques pour les fonctions cellulaires.

Il existe une classe d'enzymes, les méthionine sulfoxyde réductases, capables de réduire les méthionines sulfoxydes en méthionines, restaurant ainsi les propriétés de la protéine et prévenant sa dégradation.

I-1.1 Espèces chimiques réactives et dommages oxydatifs cellulaires

I-1.1.1 Les espèces chimiques réactives

La présence de radicaux dans les cellules est connue depuis une cinquantaine d'années (Commoner *et coll.*, 1954). Ces espèces ont d'abord été décrites comme responsables de nombreux maux : pathologies, cancers, et processus de vieillissement (Harman, 1956 ;

Harman, 1981). Elles sont maintenant connues pour leur ambivalence : nécessaires à de nombreux processus biologiques mais toxiques à haute concentration.

I-1.1.1.1 Terminologie

Selon la définition de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemisrty) « Un radical (ou radical libre) est une entité moléculaire possédant un électron non apparié telle que $^{\cdot}CH_3$, $^{\cdot}SnH_3$, $Cl^{\cdot}$, le point symbolisant l'électron célibataire. » (IUAPC Compedium of Chemical Terminology, 2nd Edition (1997), www.iuapc.org/publications/compendium/). Cet électron, non apparié, rend ces entités particulièrement instables et réactives. Ces composés, étant la plupart du temps chargés, sont qualifiés de radicaux ioniques (cationiques ou anioniques).

Dans un contexte biologique, il convient de distinguer les radicaux primaires qui jouent un rôle physiologique, des radicaux secondaires qui se forment par réaction avec les radicaux primaires. Au sein des radicaux primaires se distinguent ceux qui dérivent de la réduction de l'oxygène de ceux qui dérivent de la réduction de l'azote. Il existe, de plus, des espèces dites actives de l'oxygène ou de l'azote, qui ne sont pas des composés radicalaires mais qui présentent une réactivité importante et sont souvent des précurseurs de radicaux libres. L'ensemble de ces composées (radicaux libres et espèces activées) se regroupe sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour Reactive Oxygen Species) et de l'azote (ERN ou RNS pour Reactive Nitrogen Species).

I-1.1.1.2 Nature et origine des espèces chimiques réactives

L'origine des ERO et ERN a longtemps été supposée comme étant uniquement de nature exogène. Cependant, elles sont synthétisées par la plupart des cellules, en faibles quantités, pour assurer de nombreuses fonctions biologiques (Sies, 1993).

I-1.1.1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Les ERO dérivent de l'oxygène moléculaire (O_2) qui, par une suite de réductions à un électron, va donner successivement le radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, ou eau oxygénée) et le radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$) (*Figure I-1*). Ces réactions présentent d'importantes barrières d'activation et sont donc catalysées par des facteurs endogènes (systèmes enzymatiques) ou exogènes (rayonnements énergétiques ou composés chimiques fortement réactifs).

La réduction de l'oxygène moléculaire par un électron donne le radical anionique superoxyde :

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -} \qquad \textit{eq. I-1}$$

Le radical superoxyde peut être produit de manière enzymatique lors des processus de respiration cellulaire. En effet, les chaînes d'oxydations cellulaires contiennent de nombreux centres d'oxydoréduction capables de catalyser cette réaction (tels que les complexes flavoprotéiques, les centres fer-soufre ou la semi-ubiquinone), ce qui conduit à la formation spontanée du radical anionique superoxyde (Turrens, 2003). La membrane mitochondriale est ainsi la plus importante source de radical superoxyde chez les organismes supérieurs (Chance *et coll.*, 1979). Le radical superoxyde peut aussi avoir une origine enzymatique, sa formation étant catalysée par la NADPH oxydase (Babior, 1999), le cytochrome P450 (Coon *et coll.*, 1992) et la xanthine oxydase (Parks et Granger, 1986).

La formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), à partir du radical superoxyde, est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (Zelko *et coll.*, 2002) :

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad \textit{eq. I-2}$$

En présence d'un ion métallique, notamment l'ion ferreux (Fe^{2+} ou Fe(II)), le peroxyde d'hydrogène peut former spontanément le radical hydroxyle (Stohs et Bagchi, 1995) ; c'est la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996) :

$$H_2O_2 + Fe(II) \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe(III) \qquad \textit{eq. I-3}$$

La réaction entre le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène constitue une autre source de radical hydroxyle, c'est la réaction d'Haber-Weiss (Koppenol, 2001) :

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2^* \qquad \textit{eq. I-4}$$

Cette réaction s'accompagne de la formation d'oxygène singulet (O_2^*), une forme excitée de l'oxygène moléculaire.

Alors que le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont relativement peu réactifs, le radical hydroxyle possède, lui, une réactivité très importante et une durée de vie extrêmement courte. Ces trois entités ($OH^{\cdot}$, H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$) sont les ERO les mieux connues, mais il en existe bien d'autres, telles que l'oxygène singulet, l'ozone (O_3) ou l'acide hypochloreux (HOCl). Ces espèces primaires sont susceptibles de réagir avec des molécules de leur environnement pour former des radicaux secondaires comme le radical peroxyl ($ROO^{\cdot}$).

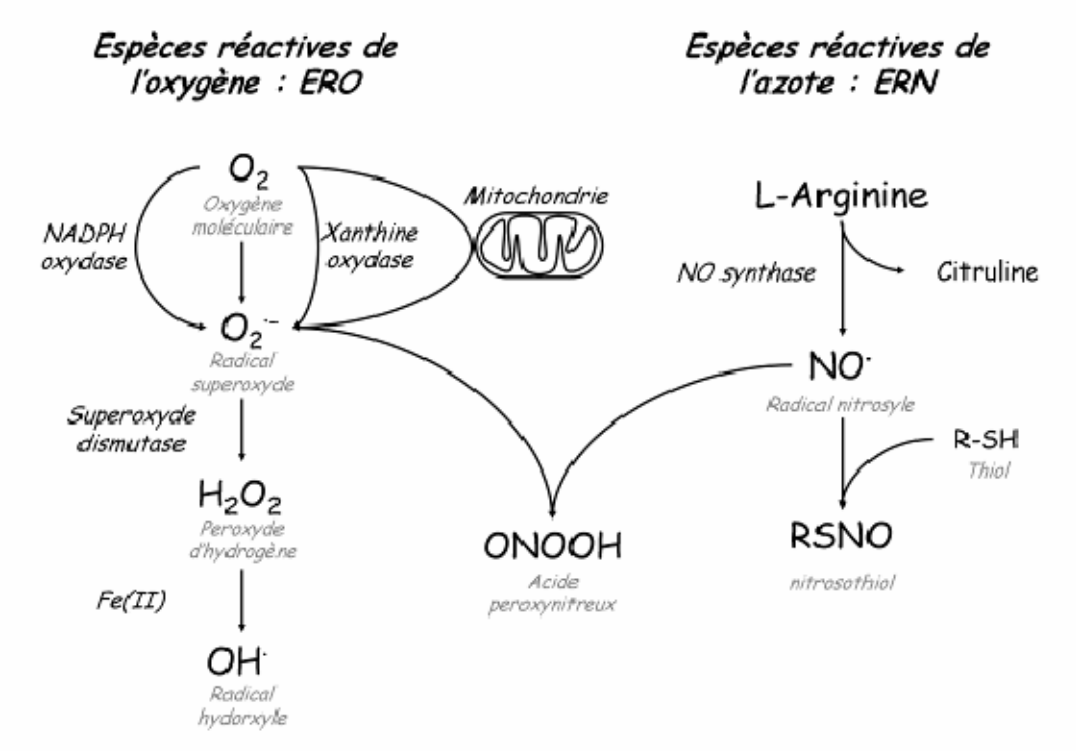


Figure I-1. : ***Nature et origines principales des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN).***

I-1.1.1.2.2 Les espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote dérivent, pour la plupart, du radical nitrosyle ($NO^{\cdot}$). Celui-ci provient de l'oxydation d'un des azotes du groupe guanidinium de l'arginine. Cette réaction, catalysée par la NO synthase, aboutit à la formation du radical nitrosyle et de l'ornithine (Palmer *et coll.*, 1988). Le radical nitrosyle peut réagir avec le radical superoxyde pour former l'anion peroxynitreux ($ONOO^-$) (Jourd'heuil *et coll.*, 2001) :

$$O_2^{\bullet -} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^- \qquad \textit{eq. I-5}$$

Le couple $ONOO^-$/ONOOH possède un pKa de 6,5 - 6,8 selon la force ionique du milieu. Sous sa forme protonée, l'acide peroxynitreux (ONOOH) est un puissant oxydant.

Le radical nitrosyle peut aussi réagir avec les groupes thiols pour former des nitrosothiols (Gow et Stamler, 1998). On trouve d'autres formes réactives de l'azote comme le cation nitrosonium (NO^+), l'anion nitrosyle (NO^-), le trioxyde de dinitrogène (N_2O_3) ou l'acide nitreux ONOH.

Il existe donc une grande variété d'ERO/ERN (*Figure I-1*), dont les propriétés de réactivité et de charge varient et sont à l'origine de leurs rôles physiologiques et de leur toxicité cellulaire variables.

I-1.1.1.3 Rôles physiologiques des espèces chimiques réactives

Les espèces chimiques réactives ne sont donc pas uniquement des produits secondaires du métabolisme oxydatif. De nombreux systèmes enzymatiques, impliqués dans certains processus physiologiques, sont en effet capables de synthétiser ces espèces de manière régulée. Ainsi, de nombreux processus physiologiques impliquant les ERO/ERN ont été amplement étudiés et sont relativement bien connus (*cf.* Droge, 2002, pour une revue) :

- Les ERO/ERN jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Lors de phénomènes inflammatoires, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages activés produisent une grande quantité de ERO/ERN grâce à la NADPH oxydase phagocytaire (Bonizzi *et coll.*, 2000) et à la NO synthase endothéliale (Bogdan *et coll.*, 2000). L'action de ces enzymes et de la SOD aboutit à un mélange très corrosif de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, $NO^{\cdot}$, ONOOH et, dans certains types cellulaires, HOCl (acide hypochloreux) (Hampton *et coll.*, 1998). Cette production massive d'espèces réactives, appelée « explosion oxydative », est capable de détruire les composants bactériens lors de la phagocytose (Baldridge et Gerard, 1933), et est l'un des premiers mécanismes de défense contre les microorganismes pathogènes.

- Certaines ERO/ERN ($NO^{\cdot}$ et H_2O_2) sont relativement peu réactives et peuvent traverser facilement les membranes biologiques. Ces propriétés leur permettent de jouer un rôle de messager chez les organismes supérieurs. En effet, le radical nitrosyle est capable d'inactiver la guanylate cyclase (qui catalyse la formation de GMP cyclique (GMPc), second messager dans de nombreux processus de transduction du signal (Gerzer *et coll.*, 1981)) en se fixant sur la partie hémique de l'enzyme (Ignarro et Kadowitz, 1985). Le radical nitrosyle est ainsi impliqué, entre autre, dans la relaxation des muscles lisses du système vasculaire (Burnett *et coll.*, 1992 ; Ignarro et Kadowitz, 1985) et joue un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central et périphérique (c*f.* Denninger et Marletta, 1999, pour une revue).

Les ERO sont également impliquées dans la transduction du signal (Suzukawa *et coll.*, 2000) et le contrôle de l'homéostasie en oxygène (Haddad, 2004). Les ERO/ERN interviennent ainsi dans de nombreux processus physiologiques. L'omniprésence de l'oxygène, ainsi que sa nécessité vitale pour les organismes aérobies, expliquent l'implication de ses dérivés réactifs dans de nombreux processus physiologiques, et ce, malgré le danger potentiel que représentent ces espèces chimiques. C'est pour se prémunir de ces dangers que les organismes ont développé des systèmes de contrôle et d'élimination des ERO/ERN, dans le but de maintenir leur concentration cellulaire à un niveau non toxique.

I-1.1.1.4 Homéostasie redox et devenir des ERO/ERN

Les ERO et ERN sont synthétisées par les cellules pour remplir les fonctions physiologiques qui leur sont dévolues. Ces espèces étant très réactives, il en résulte un contrôle strict de leur concentration intracellulaire appelé homéostasie redox. Ce contrôle est possible grâce à différents systèmes capables d'éliminer les ERO/ERN : les antioxydants. Puisque la plupart des composés cellulaires sont susceptibles de réagir avec les ERO/ERN, et ainsi de les éliminer, il convient de réserver le terme d'antioxydant à des composés dont la concentration varie lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques (Gutteridge et Halliwell, 1992). Ces antioxydants sont de natures diverses et leurs fonctions peuvent être régulées.

I-1.1.1.4.1 Antioxydants de faible masse moléculaire

- Les acides aminés ne sont pas des antioxydants au sens propre, mais leur faible activité antioxydante est compensée par leur concentration cellulaire importante (de l'ordre de 10^{-1} M). Puisque la plupart d'entre eux sont oxydables par les ERO (Davies *et coll.*, 1987), ils se révèlent être un système d'élimination quantitatif, protégeant des cibles cellulaires plus critiques telles que l'ADN ou certaines protéines.

- Le glutathion est un tripeptide intracellulaire largement répandu chez les êtres vivants (Sies, 1999). La présence d'une cystéine dans sa séquence (γ-Glu-L-Cys-Gly), permet sa dimérisation grâce à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Le glutathion passe alors de l'état réduit GSH à l'état oxydé $(GS)_2$. Il s'oxyde préférentiellement en présence d'ERO/ERN, jouant ainsi un rôle de tampon redox intracellulaire, et est également capable de régénérer les groupements thiols de protéines oxydées. Le rapport de concentration $(GS)_2$/GSH est, de plus, considéré comme un excellent marqueur physiologique de l'état redox de la cellule.

- Les vitamines sont des composés organiques indispensables, en faible quantité, au fonctionnement de l'organisme. Elles ont des rôles physiologiques variés et jouent souvent des fonctions de catalyseurs, se rapprochant en cela des coenzymes. Certains de ces composés, de par leur capacité à capter les électrons célibataires, sont des antioxydants. C'est le cas de la vitamine C (acide ascorbique) (Bielski *et coll.*, 1975), de la vitamine E liposoluble (Packer, 1991) qui prévient ainsi la peroxydation des lipides des membranes cellulaires (Clemens et Waller, 1987), du coenzyme Q (ubiquinone) (Nishikimi *et coll.*, 1980), de l'acide lipoïque (un cofacteur enzymatique) (Packer *et coll.*, 1995).

I-1.1.1.4.2 Antioxydants de haut poids moléculaire

- Les protéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les ERO/ERN. Cette oxydation conduit généralement à une perte de fonction, voire une dégradation par le protéasome (Grune *et coll.*, 1996). Néanmoins, certaines protéines peuvent être oxydées sans perdre leur fonction. Elles jouent ainsi le rôle de piége à ERO/ERN. C'est notamment le cas de la glutamine synthétase qui possède 16 méthionines en surface dont 8 peuvent être oxydées en méthionines sulfoxydes sans que l'enzyme ne souffre d'une perte de fonction (Levine *et coll.*, 1996). De même, l'apolipoprotéine A (constituant protéique majeur des HDL) possède deux méthionines (Anantharamaiah *et coll.*, 1988), dont l'oxydation prévient la peroxydation lipidique.

- Il existe, de plus, de nombreux systèmes enzymatiques d'élimination des ERO/ERN. Les superoxydes dismutases et les superoxydes réductases sont capables d'éliminer le radical superoxyde pour donner le peroxyde d'hydrogène (Pianzzola *et coll.*, 1996). Les peroxydases sont, elles, capables de réduire la plupart des peroxydes (dont le peroxyde d'hydrogène) en alcool. Enfin, la thiorédoxine est une enzyme ubiquitaire qui permet la réduction des ponts disulfure intra ou intermoléculaires (générés lors d'un stress oxydant) avec une faible spécificité de substrat. Elle est, de plus, capable de réduire H_2O_2 (Nakamura *et coll.*, 1994).

I-1.1.1.4.3 Systèmes de régulation de la capacité antioxydante cellulaire

Ces systèmes d'élimination sont, pour une grande part, soumis à une régulation, et cela dans le but de garder une concentration intracellulaire en ERO/ERN constante et non toxique. Ces régulations peuvent être sous le contrôle direct des ERO/ERN ou sous le contrôle du rapport thiol/disulfure, notamment par l'intermédiaire du couple GSH/$(GS)_2$. De nombreux systèmes sont en effet connus pour réagir de la même manière sous l'influence d'H_2O_2 que sous l'influence du rapport thiol/disulfure (Galter *et coll.*, 1994 ; Hehner *et coll.*, 2000 ; Kuge et Jones, 1994).

Chez les procaryotes, de nombreux gènes, dont les produits sont des systèmes d'élimination des ERO/ERN, sont sous le contrôle des facteurs de transcription OxyR et SoxR. Ces facteurs de transcription s'oxydent en présence d'ERO et sont alors capables d'induire la transcription des gènes de protéines impliquées dans la résistance au stress oxydant comme la catalase ou la SOD (Bauer *et coll.*, 1999 ; Storz *et coll.*, 1990 ; Zheng *et coll.*, 1998). Alors que chez les organismes supérieurs, il n'existe pas de système similaire. Le contrôle de l'homéostasie redox fait intervenir plusieurs systèmes de régulation et notamment le rapport GSH/$(GS)_2$ (Barrett *et coll.*, 1999).

I-1.1.1.5 Définition et origine du stress oxydant

Le contrôle cellulaire de l'homéostasie redox implique de nombreux intervenants, l'équilibre entre oxydants et antioxydants permettant de maintenir une concentration quasi stable en ERO/ERN (*Figure I-2*). Malgré cet équilibre, la concentration en espèces réactives peut dépasser une valeur critique, conduisant à une situation de stress oxydant. Cette situation peut être transitoire et rapidement rétablie par les antioxydants cellulaires, ou chronique et induire une exposition prolongée des composés cellulaires à ces espèces très réactives.

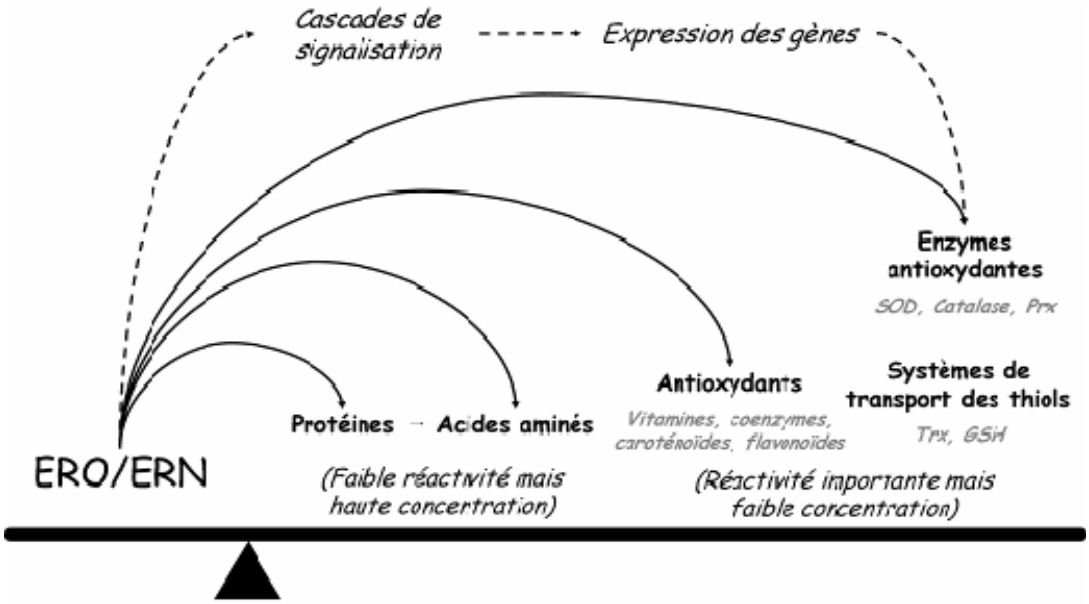


Figure I-2. : ***Représentation de l'homéostasie redox.*** *La balance entre oxydants et antioxydants permet de maintenir une concentration quasiment stable en ERO/ERN..*

Un stress oxydant peut donc survenir lors d'une production excessive d'ERO/ERN ou lors d'un défaut d'efficacité des systèmes antioxydants. Les situations physiologiques aboutissant à un tel stress sont nombreuses. Des facteurs exogènes ou environnementaux peuvent provoquer un stress oxydant : les rayons ionisants X, γ et les rayonnements UV peuvent générer l'anion superoxyde ; des métaux toxiques (chrome, cuivre) catalysent la réaction de Fenton ; certaines particules inhalées (amiante, fumée de cigarette) exacerbent la phagocytose, ce qui conduit à une production excessive d'ERO. Lors d'une infection, les microorganismes subissent un fort stress oxydant de la part du système immunitaire de l'hôte. Chez les organismes supérieurs, un stress oxydant peut être la conséquence d'une pathologie : telle que l'alcoolisme (Wu et Cederbaum, 2003), le diabète (Oberley, 1988) ou certains cancers (Szatrowski et Nathan, 1991). Quelle que soit l'origine d'un stress oxydant, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ERO/ERN est un danger pour l'intégrité des composants cellulaires de toute nature : acides nucléiques, lipides et protéines.

I-1.1.2 Oxydation de cibles cellulaires

Toutes les espèces générées lors d'un stress oxydant n'ayant pas la réactivité nécessaire pour attaquer des cibles cellulaires, les dommages oxydatifs sont généralement causés par les espèces radicalaires, en particulier $OH^{\cdot}$.

Les effets d'une attaque radicalaire sur les cibles cellulaires sont multiples et dépendent de la nature chimique de la cible (acide nucléique, lipide ou protéine). Les conséquences physiologiques sont souvent dramatiques pour l'organisme et à l'origine de nombreuses pathologies telles que cancers, athérosclérose, cataracte, maladie d'Alzheimer ou maladies cardiovasculaires. Une théorie particulièrement populaire est la « théorie de l'âge », postulant que les processus dégénératifs associés à l'âge, résultent en grande partie des conséquences de dommages oxydatifs (Harman, 1956).

I-1.1.2.1 Les acides nucléiques

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque des ERO. On recense, en effet, une centaine de modifications de l'ADN, la plupart causées par le radical hydroxyle, qui peuvent conduire à la modification des bases azotées (Devasagayam *et coll.*, 1991), à la formation d'un site abasique ou à des cassures simple ou double brin de l'ADN. Il existe des systèmes de réparation de l'ADN capables de corriger ces modifications par excision de base (BER) ou de nucléotide (NER) assurant ainsi la pérennité de la molécule d'ADN. Ces systèmes peuvent être saturés en cas de stress important ; les lésions non réparées perturbent alors les mécanismes de réplication ce qui conduit généralement à des mutations par transversion GC vers TA, une première étape vers les voies de cancérisation (Sekiguchi et Tsuzuki, 2002).

I-1.1.2.2 Les lipides

Les lipides insaturés sont des cibles privilégiées des ERO. En effet $OH^{\cdot}$, ainsi qu'O_2^{*}, arrachent aisément un proton aux carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué (Vargas *et coll.*, 1998). Ce radical s'oxyde spontanément pour former un radical peroxyl. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique (Esterbauer *et coll.*, 1992), et est capable de se propager d'une molécule à l'autre. Cette réaction en chaîne peut être interrompue grâce à la vitamine E insérée dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Une attaque oxydative sur les lipides circulants conduit à l'oxydation des LDL (lipoprotéine de densité légère) qui, captées par des macrophages, forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome responsable de maladies cardiovasculaires (Shaw, 2004).

I-1.1.2.3 Oxydation des protéines

Les protéines sont des cibles privilégiées des attaques radicalaires compte tenu de leur abondance naturelle dans la cellule (*cf.* Davies, 2005, pour une revue)

I-1.1.2.3.1 Oxydation du squelette peptidique

Seules les espèces radicalaires possèdent la réactivité nécessaire pour oxyder le squelette peptidique. Ces radicaux (particulièrement $OH^{\cdot}$) sont capables d'arracher le proton alpha de la chaîne polypeptidique. Le radical ainsi formé est partiellement stabilisé grâce à la délocalisation électronique des groupes carbonyles et amides voisins. Ce radical peut réagir avec O_2 pour donner un radical peroxyl ou avec un autre radical pour former une espèce pontée (l'encombrement stérique défavorise cette possibilité). Un radical peroxyl peut libérer $HO_2^{\cdot}$ pour donner une imine (Garrison, 1987), ou arracher un proton pour donner un peroxyde (Davies, 1996) (*Figure I-3*).

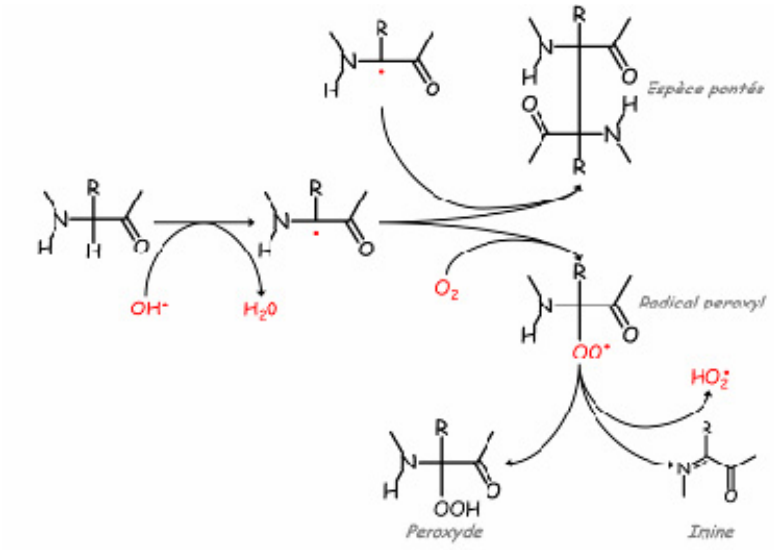


Figure I-3. : ***Oxydation du squelette peptidique d'une protéine.***

I-1.1.2.3.2 Oxydation des acides aminés aliphatiques

Les chaînes latérales d'acides aminés aliphatiques se révèlent encore moins réactifs que le squelette peptidique. Néanmoins, $OH^{\cdot}$ est capable d'arracher un proton de la chaîne aliphatique pour former un radical. Le devenir de ce radical est similaire à celui de la chaîne peptidique : il peut dimériser avec un autre radical, réagir avec un groupement thiol pour donner un radical thiyl ($RS^{\cdot}$) (Biaglow *et coll.*, 1989). Il réagit préférentiellement avec O_2 pour former un peroxyl instable, ce qui conduit à des réarrangements ou à une fragmentation de la chaîne latérale (Hawkins et Davies, 2001).

I-1.1.2.3.3 Oxydation des acides aminés aromatiques

Les réactions d'oxydation de la chaîne latérale d'acides aminés aromatiques sont variées. Elles consistent, dans la grande majorité des cas, en des réactions d'addition. Ainsi, on observe la chloration ou la nitration de noyaux aromatiques par HOCl et ONOOH, qui donneront par exemple la chlorotyrosine ou la nitrotyrosine. On observe également la formation de radical phénoxyl par addition d'$OH^{\cdot}$. Le radical phénoxyl peut dimériser pour former un pontage dityrosine intra ou intermoléculaire.

I-1.1.2.3.4 Oxydation des acides aminés soufrés

L'atome de soufre est aisément oxydable, ce qui rend les acides aminés soufrés très sensibles aux attaques par les espèces réactives. De plus, ce sont les seuls acides aminés oxydables directement par un peroxyde sans la catalyse d'un ion métallique.

I-1.1.2.3.4.1 La cystéine

La réaction de la cystéine avec une espèce radicalaire conduit à la formation du radical thiyl. Ce radical peut dimériser pour former un pont disulfure ou réagir avec O_2 pour donner un peroxyl (Wardman et von Sonntag, 1995). Le devenir de ce radical est la formation d'un acide sulfinique (RSO_2H), voire un acide sulfonique (RSO_3H).

L'oxydation de la cystéine par des espèces non radicalaires conduit à différents adduits. L'oxydation du groupe thiol par l'acide nitreux donne un nitrosothiol. La réaction avec un peroxyde conduit à la formation d'un acide sulfénique (RSOH) (*Figure I-4-A*).

I-1.1.2.3.4.2 La méthionine

Dans la grande majorité des cas, l'oxydation d'une méthionine conduit à la formation de la méthionine sulfoxyde (MetSO). En effet, l'addition du radical hydroxyle sur l'atome de soufre de la méthionine aboutit à la formation d'un adduit hydroxy sulfuranyl qui va facilement perdre un ion OH^- et donner naissance à un radical cationique. Ce radical va former la MetSO en fixant un radical superoxyde (Hiller *et coll.*, 1981 ; Miller *et coll.*, 1998 ; Schoeneich *et coll.*, 1993). L'oxydation du soufre par les peroxydes aboutit à un cation $R\text{-}S^+(OH)\text{-}R$ qui perd facilement un proton pour donner la MetSO. On peut observer des mécanismes similaires lors de l'oxydation de la méthionine par O_2^* et O_3. Le soufre de la fonction sulfoxyde de la MetSO possède une orbitale libre, incapable d'inverser sa configuration, lui conférant un caractère tétraédrique. Il existe donc deux diastéréoisomères de la L-methionine sulfoxyde : la L-Met-(*S*)-SO et la L-Met-(*R*)-SO (*Figure I-4-B*).

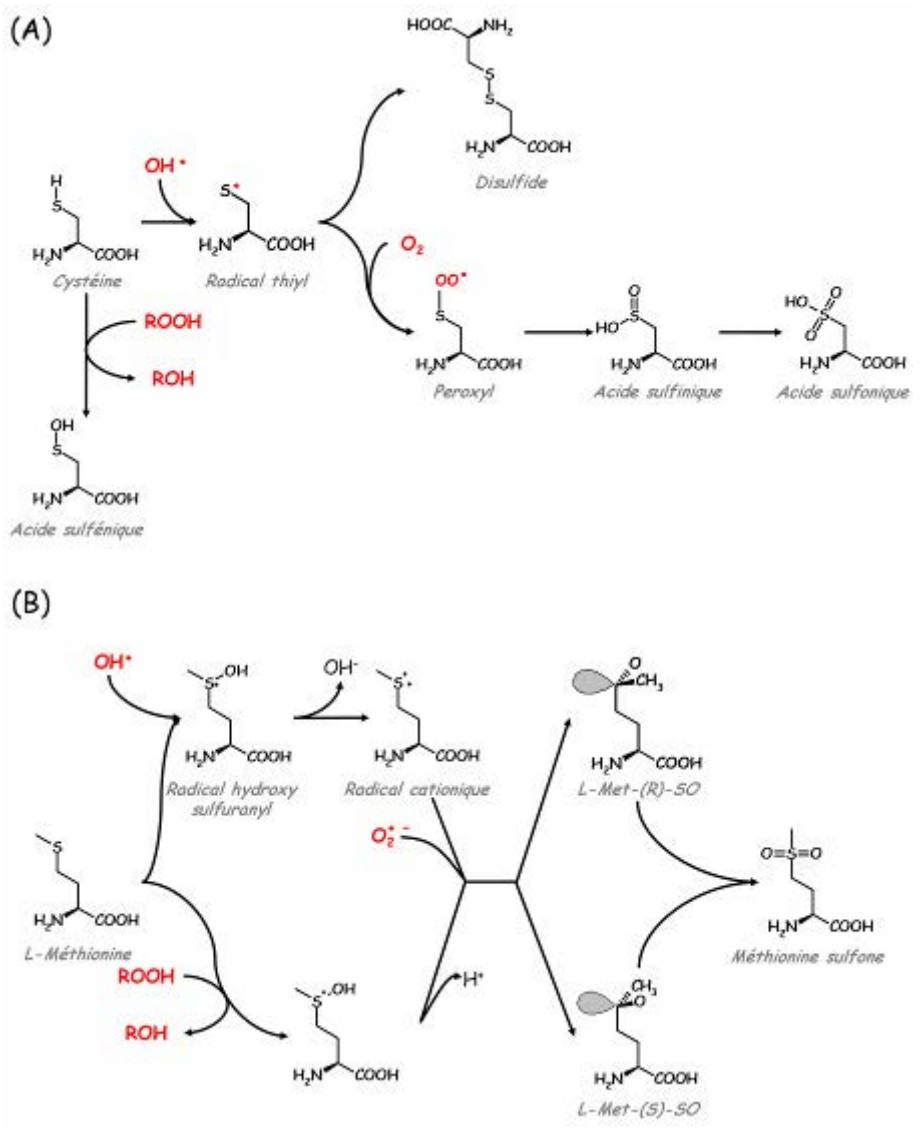


Figure I-4. : ***Oxydation des acides aminés soufrés.*** *(A) Oxydation de la cystéine (B) Oxydation de la méthionine.*

Lors de l'oxydation des méthionines d'une protéine, le rapport des énantiomères *R* et *S* de la fonction sulfoxyde n'est pas systématiquement équilibré. Cette observation suggère que l'environnement chimique de la méthionine dans la protéine est capable de favoriser la formation d'un énantiomère particulier. Dans des conditions de pH et de température extrêmes, la fonction sulfoxyde peut s'oxyder en sulfone irréductible.

I-1.1.3 Conséquences de l'oxydation des méthionines d'une protéine

En raison de l'abondance physiologique des protéines et de la réactivité de l'atome de soufre, les acides aminés soufrés, en particulier les méthionines, sont les premiers à être

touchés lors d'un stress oxydant. Les conséquences de l'oxydation des méthionines d'une protéine dépendent de leur localisation dans la protéine.

Les méthionines de surface sont les plus facilement oxydables, puisque les plus accessibles au solvant. Cependant, leur oxydation n'a que peu d'effets pour la plupart des protéines. Cette caractéristique est, par ailleurs, à l'origine des propriétés antioxydantes de certaines protéines riches en méthionines (Levine *et coll.*, 1999).

L'oxydation de méthionines au cœur de la protéine a des conséquences beaucoup plus importantes. En effet, la méthionine est moins polaire que sa forme sulfoxyde. En s'oxydant elle va provoquer des réarrangements conformationnels plus ou moins importants pour placer la MetSO dans un environnement plus polaire, voire en contact avec le solvant. L'oxydation d'une méthionine d'un site actif ou d'une zone d'interaction peut ainsi conduire à une perte de fonction. Dans le cas d'une méthionine participant à la stabilisation du cœur hydrophobe de la protéine, l'oxydation conduit à une perte de structure par exposition des zones hydrophobes au solvant.

I-1.1.3.1 Perte de fonction

De nombreuses protéines voient leur activité modulée, voire inhibée, par l'oxydation de leur(s) méthionine(s) : c'est le cas de la protéine ribosomale L12 (Caldwell *et coll.*, 1978), de la calmoduline (Gao *et coll.*, 2001 ; Gao *et coll.*, 1998), ou de l'apolipoprotéine A-I (Anantharamaiah *et coll.*, 1988). Certaines de ces protéines sont impliquées dans des pathologies importantes :

- L'α-synucléine est une protéine présynaptique de 42 KDa. Son traitement *in vitro* par H_2O_2 conduit à l'oxydation des quatre méthionines de la protéine en MetSO. L'α-synucléine oxydée possède la même conformation que la forme native, mais n'est plus capable de former des fibrilles et inhibe la formation de ces dernières par les protéines natives. De plus, elle forme des oligomères solubles. Ce processus d'agrégation, s'il survient *in vivo* au sein des neurones dopaminergiques, pourrait être un facteur déclanchant de la maladie de Parkinson (Glaser *et coll.*, 2005).

- La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative associée à un stress oxydant. Le cerveau de patients atteints du syndrome présente des plaques d'amyloïde. Le peptide amyloïde-β (Aβ) est un composant majeur de ces dépôts protéiques. Il comprend une méthionine oxydable qui pourrait jouer un rôle dans l'agrégation et la cytotoxicité du peptide Aβ (Walsh *et coll.*, 2002).

- L'α_1-antitrypsine est une glycoprotéine inhibitrice de protéases, notamment de l'élastase, une protéase neutrophile capable de dégrader l'élastine de la matrice alvéolaire des poumons. L' α_1-antitrypsine exerce ainsi un rôle de protection des tissus. Elle contient deux méthionines dont l'oxydation provoque une chute de l'inhibition. L'activité incontrôlée de l'élastase conduit à l'emphysème pulmonaire par dégradation des tissus pulmonaires (Taggart *et coll.*, 2000). La fumée de cigarette, source indirecte d'ERO, peut notamment être la cause de l'oxydation *in vivo* de l' α_1-antitrypsine (Travis *et coll.*, 1980).

Ainsi, de par l'oxydation de résidus de méthionines, un stress oxydant peut avoir des conséquences importantes sur les fonctions cellulaires et parfois conduire à de graves pathologies (maladies d'Alzheimer et de Parkinson, emphysème pulmonaire).

I-1.1.3.2 Perte de structure et dégradation

L'oxydation de méthionines au cœur d'une protéine conduit à une perturbation importante de sa structure tridimensionnelle, voire à des réarrangements conformationnels conduisant à l'exposition au solvant de zones hydrophobes oxydées. Ces zones hydrophobes sont spécifiquement reconnues par le protéasome (Mary *et coll.*, 2004), complexe macromoléculaire qui dégrade les protéines endommagées (Reinheckel *et coll.*, 1998). Le protéasome joue ainsi un rôle dans le maintien de l'homéostasie redox en éliminant les protéines oxydées.

Dans le cas de stress oxydant important, les protéines oxydées peuvent s'agréger et former des amas. Ces amas anormaux résistent à la protéolyse et inhibent l'activité du protéasome en s'y fixant de manière irréversible (Bulteau *et coll.*, 2000). Ils peuvent également s'associer aux lipides pour former les dépôts de lipofuschines qui sont caractéristiques des tissus de sujets âgés.

I-1.1.4 Mécanismes de réparation des protéines oxydées

L'oxydation des résidus d'une protéine peut donc avoir de lourdes conséquences. La réparation des dégâts engendrés par ces oxydations permettrait d'éviter la perte de fonction ou la dégradation des protéines touchées. Il n'existe cependant que peu de systèmes cellulaires capables de réparer les dégâts engendrés par l'oxydation des protéines, le devenir de celles-ci étant, la plupart du temps, les voies cataboliques. Néanmoins, les acides aminés soufrés sont susceptibles d'être réparés par différents systèmes cellulaires.

Les cystéines oxydées en acide sulfénique ou ayant formé un pont disulfure sont réduites par la thiorédoxine ou le glutathion. De plus, un système enzymatique ATP

dépendant, capable de réduire les cystéines, suroxydées en acide sulfinique, de la peroxyredoxine, a récemment été identifié chez la levure (Biteau *et coll.*, 2003). Cette enzyme appelée sulfirédoxine (Srx), fait actuellement l'objet de nombreuses études.

Dans le cas de méthionines oxydées, le stade sulfone est biologiquement irréversible, alors que la méthionine sulfoxyde est réductible par un système enzymatique identifié il y a environ 25 ans. Ces enzymes capables de réduire les méthionines sulfoxyde en méthionines sont appelées méthionine sulfoxyde réductases (Msr).

I-1.2 Les méthionine sulfoxyde réductases

La première activité méthionine sulfoxyde réductase a été observée en 1960 dans des extraits de levure (Black *et coll.*, 1960). Black et ses collaborateurs ont en effet identifié un système enzymatique capable de réduire spécifiquement la L-méthionine sulfoxyde. Ce système fait intervenir trois enzymes identifiées ultérieurement comme étant la thiorédoxine, la thiorédoxine réductase et l'enzyme capable de réduire la MetSO (Porque *et coll.*, 1970). En 1979, Ejiri et coll. (Ejiri *et coll.*, 1979) constatent la même activité dans des extraits d'*Escherichia coli*, et observent la croissance d'une souche d'*E. coli* auxotrophe pour la méthionine sur un milieu contenant de la méthionine sulfoxyde. Ces observations révèlent l'existence d'une enzyme capable de réduire la méthionine sulfoxyde en méthionine. Cette méthionine sulfoxyde réductase (Msr) n'est isolée d'*Escherichia coli* qu'en 1980 par Ejiri et coll. (Ejiri *et coll.*, 1980), cette enzyme étant capable de réduire les MetSO libres en Met. En 1981, Brot et coll. (Brot *et coll.*, 1981) mettent en évidence une activité Msr capable de réduire les résidus de MetSO de la protéine ribosomal L12 d'*E. coli*. Cette enzyme, d'abord appelée pMsr (pour Protein bound Methionine Sulfoxide Reductase), fut ensuite renommée MsrA. Le premier gène de MsrA n'a été cloné à partir du génome d'*E. coli* qu'onze ans plus tard, en 1992 (Rahman *et coll.*, 1992). En 2000, Moskovitz et coll. mettent en évidence la stéréospécificité de la MsrA pour le diastéréoisomère L-Met-(*S*)-SO (Moskovitz *et coll.*, 2000) ce qui suggère l'existence d'une enzyme capable de réduire le diastéréoisomère L-Met-(*R*)-SO. Cette enzyme n'a été découverte que récemment par Grimaud et coll., et fut baptisée MsrB (Grimaud *et coll.*, 2001).

Les Msrs de classe A (MsrA) et de classe B (MsrB) forment une famille enzymatique capable de réparer l'ensemble des méthionines sulfoxydes. Ce sont des protéines monomériques, solubles et ubiquitaires, présentes chez la plupart des êtres vivants (mis à part dans quelques bactéries et *archae* hyperthermophiles) (Kryukov et Gladyshev, 2002). Depuis 25 ans, ces enzymes ont été étudiées et l'état des connaissances actuelles sur les Msr couvre

leurs rôles physiologiques, leur mécanisme enzymatique et leurs structures. En janvier 2005, la revue Biochemica et Biophysica Acta a consacré un numéro spécifique à l'oxydation de la méthionine et aux Msr. Les revues qui y figurent ont en partie guidé cette étude bibliographique (*cf.* Bigelow et Squier, 2005 ; Boschi-Muller *et coll.*, 2005 ; Davies, 2005 ; Elfarra et Krause, 2005 ; Ezraty *et coll.*, 2005 ; Glaser *et coll.*, 2005 ; Hansel *et coll.*, 2005 ; Kauffmann *et coll.*, 2005 ; Moskovitz, 2005 ; Panzenbock et Stocker, 2005 ; Petropoulos et Friguet, 2005 ; Schoneich, 2005 ; Stadtman *et coll.*, 2005 ; Weissbach *et coll.*, 2005).

I-1.2.1 Rôles physiologiques des Msr

I-1.2.1.1 Rôle de réparation

La fonction première des Msr est de réduire en méthionines les méthionines sulfoxydes libres ou liées dans une protéine. Cette activité de réparation a été observée pour de nombreuses protéines. La première fut la protéine ribosomiale L12 d'*Escherichia coli* (Brot *et coll.*, 1981), mais également, par la suite, l'apolipoprotéine A-I qui voit alors restaurées ses propriétés de fixation des lipides (Sigalov et Stern, 2001), la protéine de choc thermique Hsp16.3 (Abulimiti *et coll.*, 2003) et les inhibiteurs de la famille des SERPIN (Lawrence et Loskutoff, 1986). Cette fonction de réparation implique les Msr dans de nombreux processus physiologiques.

I-1.2.1.2 Rôle d'antioxydant et de résistance au stress oxydant

Comme il a été décrit précédemment, de nombreuses protéines possèdent des résidus méthionines pouvant être oxydés sans que la protéine ne subisse une perte de fonction. Ce qui confère à ces protéines des propriétés antioxydantes. Les Msr auraient une activité antioxydante indirecte en régénérant le pool des méthionines oxydables.

De plus, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des Msr dans la résistance au stress oxydant. Ainsi, une souche d'*E. coli*, où le gène codant MsrA a été inactivé, montre une sensibilité accrue au stress oxydant (Rahman *et coll.*, 1994). Des observations similaires ont été faites chez *S. cerevisiae* (Moskovitz *et coll.*, 1997) et chez la souris (Moskovitz *et coll.*, 2001). Ces études ont aussi montré que la surexpression de MsrA chez *S. cerevisiae* et chez des lymphocytes T humains induit une meilleure résistance au stress oxydant (Moskovitz *et coll.*, 1998).

I-1.2.1.3 Implication dans les mécanismes de régulation

Comme il a été décrit précédemment, certaines protéines voient leur activité modulée par l'oxydation de leurs méthionines. Certaines observations conduisent à penser que l'oxydation de la méthionine sous forme de MetSO pourrait être une modification post-traductionnelle permettant de réguler l'activité de ces protéines. La Msr jouerait un rôle dans la régulation de ces protéines en réduisant leur MetSO, ce qui leur permettrait de recouvrer tout ou partie de leurs propriétés.

La calmoduline intervient dans la transduction du signal contrôlée par l'intermédiaire du calcium. En fixant Ca^{2+}, elle devient capable de réguler une cinquantaine de protéines. Elle est ainsi impliquée dans le maintien de l'homéostasie en Ca^{2+} et elle active la production mitochondriale d'ATP. Comme il a été décrit précédemment, les chaînes d'oxydation mitochondriales sont des sources importantes d'ERO. Ainsi, l'inactivation de la calmoduline en condition de stress oxydant, par l'oxydation de ses méthionines, permet de limiter la production mitochondriale d'ERO. Les Msr sont capables de réduire les MetSO de la calmoduline oxydée, ce qui restaure son activité régulatrice (Sun *et coll.*, 1999). Elles pourraient donc jouer un rôle dans ce mécanisme de régulation de la production énergétique. Comme il sera décrit plus loin, la régénération de l'activité réductase des Msr est thiorédoxine et NADPH dépendante, ainsi, dans des conditions de stress oxydant important, les Msrs ne sont pas capables de réparer la calmoduline. Lorsque le ratio thiol/disulfure et la concentration cellulaire en NADPH redeviennent favorables, les Msr peuvent régénérer la calmoduline et le métabolisme énergétique retrouve son activité normale (Bigelow et Squier, 2005).

La protéase du virus HIV-2 est une protéine homodimérique essentielle pour l'assemblage et la maturation des particules virales. Cette protéase possède deux méthionines dont l'oxydation *in vitro* conduit à l'inactivation de l'activité protéasique. Cette activité peut être partiellement restaurée après incubation avec MsrA, ce qui suggère un rôle de régulation dans le cycle infectieux du virus (Davis *et coll.*, 2000).

I-1.2.1.4 Implication dans les physiopathologies

Le stress oxydant peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Les Msr pourraient jouer un rôle dans la prévention de ces pathologies. De plus, elles peuvent permettre aux microorganismes pathogènes de résister au stress oxydant généré par l'hôte lors du processus infectieux.

I-1.2.1.4.1 Rôle dans la virulence des bactéries pathogènes

Lors des processus infectieux, les microorganismes pathogènes sont soumis à un fort stress oxydant dû à l'explosion oxydative provoquée par les cellules du système immunitaire de l'hôte. Les Msr permettent à ces organismes de résister à cette attaque oxydative. Ainsi, une souche mutée de *Mycobacterium smegmatis*, n'exprimant plus MsrA, présente un taux de survie dans les macrophages plus faible que la souche sauvage (Douglas *et coll.*, 2004).

Une souche mutée de *Mycoplasma genitalium*, n'exprimant plus MsrA, montre une diminution de sa capacité d'adhérence aux érythrocytes de mouton. En effet, P140, qui est une protéine extramembranaire impliquée dans les mécanismes d'adhérence, possède 13 méthionines. L'oxydation de ces méthionines pourrait conduire à une inactivation de P140 et à une baisse de l'adhérence à la cellule hôte (Dhandayuthapani *et coll.*, 2001). Des observations similaires ont été faites chez *Erwinia chrysanthemii*, où l'inactivation du gène codant MsrA entraîne une plus grande sensibilité au stress oxydant, une diminution de la mobilité et de la virulence (Hassouni *et coll.*, 1999).

Ces observations montrent que : (i) les Msr sont impliquées dans les mécanismes de mobilité et d'adhésion aux cellules hôtes, tout en garantissant l'intégrité des protéines impliquées dans ces mécanismes ; (ii) les Msr permettent aux organismes pathogènes de mieux résister aux défenses immunitaires de l'hôte. Les Msr sont donc impliquées dans la capacité de virulence des organismes pathogènes.

I-1.2.1.4.2 Implication dans les maladies neurodégénératives

Le stress oxydant peut être un facteur déclenchant ou favorisant certaines pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, pathologies où l'oxydation des méthionines peut être à l'origine de processus moléculaires caractéristiques comme la formation de la plaque d'amyloïde ou l'agrégation de l'α-synucléine. Les Msr pourraient jouer un rôle dans ces pathologies. En effet, le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montre une activité MsrA plus faible (Gabbita *et coll.*, 1999). Cette baisse d'activité permettrait l'oxydation du peptide amyloïde-β et la formation de la plaque d'amyloïde.

I-1.2.1.4.3 Implication dans les processus de vieillissement

La « théorie de l'âge » postule que les processus dégénératifs associés à l'âge sont en grande partie les conséquences de dommages oxydatifs. Les Msr, de par leur capacité à réparer les dégâts engendrés par les ERO, devraient être capables de prévenir l'apparition de

ces phénomènes dégénératifs. On observe chez le rat âgé une augmentation du taux de protéines ayant leurs méthionines oxydées ainsi qu'une baisse de l'activité Msr de 50 à 60 %, et ce dans la plupart des tissus excepté le cerveau (Petropoulos *et coll.*, 2001). De plus on remarque une diminution de la durée de vie de souris transgéniques dont on a inactivé les gènes codant les Msr (Moskovitz *et coll.*, 2001). Enfin, la surexpression de MsrA chez la drosophile augmente sa durée de vie de 70 à 80 % (Ruan *et coll.*, 2002). Les Msr sont donc impliquées dans les processus de sénescence : (i) de par une baisse de l'activité Msr avec l'âge ; (ii) de par leur capacité à prévenir les conséquences du vieillissement.

I-1.2.2 Intérêt de l'étude des Msr

La fonction des Msr est de réduire les MetSO en Met. Cette fonction les implique dans de nombreux processus biologiques liés à des problèmes de santé publique importants tels que la virulence des bactéries pathogènes, les maladies neurodégénératives, les processus de sénescence, ainsi qu'un rôle possible dans la régulation du cycle viral d'HIV. L'implication des Msr dans ces processus rend leur étude particulièrement intéressante. Ainsi de nombreuses études biochimiques, enzymatiques et structurales ont été entreprises pour mieux comprendre leur rôle dans ces domaines, leur mode de fonctionnement, leur mécanisme catalytique et leurs structures tridimensionnelles. De plus, leur rôle d'antioxydant et l'ampleur des phénomènes physiologiques et pathologiques liés, plus ou moins directement, au stress oxydant, laissent supposer que le champ d'implication des Msr s'élargira au rythme des découvertes.

I-1.3 Caractérisation des Msr

I-1.3.1 Mécanisme catalytique

Les MsrA et MsrB, étudiées jusqu'à présent, montrent toutes le même mécanisme catalytique original, de type ping-pong, faisant intervenir un intermédiaire acide sulfénique (Boschi-Muller *et coll.*, 2000 ; Olry *et coll.*, 2002). Ce mécanisme s'effectue en trois étapes :

(i) l'attaque nucléophile du thiolate de la cystéine catalytique (Cys_A) sur le soufre de la fonction sulfoxyde de la MetSO conduit à un état de transition réversible (complexe covalent enzyme/substrat), intermédiaire réactionnel qui se réarrange pour libérer la méthionine réduite et conduire à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique (étapes IA et IB).

(ii) le thiolate de la cystéine de recyclage (Cys_B) attaque ensuite le soufre de la cystéine catalytique ce qui conduit à la libération d'une molécule d'eau et à la formation d'un

pont disulfure intramoléculaire Cys_A-Cys_B (étape II). Dans le cas des MsrA à deux cystéines de recyclage, le thiolate de la seconde cystéine de recyclage (Cys_C) attaque la première cystéine de recyclage, ce qui conduit à une migration du pont disulfure Cys_B-Cys_C (étape II').

(iii) le pont disulfure intramoléculaire (Cys_A-Cys_B ou Cys_B-Cys_C) est réductible par la thiorédoxine pour aboutir à la forme réduite, régénérée, de la Msr : Msr_{red}, et à la forme oxydée de la thiorédoxine : Trx_{ox} (étape III). Trx_{ox} est elle-même réduite, ensuite, par la thiorédoxine réductase à $NADPH,H^+$. *In vitro*, la régénération de la Msr oxydée peut être assurée par le dithiothréitol (DTT) (Brot et Weissbach, 1991) (*Figure I-5*).

Du point de vue cinétique ce mécanisme est relativement bien connu. La formation de l'acide sulfénique et du pont disulfure intramoléculaire est rapide. L'étape limitante de ce mécanisme est la réduction, par la Trx, de la Msr oxydée, en particulier la dissociation du complexe Msr_{red}/Trx_{ox} (Antoine *et coll.*, 2003 ; Olry *et coll.*, 2004).

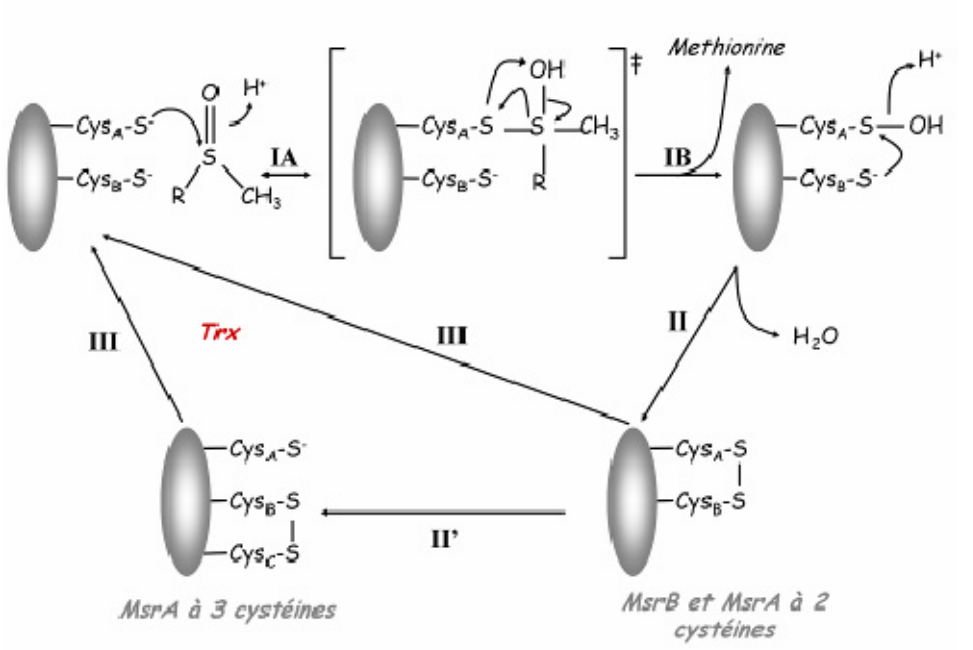


Figure I-5. : ***Mécanisme catalytique général des Msr.***

Même si ce mécanisme est très bien décrit, il subsiste de nombreuses zones d'ombre, particulièrement en ce qui concerne les différents acides aminés intervenant dans la catalyse. De plus, le mécanisme exact de réarrangement du complexe reste indéterminé et pourrait faire intervenir une molécule d'eau (*cf.* Boschi-Muller *et coll.*, 2005, pour une revue).

I-1.3.2 Les différentes classes et sous-classes de Msr

Il existe donc deux classes de Msr, les Msr de classe A et les Msr de classe B, qui diffèrent par leur spécificité de substrat (Met-(*S*)-SO pour MsrA et Met-(*R*)-SO pour MsrB).

Même si ces deux classes de protéine présentent la même activité et le même mécanisme catalytique, l'examen par alignement de leurs séquences primaires montre que : (i) MsrA et MsrB ne possèdent aucune homologie de séquences ; (ii) au sein d'une même classe on peut trouver plusieurs sous-classes. MsrA et MsrB semblent être le produit d'une évolution convergente.

I-1.3.2.1 Les MsrA

Au sein des Msr de classe A, on distingue quatre sous-classes. Dans ces quatre sous-classes, la cystéine catalytique (Cys_A) est toujours la cystéine 51 et appartient au motif conservé Cys_{51}-Phe_{52}-Trp_{53}-Gly_{54}, leur numérotation étant basée sur la séquence de la MsrA d'*E. coli* (*Figure I-6*) :

- la première sous-classe est représentée par la MsrA d'*E. coli* et celle de *B. taurus*. Ces protéines, d'environ 220 résidus, possèdent 2 cystéines de recyclage situées sur la partie C-terminale. La première (Cys_B) est la cystéine 198 qui fait partie du motif Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}-Gly_{199}, la seconde (Cys_C) est la cystéine 206, qui est séparée de la cystéine 198 par une séquence riche en glycines. Le mécanisme catalytique de cette sous-classe fait intervenir la formation de deux ponts disulfure successifs avant la réduction par la thiorédoxine. Même si les deux ponts disulfure sont réductibles *in vitro*, le pont Cys_{198}-Cys_{206} serait réduit préférentiellement par la thiorédoxine. Cette sous-classe comprend aussi la MsrA *d'Erwinia chrysantemii* et la MsrA humaine.
- la seconde sous-classe est représentée par la MsrA de *N. meningitidis* et celle de *M. tuberculosis*. Ces protéines d'environ 180 acides aminés ne possèdent qu'une seule cystéine de recyclage (Cys_B), la cystéine 198, dont la position dans la séquence consensus peut être décalée par l'insertion d'une thréonine entre la tyrosine 197 et la cystéine 198 ; ainsi il existe deux séquences, la séquence Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}-His_{199} chez *N. meningitidis* ou Gly_{196}-Tyr_{197}-$Thr_{197'}$-Cys_{198}-His_{199} chez *M. tuberculosis*.
- la troisième sous classe est représentée par la MsrA de *B. subtilis*. Cette protéine de 177 résidus possède un site actif similaire à celui d'une thiorédoxine. En effet, l'unique cystéine de recyclage est en position 54 et fait partie de la séquence Cys_{51}-Phe_{52}-Trp_{53}-Cys_{54}.
- la dernière sous-classe est représentée par la MsrA putative de *Rhodobacter capsulatus*, protéine de 222 résidus, qui ne possède que la cystéine catalytique. L'activité de cette protéine n'a jamais été vérifiée et, à supposer qu'elle soit fonctionnelle, son mécanisme de régénération reste indéterminé.

```
                                  1               10        20        30        40          50        60        70
                                  l               l         l         l         l           l         l         l
E. coli             --------------MSLF-------DKKHLVSPADALPGRNTPMPVATLHAVNG-HSMTNVPDGMEIAIFAMGCFWGVERLFWQLPGVYSTAA
B. taurus           MLSATRRA--LQLFHSLFPIPRMGDSAAKIVSPQEALPGRKEPLVVAAKHHVNGNRTVEPFPEGTQMAVFGMGCFWGAERKFWTLKGVYSTQV
E. chrysanthemii    -------------MIANF-------DKTQPIGQSDALPGRTTPMPVARLHVVNQ-HSMTHVPDHMEVAIFAMGCFWGVERLFWQQPGVYSTAS
H. sapiens          MLSATRRACQLLLLHSLFPVPRMGNSASNIVSPQEALPGRKEQTPVAAKHHVNGNRTVEPFPEGTQMAVFGMGCFWGAERKFWVLKGVYSTQV
M. tubeculosis      ------------------------------------------------------------MTSNQKAILAGGCFWGLQDLIRNQPGVVSTRV
N. meningitidis     -----------------------------------------------------------MNTRTIYLAGGCFWGLEAYFQRIDGVVDAVS
B. subtilis         ----------------------------------------------------------MSEKKEIATFAGGCFWCMVKPFDEQPGIEKVVS
R. capsulatus       ----------------------------MRRLVLALALALATPAFAEEFRVIPPPAVDAAALGPETAIFAGGCFWGVQGVFQHLNGVISATS
Consensus                                                                                  GCFW

                                 80        90       100       110       120       130       140       150       160
                                 l         l         l         l         l         l         l         l         l
E. coli             GYTGGYTPNPTYREVCSGDTGHAEAVRIVYDPSVISYEQLLQVFWEN-HDPAQGMRQGNDHGTQYRSAIYPLTPEQDAAARASLERFQAAMLA
B. taurus           GFAGGYTPNPTYKEVCSGKTGHAEVVRVVFQPERISFEELLKVFWEN-HDPTQGMRQGNDHGSQYRSAIYPTSAEHVGAALKSKEDYQKVLSE
E. chrysanthemii    GYCGGYTPNPTYREVCTGKTGHAEAVRVVFDPAVVSYPQLLQLFWEN-HNPAQGMRQGNDIGTQYRSAIYTLTTEQETAAKESYQRFQQAMRD
H. sapiens          GFAGGYTSNPTYKEVCSEKTGHAEVVRVVYQPEHMSFEELLKVFWEN-HDPTQGMRQGNDHGTQYRSAIYPTSAKQMEAALSSKENYQKVLSE
M. tubeculosis      GYSGGNIPNATYRNHGT----HAEAVEIIFDPTVTDYRTLLEFFFQI-HDPTTKDRQGNDRGTSYRSAIFYFDEQQKRIALDTI---ADVEAS
N. meningitidis     GYANGNTKNPSYEDVSYRHTGHAETVKVTYDADKLSLDDILQYFFRV-VDPTSLNKQGNDTGTQYRSGVYYTDPAEKAVIAAALK-----REQ
B. subtilis         GYTGGHTENPTYEEVCSETTGHREAVQITFHPDVFPYEKLLELFWQQ-IDPTDAGGQFADRGSSYRAAIFYHNDKQKELAEASK---QRLAES
R. capsulatus       GYAGGTAATAHYDQVSGGETGHAEAVQVVFDPKQISYGDLLQVFFSVAHDPTQLNRQGPDVGPQYRSALFPVTEDQARIAKAYID---QLGRA
Consensus                      Y          E                                   D    Y

                           170       180       190         200        210
                            l         l         l           l          l
E. coli             ADDDRHITTEIANATPFYYAEDDHQQYLHKNPYG-Y-CGIGGIGV-CLPPEA-------------------------- 211
B. taurus           HGFG-LITTDIREGQTFYYAEDYHQQYLSKDPDG-Y-CGLGGTGVSC-PLGIKK------------------------- 232
E. chrysanthemii    AGNDHDITTEIQPAGPFYYAEDEHQQYLHKNPDG-Y-CGLGGIGV-CLPPQG-------------------------- 212
H. sapiens          HGFG-PITTDIREGQTFYYAEDYHQQYLSKNPNG-Y-CGLGGTGVSC-PVGIKK------------------------- 234
M. tubeculosis      GLWPGKVVTEVSPAGDFWEAEPEHQDYLQRYPNG-YTCHFVRPGWRL-PRRTAESALRASLSPELGT----------- 181
N. meningitidis     QKYQLPLVVENEPLKNFYDAEEYHQDYLIKNPNG-Y-CHIDIRKADE-PLPGKTKTAPQGKGFDAATYKKPSDAELKR 192
B. subtilis         GIFKDPIVTDILKAEPFYEAEGYHQHFYKKNPAH-YQRYRTGSGRAGFISEHWGAK---------------------- 176
R. capsulatus       RAFDAAIVTQLDPGAAFYPAEAYHQNFLTLNPDHPYIVQVDMPKIAALERMFPQDWREVPVLLPVAD----------- 221
Consensus                                    Y    P   Y
```

Figure I-6. : ***Alignement des séquence des Msr de classe A d'Escherichia coli, Bos taurus, Erwinia chrysanthemii, Homo sapiens, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitidis, Bacillus subtilis et Rhodobacter capsulatus.*** *La numérotation de ces séquences est basée sur la séquence de la MsrA d'E. coli. Les cystéines catalytiques sont surlignées en noir, les résidus conservés sont surlignés en gris.*

I-1.3.2.2 Les MsrB

Chez ces protéines d'environ 150 résidus, la cystéine catalytique (Cys_A) est toujours la cystéine 117 et fait partie du motif Tyr_{116}-Cys_{117}-Ile/Val/Asn_{118} (la numérotation des résidus étant basée sur la séquence de la MsrB d'*E. coli*). Elles possèdent, au plus, une cystéine de recyclage, la plupart du temps en position 63 et appartenant au motif Cys_{63}-Gly_{64}-Trp_{65}-Pro_{66}. De plus, au sein des Msr de classe B, on distingue trois sous-classes, qui ne seront pas développées ici.

I-1.3.2.3 PilB

PilB est une protéine multidomaine trouvée chez les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*. Cette protéine était initialement connue pour intervenir dans la régulation de l'expression des pilines (Taha et Marchal, 1990). Il s'est révélé que PilB ne joue aucun rôle dans la synthèse des pilines mais possède, en revanche, une activité MsrA et une activité MsrB. En effet, PilB est constituée de 3 domaines : le domaine central possède une activité Msr de classe A, le domaine C-terminal présente une activité Msr de classe B et le domaine N-terminal porte une signature Cys-X-X-Cys qui montre une activité de type thiorédoxine ou DsbE *in vitro* (Wu *et coll.*, 2005). Ce dernier domaine pourrait donc être impliqué dans la régénération des domaines à activité Msr (Olry *et coll.*, 2002).

I-1.3.3 Spécificité de substrat

Outre la spécificité des deux classes de Msr pour l'un ou l'autre des énantiomères *R* et *S* de la fonction sulfoxyde, on peut trouver chez ces protéines plusieurs niveaux de spécificité. Tout d'abord, la fonction sulfoxyde est nécessaire à la reconnaissance du substrat par l'enzyme (puisque la méthionine n'est pas un inhibiteur de l'activité réductase), tout comme la présence d'un groupe méthyle en substituant de l'atome de soufre et de deux carbones entre l'atome de soufre et le C^{α} (Antoine *et coll.*, 2003 ; Olry *et coll.*, 2004 ; Olry *et coll.*, 2002). La configuration du C^{α} n'est, en revanche, pas un critère de spécificité puisque les Msr sont capables de réduire les L-MetSO comme les D-MetSO. Enfin, on observe une meilleure reconnaissance de la MetSO incluse dans un peptide plutôt que libre, même si certaines Msr sont spécifiques de la MetSO libre (Etienne *et coll.*, 2003).

Ces caractéristiques permettent aux Msr de réduire une grande variété de substrats sulfoxydes tels que le DMSO ou le diphénylsulfoxyde (Tamburro *et coll.*, 2001) au détriment de leur affinité pour le substrat puisque les K_M qui ont pu être mesurés sont de l'ordre du

millimolaire. Néanmoins, cette relativement faible spécificité de substrat (mis à part pour la fonction sulfoxyde) potentialise l'activité des Msr sur une grande variété de protéines.

I-1.3.4 Etudes structurales

L'étude de la structure des biomolécules présente un important intérêt fondamental. En effet, la fonction et les propriétés des biomolécules sont directement liées à leur structure tridimensionnelle. En particulier dans le cas des protéines, où la position relative des différents acides aminés dans l'espace va permettre la reconnaissance du substrat, le processus catalytique, l'interaction avec un partenaire, etc. D'un point de vue plus appliqué, la connaissance de la structure tridimensionnelle d'une protéine est d'une importance capitale dans la conception d'inhibiteurs ou de tout effecteur ayant un intérêt thérapeutique.

Dans le cas des Msr, de nombreuses questions restent ouvertes, notamment en ce qui concerne les déterminants structuraux de la spécificité de substrat, mais aussi à propos des différents résidus intervenant dans la catalyse et permettant, par exemple, d'augmenter le caractère électrophile du soufre de la MetSO. Des réponses à ces questions peuvent être apportées par l'examen des structures tridimensionnelles des Msr. A ce jour, plusieurs études structurales ont été menées sur les Msr (*cf.* Kauffmann *et coll.*, 2005, pour une revue). Elles ont montré, comme le laissait supposer l'examen de leurs structures primaires, que MsrA et MsrB ne présentent aucune homologie de structure. Pour les descriptions des structures qui vont suivre, la numérotation des résidus utilisée est celle de *E. coli*, aussi bien dans le cas de MsrB que dans le cas de MsrA.

I-1.3.4.1 Structure des MsrB

Deux études RMN ont étés menées, l'une a permis l'attribution des noyaux ^{1}H, ^{15}N, ^{13}C de la MsrB de *N. meningitidis* (Thureau *et coll.*, 2004) et l'autre a abouti à une structure basse résolution de la MsrB de *B. subtilis* (code PDB 1XM0) (Zheng *et coll.*, 2003 ; Zheng *et coll.*, 2005). Seule une structure de MsrB a été déterminée par cristallographie (Lowther *et coll.*, 2002). Il s'agit du domaine C-terminal de la protéine PilB de *N gonorrhœæ*, une protéine monomérique de 146 résidus (code PDB : 1L1D). L'examen de la structure montre qu'elle est constituée d'un cœur de deux feuillets β antiparallèles « twistés », composés respectivement de 3 et 5 brins. Ces feuillets se font face pour former un tonneau β flanqué de trois hélices α et de cinq hélices 3_{10} (*Figure I-8*). La cystéine catalytique (Cys_A) est la Cys_{117}, située sur le brin β_8, la cystéine de recyclage (Cys_B) est la Cys_{63}, située dans une boucle entre les brins β_3 et β_4. On peut constater que ces deux cystéines sont spatialement proches et

peuvent aisément former un pont disulfure grâce à une rotation de la chaîne latérale de la cystéine 63. Ce repliement est en partie similaire à celui de deux autres protéines : TCTP (Translationally Controlled Tumor-associated Protein) (Thaw *et coll.*, 2001) et Mss4 (Mammalian suppressor of sec4) (Yu et Schreiber, 1995) qui fixe le Zn^{2+} (Zhu *et coll.*, 2001).

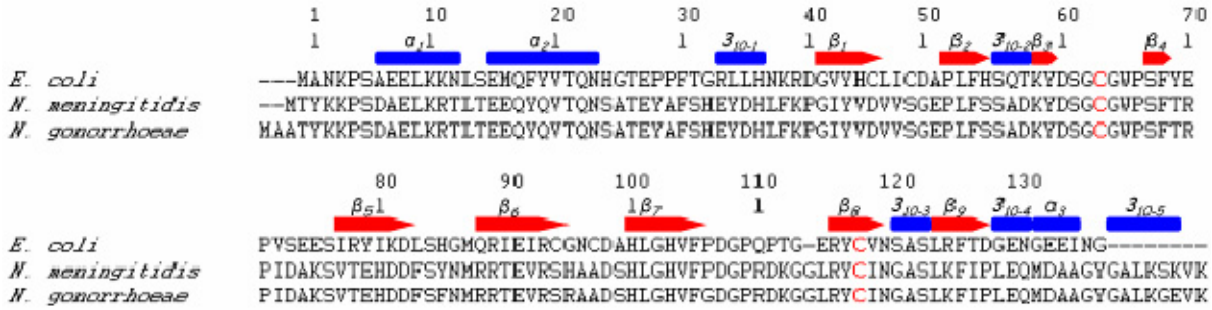


Figure I-7. : ***Séquences et structures secondaires des Msr de classe B.*** *Les structures secondaires, correspondent à celles de la MsrB de N. gonorrhoeae déterminées par cristallographie. Elles sont représentées en rouge pour les brins β et en bleu pour les hélices α et 3_{10}. La numérotation des séquences est celle de la MsrB d'E. coli ; les cystéines catalytiques sont représentées en rouge.*

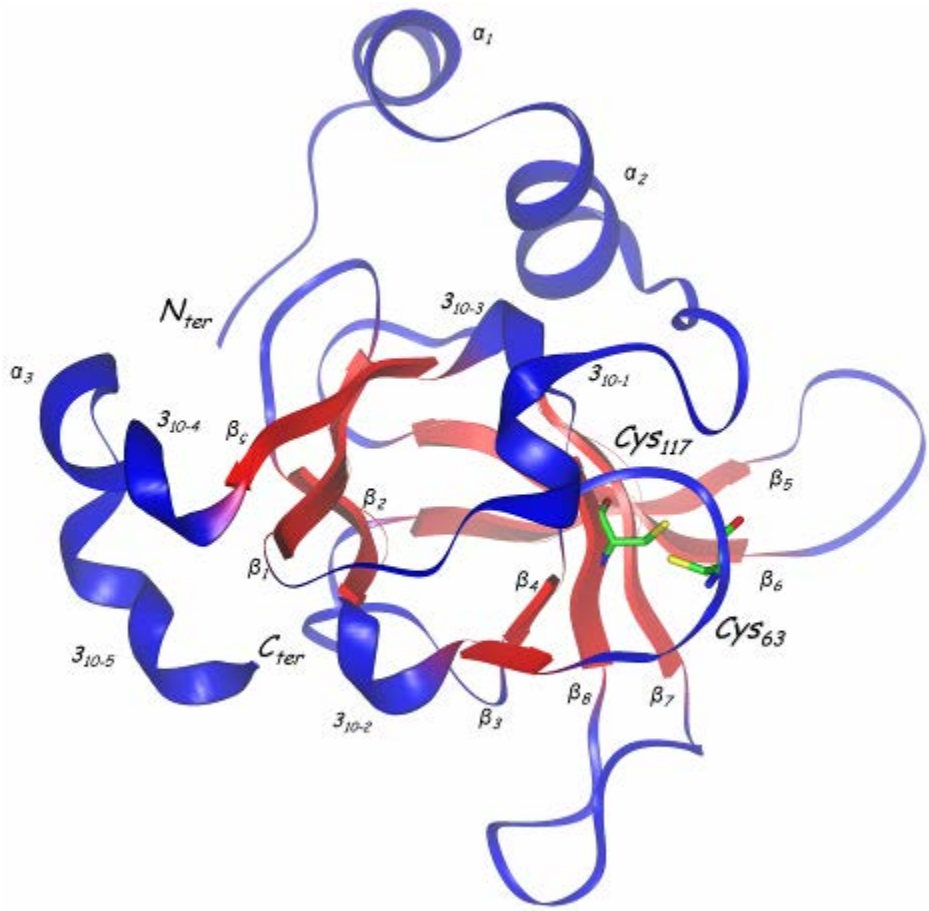


Figure I-8. : ***Structure tridimensionnelle de la Msr de classe B de N. gonorrhœæ déterminée par cristallographie.*** *Les feuillets sont représentés en rouge, les hélices et les boucles en bleu. Sont aussi représentées les deux cystéines catalytiques.*

I-1.3.4.2 Structure des MsrA

A ce jour, les Msr de classe A ont fait l'objet de plusieurs études structurales. Les structures cristallines des MsrA d'*Escherichia coli* (Tete-Favier *et coll.*, 2000), *Bos Taurus* (Lowther *et coll.*, 2000) et *Mycobacterium tuberculosis* (Taylor *et coll.*, 2003) ont été résolues, ainsi qu'une structure obtenue par RMN, celle de la MsrA d'*Erwinia chrysanthemii* (Beraud *et coll.*, 2002 ; Beraud *et coll.*, 2001). Toutes ces structures adoptent le même repliement original constitué d'une partie centrale entourée de ces extrémités N- et C-terminales peu structurées. La partie centrale est constituée d'un feuillet β antiparallèle de 6 brins, flanqué de 5 hélices α et d'un petit feuillet β antiparallèle de 2 brins qui surplombe le site actif. Ce dernier comprend la cystéine 51 (cystéine catalytique : Cys_A) située à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1. Ce coeur montre une conformation quasiment identique pour toutes les structures connues de MsrA, seule la MsrA de *M. tuberculosis* présente des différences mineures : l'hélice α_2 ainsi que l'hélice α_3 y sont un peu plus courtes. L'extrémité N-terminale est constituée au minimum d'une quarantaine de résidus mais sa longueur peut varier selon les organismes (elle peut être un peu plus courte comme chez *M. tuberculosis*). Sa conformation est elle aussi très conservée à partir de l'histidine 7 et sa position par rapport à la partie centrale est stabilisée grâce à des contacts hydrophobes et des liaisons hydrogène putatives ; sa fonction reste à déterminer, et sa présence ne semble pas indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme (Boschi-Muller *et coll.*, 2001). L'extrémité C-terminale a, elle aussi, une longueur variable d'environ trente résidus et comprend la cystéine de recyclage 198 (Cys_B) et la cystéine 206 (Cys_C) dans le cas de MsrA à 2 cystéines de recyclage (*Figure I-9*).

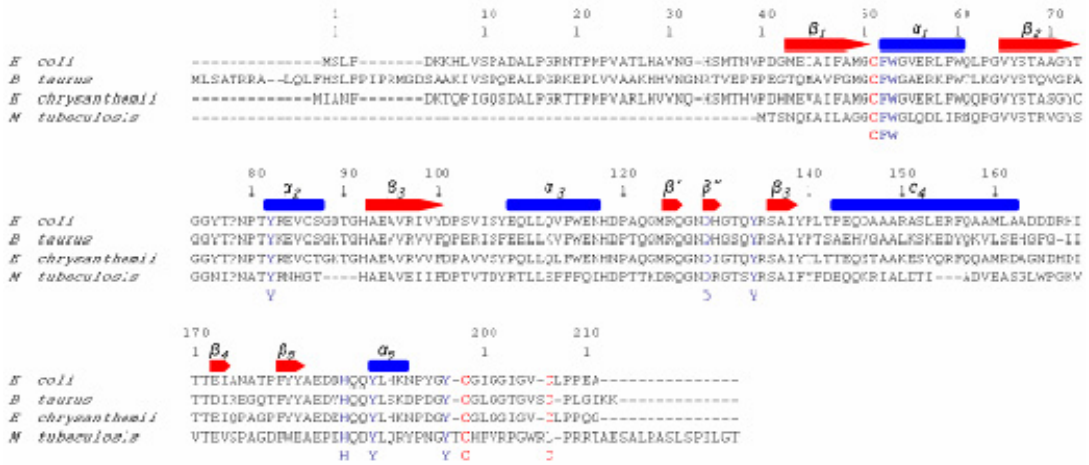


Figure I-9. : ***Structures secondaires et résidus conservés des Msrs de classe A.*** *Les structures secondaires, correspondent à celles de la MsrA de E. coli déterminées par cristallographie. Sont représentés en rouge les brins β et en bleu les hélices α et 3_{10}. La numérotation des séquences est celle de la MsrA d'E. coli ; les cystéines catalytiques sont représentées en rouge, les autres résidus intervenant dans le site actif en bleu.*

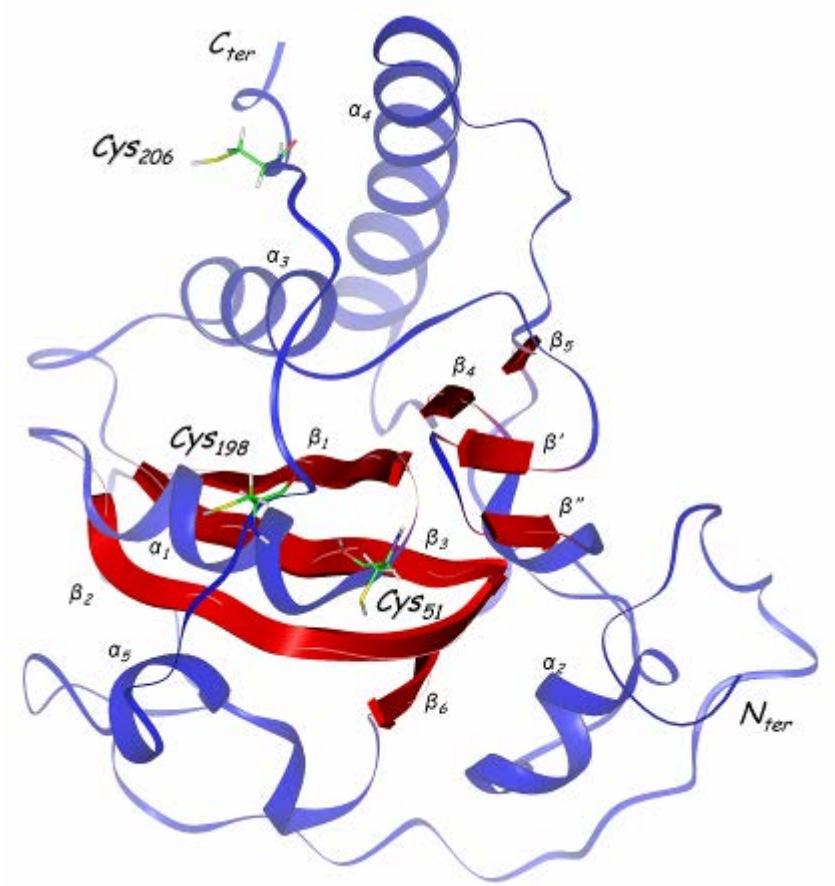


Figure I-10. : Structure tridimensionnelle de la Msr de classe A d'E. coli déterminée par cristallographie. *Les feuillets β sont représentés en rouge, les boucles et les hélices en bleu. Sont aussi représentées les cystéines catalytiques Cys_{51}, Cys_{198} et Cys_{206}.*

Les différentes structures connues présentent, mises à part quelques variations mineures, la même conformation de la partie centrale et de l'extrémité N-terminale. Néanmoins, la conformation de l'extrémité C-terminale (et donc la position relative des cystéines 198 et 206 par rapport à la cystéine 51) peut varier d'une structure à l'autre.

I-1.3.4.2.1 Structures cristallines

Trois structures cristallines sont disponibles dans la PDB. La première décrite est celle d'*E. coli* (code PDB 1FF3), une protéine monomérique de 211 résidus. La maille cristalline comprend 3 monomères (A, B et C). Deux de ces monomères ne sont pas entièrement observables : sur le monomère B, l'extrémité C-terminal à partir du résidu Pro_{194} n'est pas observable ; sur le monomère C, seuls les résidus de Leu_8 à Lys_{192} sont observables. Seul le monomère A est entièrement visible et forme un pont disulfure entre la Cys_{206} du monomère A et la Cys_{86} du monomère B. Dans les trois monomères, la cystéine 51 est sous la forme d'un adduit diméthyl arsenate, les deux groupes méthyles de l'adduit pouvant mimer la position des groupes méthyle et méthylène de la MetSO.

La seconde structure, déterminée par cristallographie, est celle de la MsrA de *Bos taurus*. Cette protéine monomérique de 233 acides aminés a été cristallisée sous deux formes tronquées. La première ne comprend que les résidus 21 à 219 et seuls les résidus 27 à 218 sont observables dans le cristal (code PDB 1FVG). Dans cette structure, une molécule de dithiothréitol (DTT) forme une liaison covalente avec la cystéine 51 et la cystéine 198. La seconde ne comprend que les résidus 13 à 229 et seuls les résidus de 29 à 228 sont observables dans le cristal (code PDB 1FVA).

La dernière structure en date à avoir été déterminée par cristallographie est celle de la MsrA de *Mycobacterium tuberculosis* (code PDB 1NWA). Du fait de l'empilement cristallin, une méthionine d'un monomère est logée dans le site actif du monomère suivant.

Ces trois structures sont en partie représentatives des différentes sous classes de MsrA puisque les MsrA d'*E. coli* et *B. taurus* sont des MsrA à deux cystéines de recyclage, alors que la MsrA de *M. tuberculosis* appartient à la sous classe des Msr à une cystéine de recyclage.

I-1.3.4.2.1.1 Site actif des structures cristallines

Pour ces trois structures, la conformation du site actif est tout à fait similaire, bien qu'aucune ne présente un site actif à l'état natif. Cette particularité permet de situer approximativement la position du substrat dans le site actif et est représentative soit de l'intermédiaire réactionnel (complexe covalent enzyme/substrat) dans le cas des MsrA d'*E. coli* et *B. taurus*, soit du complexe Michaelien enzyme/substrat dans le cas de la MsrA de *M. tuberculosis*.

L'examen de ces structures (*figure I-11*) permet de constater que : (i) le site actif est situé à la surface de la protéine, évasé, accessible au substrat et à la thiorédoxine ; (ii) le site actif est organisé autour de la cystéine catalytique (Cys_{51}) ; (iii) le groupe méthyle de la MetSO se situe dans une poche hydrophobe formée par les résidus Phe_{52} et Trp_{53}, ce dernier résidu pouvant être stabilisé par une liaison hydrogène avec le résidu His_{186} (entre l'atome $H^{\varepsilon 1}$ du tryptophane et l'atome $N^{\delta 1}$ de l'histidine) et un recouvrement de type π avec le résidu Tyr_{189} ; (iv) l'oxygène de la MetSO pourrait être le site accepteur de liaisons hydrogène avec les hydroxyles des résidus Tyr_{134} et Tyr_{82} et l'atome H^{δ} du résidu Glu_{94} ; (v) le H^{N} de la MetSO pourrait former une liaison hydrogène avec l'atome O^{δ} du résidu Asp_{129}, et la liaison peptidique précédant la MetSO est stabilisée par une interaction hydrophobe avec le résidu Tyr_{197}. Tous ces résidus sont hautement conservés (*Figure I-10*). Enfin, le site actif des MsrA est riche en résidus à chaîne latérale aromatique et donc particulièrement hydrophobe.

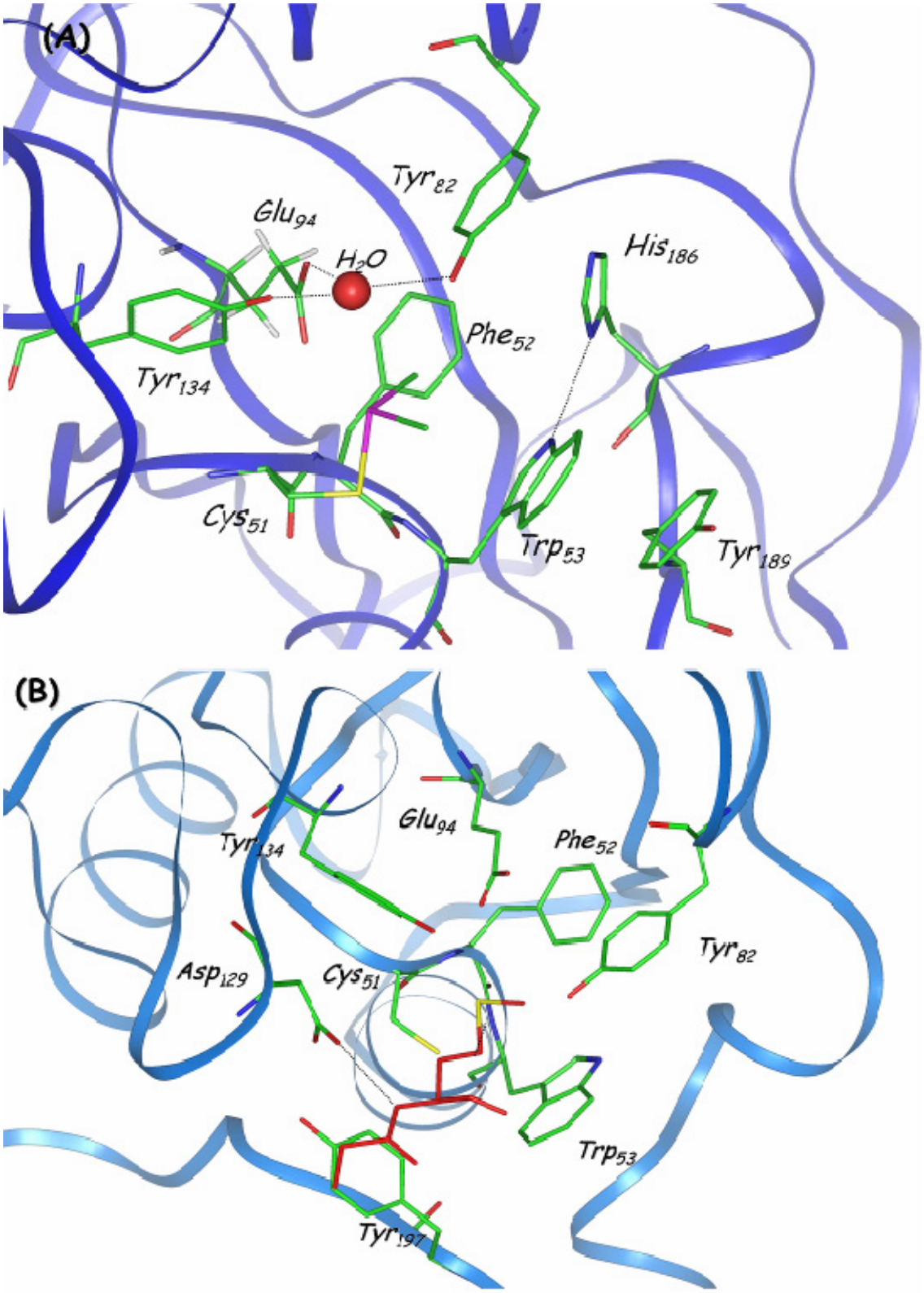


Figure I-11. : ***Conformation du site actif des MsrA d'E. coli et M. tuberculosis déterminée par cristallographie.*** *(A) Site actif de la MsrA d'E. coli ; la cystéine catalytique est sous forme d'adduit diméthyl arsenate. (B) Site actif de la MsrA de M. tuberculosis ; une méthionine d'un monomère voisin est présente dans le site actif (peptide représenté en rouge).*

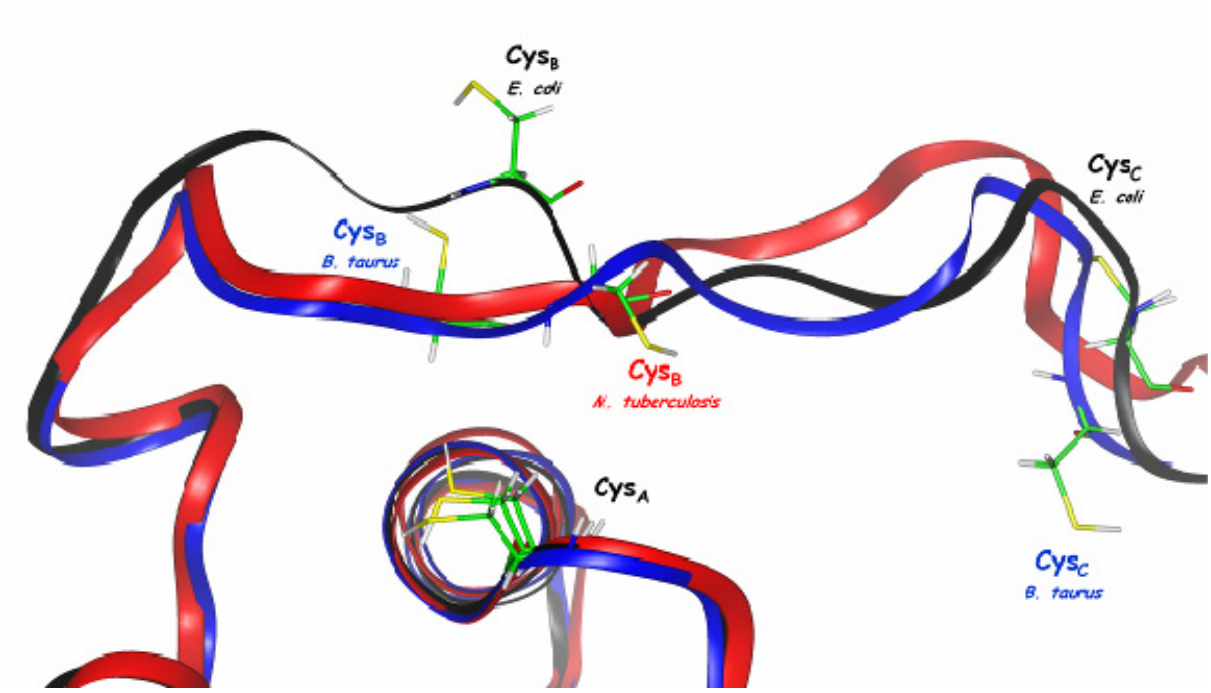


Figure I-12. : ***Positions relatives des cystéines intervenant dans le mécanisme catalytique des MsrA d'E. coli, M. tuberulosisis et B taurus, déterminées par cristallographie.*** *L'alignement du squelette peptidique des structures cristallines de la MsrA d'E. coli en noir, B taurus en bleu et M tuberculosis en rouge montre la position relative des différentes cystéines catalytiques. La position de la cystéine catalytique est identique dans les trois structures. Chez E. coli, la distance entre les C^{β} de Cys_A et Cys_B est de* ***11,2 Å*** *et de* ***21,2 Å*** *entre les C^{β} de Cys_B et Cys_C ; chez B taurus, ces distances sont respectivement de* ***8 Å*** *et* ***19,4 Å.*** *Pour ces deux structures la chaîne latérale de Cys_B est orientée vers le solvant. Chez M. tuberculosis, qui ne possède qu'une cystéine de régénération, la position de Cys_B dans la séquence est décalée d'un résidu vers l'extrémité C-terminale, il en résulte que la chaîne latérale de Cys_B pointe vers le site actif et rapproche les C^{β} des cystéines Cys_A et Cys_B à une distance de* ***6,6 Å****.*

I-1.3.4.2.1.2 Conformation de l'extrémité C-terminale dans les structures cristallines

L'extrémité C-terminale débute au résidu Tyr_{195} et comprend les deux cystéines de recyclage : Cys_{198} (Cys_B) et Cys_{206} (Cys_C). Les études biochimiques et enzymatiques ont montré de manière non ambiguë que le mécanisme catalytique des Msr fait intervenir la formation successive des ponts disulfure Cys_{51}-Cys_{198} et Cys_{198}-Cys_{206} (dans le cas des MsrA à deux cystéines de recyclage). Dés lors, il est surprenant de constater que, dans les trois structures cristallines, les distances entre les C^{β} des cystéines 51 et 198 (mais aussi entre les C^{β} des cystéines 198 et 206 dans le cas des MsrA de *E. coli* et *B. taurus*) sont trop longues pour permettre la formation d'un pont disulfure (*Figure I-12*).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce désaccord entre les structures cristallines et le mécanisme catalytique : (i) l'environnement cristallin conduit à cette conformation non native, on peut alors supposer qu'en solution, ces cystéines sont suffisamment proches pour former un pont disulfure ; (ii) l'extrémité C-terminale est flexible et animée de mouvements

suffisamment importants pour rapprocher les deux cystéines et permettre la formation du pont disulfure. Cette hypothèse est corroborée par la présence de nombreuses glycines dans cette partie de la protéine et par le fait que la densité électronique de cette extrémité n'est pas toujours observable dans la maille cristalline ; (iii) la protéine subit un changement conformationnel lors d'une des étapes du mécanisme catalytique (formation du complexe enzyme/substrat ou de l'intermédiaire acide sulfénique) qui pourrait entraîner le rapprochement des cystéines et la formation d'un pont disulfure. Le résidu Cys_{206} est, lui aussi, trop éloigné du résidu Cys_{198} pour former le second pont disulfure intervenant dans l'activité catalytique. Néanmoins, dans l'hypothèse où la structure cristalline serait représentative de la structure en solution, on peut supposer que la formation du premier pont disulfure engendrerait un changement conformationnel qui rapprocherait la cystéine 206 de la cystéine 198 et permettrait ainsi la formation du second pont disulfure.

I-1.3.4.2.2 Structure en solution

Dans le but de vérifier si la conformation de l'extrémité C-terminale de MsrA dans les structures cristallines est représentative de celle en solution, une étude structurale par RMN a été menée avec la MsrA d'*Erwinia chrysantemii* par Béraud et coll. Cette protéine de 212 acides aminés fait partie de la sous-classe des MsrA à deux cystéines de recyclage et sa séquence montre 76 % d'homologie avec celle de la MsrA d'*E. coli*. Cette étude structurale a été menée grâce à l'utilisation de constantes de couplages dipolaires résiduelles (RDC pour residuals dipolar coupling constants). Cette méthode permet, à partir de l'attribution des raies de résonance des noyaux $^{1}H^{N}$, ^{13}C et ^{15}N de la protéine, d'obtenir, par la mesure des RDC en milieu anisotrope (c'est-à-dire orienté), des contraintes orientationnelles, et ainsi d'aboutir aisément et rapidement à la structure tridimensionnelle en solution de l'objet étudié. Cette méthode, comparée à l'utilisation des contraintes de distance dérivant des effets nOe, est particulièrement bien adaptée à l'étude de protéines de taille importante.

Les auteurs n'ont malheureusement pas déposé la structure de la MsrA d'*E. chrysanthemii* dans la PDB. Ils décrivent néanmoins une structure tridimensionnelle en solution proche des structures cristallines mais où la conformation de l'extrémité C-terminale diffère notablement. En effet, dans cette structure, le soufre de la cystéine 198 pointe vers le site actif, ce qui rapproche les C^{β} des cystéines 51 et 198 à une distance de 8,3 Å (au lieu de 11,2 Å pour la structure cristallographique d'*E. coli* et 8 Å pour celle de *B. taurus*). Cette étude tendrait donc à montrer que la structure des MsrA en solution est certes différente des structures cristallines puisque le soufre de la cystéine catalytique pointe vers le site actif, alors

que dans les structures cristallines des MsrA d'*E. coli* et *B. taurus* le soufre de cette cystéine pointe vers le solvant, mais présente une distance entre les C^{β} des cystéines 51 et 198 peu favorable à la formation d'un pont disulfure.

I-1.4 Conclusion

Depuis ces 25 dernières années, l'étude des Msr s'est révélée intéressante à plus d'un titre. Leur implication dans la prévention du stress oxydant et dans de nombreuses pathologies en a fait un sujet d'étude particulièrement sensible et susceptible d'applications dans le domaine des maladies dégénératives et des phénomènes de vieillissement.

D'un point de vue plus fondamental, leur étude s'est montrée très fructueuse. En effet, au-delà de la compréhension de plus en plus précise de leur mécanisme catalytique, elle a permis la mise en évidence d'un mécanisme catalytique original impliquant un intermédiaire acide sulfénique et la découverte d'un nouveau repliement en ce qui concerne la structure des Msr de classe A. Néanmoins, dans ce domaine, de nombreuses questions subsistent, particulièrement en ce qui concerne le désaccord apparent entre les structures cristallines connues de MsrA et le mécanisme catalytique de ces enzymes. En effet : (i) les structures déterminées jusqu'à présent sont elles représentatives de la structure en solution ? (ii) si c'est le cas, l'extrémité C-terminale des Msr est-elle animée de mouvements suffisamment importants pour permettre le rapprochement des deux cystéines ? (iii) cette protéine subit-elle un changement conformationnel important, lors d'une des étapes du mécanisme catalytique, qui pourrait permettre le rapprochement des cystéines et la formation d'un pont disulfure ?

Pour répondre à ces questions, la résonance magnétique nucléaire est une technique de choix puisqu'elle permet de déterminer la structure tridimensionnelle en solution des biomolécules mais aussi de mesurer la dynamique de ces molécules, ainsi que d'effectuer des études fonctionnelles et physicochimiques.

I-2 La résonance magnétique nucléaire des protéines

La résonance magnétique nucléaire (RMN) se démarque des autres méthodes spectroscopiques (ultraviolet, infrarouge) par sa finesse, sa précision et sa polyvalence. Depuis son invention, elle a subi de nombreuses avancées aussi bien techniques que méthodologiques lui permettant désormais de trouver des applications dans le domaine de la chimie, de la biologie structurale et de la médecine.

La RMN est une technique récente mais certaines avancées scientifiques, ayant favorisé son apparition, lui sont bien antérieures. C'est le cas, entre autres, de la transformée de Fourier inventée par Jean Baptiste Fourier au 18^{éme} siècle et de la découverte de l'électromagnétisme par Maxwell en 1873 (Maxwell, 1873), qui sont des étapes importantes et fondatrices pour le développement de la RMN. Son histoire commence réellement en 1924, quand Wolfgang Pauli met en évidence un « degré de liberté quantique à deux niveaux » associé aux couches électroniques externes des métaux alcalins, ce qui deviendra le principe d'exclusion. En 1925 Kronig, Uhlenbeck et Goudsmit suggèrent que cette propriété est associée à la rotation de l'électron autour de son axe. Enfin, en 1927, Pauli formalise sa théorie et introduit la notion de spin dans les préceptes de la mécanique quantique (Pauli, 1927), le spin étant une propriété intrinsèque de la plupart des particules subatomiques parmi lesquels certains noyaux. En 1937, Isidor Rabi met en évidence la précession du spin nucléaire grâce à son expérience du rayon moléculaire (Rabi, 1937 ; Rabi *et coll.*, 1939) et obtient un prix Nobel en 1944. Quelques années plus tard, en 1946, Purcell et Bloch réalisent la première expérience RMN (Bloch, 1946 ; Bloch *et coll.*, 1946 ; Purcell *et coll.*, 1946) et se partagent le prix Nobel de physique en 1952. En 1951 Arnold, Dharmatti et Packard mettent en évidence le déplacement chimique (Arnold *et coll.*, 1951), la même année Herbert Gutowski observe le couplage spin-spin. La RMN se pratique alors en balayage continu et

trouve des applications commerciales d'analyses chimiques dès 1961 grâce au premier spectromètre commerciale travaillant à une fréquence en ^{1}H de 30 MHz.

Les années 70 voient le développement de la RMN impulsionnelle à transformée de Fourier (dès 1965), Ernst ayant largement contribué à cette innovation majeure. Cette révolution permet l'accumulation du signal en répétant *N* fois la même expérience et en sommant les interférogrammes correspondants. Cette avancée considérable a pour effet de réduire quantitativement le rapport S/N du spectre obtenu après transformée de Fourier, mais surtout ouvre la voie à la RMN multidimensionnelle. En effet, dès 1971, lors d'une école d'été de l'AMPERE en Yougoslavie, Jean Jeener propose l'idée d'une spectroscopie RMN à deux dimensions. Quelques années plus tard, en 1976, Ernst concrétise cette idée et enregistre la première carte bidimensionnelle (Aue *et coll.*, 1976). Pour l'ensemble de ses travaux novateurs en RMN, Ernst recevra un prix Nobel en 1991 (Ernst, 1992).

Avec l'apparition des techniques bidimensionnelles, la RMN dépasse le cadre d'un outil analytique et commence à trouver des applications en médecine, biochimie et biologie structurale. En 1973, commence à se développer l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) grâce à Lauterbur et Mansfield, nobélisés en 2003. En 1985, Kurt Wüthrich publie la première structure d'un peptide en solution (Williamson *et coll.*, 1985) ; il recevra par ailleurs un prix Nobel pour l'ensemble de sa carrière en 2002 (Wuthrich, 2003).

Dans les années 90, Bax et Kay mettent au point la plupart des méthodes qui permettent désormais d'étudier la structure des protéines par RMN. Depuis cette époque la RMN s'est développée de manière exponentielle avec l'apparition des expériences hétéronucléaires à trois, voire quatre, dimensions et la détermination des structures en solution de biomolécules de tailles de plus en plus importantes. La RMN dispose aujourd'hui d'un panel d'outils qui rend son champ d'application quasiment illimité (les principes théoriques de la RMN ne seront pas développés ici ; pour plus de précisions, se référer à l'ouvrage de Ernst *et coll.*, 1987).

I-2.1 Etude RMN d'une protéine de grande taille

L'intérêt de l'étude de la structure tridimensionnelle des biomolécules, et des protéines en particulier, a déjà été développé plus haut. Pour ces raisons, la communauté des spectroscopistes a manifesté une forte volonté d'étudier ces molécules et de déterminer leur structure tridimensionnelle en solution. Le premier spectre RMN d'une protéine a été enregistré dès 1957 par Saunders et coll., il s'agit du spectre 1D protonique de la ribonucléase bovine en solution dans D_2O (Saunders *et coll.*, 1957). Ce spectre, qui présente deux massifs

correspondant aux protons aromatiques et aliphatiques, laisse présager de la difficulté d'étudier ce type de molécules par RMN. En effet, même si des méthodes, permettant de résoudre la structure tridimensionnelle des peptides et des petites molécules, sont apparues dès les années 80, l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines a longtemps été le domaine réservé de la cristallographie. Néanmoins, depuis une vingtaine d'années, des avancées techniques et méthodologiques ont permis la résolution, par RMN, des structures tridimensionnelles en solution de nombreuses protéines.

I-2.1.1 Limites de la technique RMN appliquée à l'étude des protéines

Peptides et protéines ont la même nature chimique. Ce sont des polymères d'acides aminés qui ne diffèrent que par leur taille. En effet, un peptide est un oligomère de 2 à 60 résidus, au-delà on parle de protéine. Cette différence de taille, qui peut paraître une simple question de nomenclature, implique la mise en œuvre de méthodes RMN bien spécifiques et adaptées à la taille de l'objet étudié.

Les peptides font l'objet d'études conformationnelles par RMN depuis les années 80 et les méthodes qui permettent leurs études sont largement utilisées par de nombreuses équipes. L'étude d'un peptide commence généralement par l'attribution des systèmes de spins des différents résidus le constituant grâce à l'exploitation des spectres COSY (COrrelation SpectroscopY) (Aue *et coll.*, 1976 ; Nagayama *et coll.*, 1979) et TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) (Aue *et coll.*, 1976 ; Braunschweiler et Ernst, 1983) qui donnent accès aux fréquences de résonance de chacun des protons de la molécule. L'étape suivante est l'attribution du spectre NOESY 2D (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) (Jeener *et coll.*, 1979) qui va permettre d'estimer les distances inter protoniques grâce à la mesure de l'intensité de l'effet Overhauser nucléaire (nOe, nuclear Overhauser effect), pour aboutir à la structure tridimensionnelle du peptide étudié *via* des protocoles de modélisation moléculaire (Williamson *et coll.*, 1985).

Les méthodes de détermination de structures tridimensionnelles en solution de peptides sont très efficaces et bien adaptées à leur objet d'étude. Les protéines, qui sont des objets de même nature que les peptides, mais de taille nettement plus importante, vont amener ces méthodes à leurs limites. En effet, la taille des protéines va avoir deux conséquences majeures : (i) l'augmentation du temps de corrélation (τ_c) conduit à des vitesses de relaxation R_1 ($1/T_1$) et surtout R_2 ($1/T_2$) des noyaux de la protéine particulièrement rapides. L'augmentation de la vitesse de relaxation transversale (R_2) a pour conséquence un

élargissement des raies de résonance (la largeur à mi-hauteur des raies de résonance étant inversement proportionnelle à T_2) voire une disparition presque totale du signal dans le cas de certaines expériences telles que l'expérience TOCSY ; (ii) le grand nombre de noyaux observables conduit à des cartes bidimensionnelles chargées (de signaux larges) qui seront donc la plupart du temps inexploitables. Pour ces raisons, les méthodes usuelles de la RMN qui sont appliquées aux peptides ne sont pas adaptées, telles qu'elles, à l'étude des protéines. Cependant, la volonté de la communauté des « RMNistes » d'accéder à la structure tridimensionnelle en solution des protéines a abouti à des avancées méthodologiques et techniques et a permis d'ouvrir le champ d'application de la RMN à l'étude des protéines.

I-2.1.2 Méthodologie appliquée à l'étude d'une protéine par RMN

I-2.1.2.1 L'expérience HSQC

Le principal écueil survenant lors de la mise en œuvre d'une expérience RMN sur un échantillon protéique est l'abondance des signaux se recouvrant. Ceci rend la plupart du temps les spectres inexploitables. Un élément de réponse à ce problème est apporté par la spectroscopie bidimensionnelle hétéronucléaire, notamment l'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (Bodenhausen et Ruben, 1980). Cette expérience bidimensionnelle, fondée sur la séquence INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) (Morris et Freeman, 1979), permet l'observation des corrélations A-X avec détection de A, le plus souvent A est le proton et X l'hétéroatome qui le porte (généralement l'azote ^{15}N ou le carbone ^{13}C). Un spectre A-X HSQC présente une corrélation pour chaque groupe A-X aux fréquences de résonance respectives des deux noyaux. Cette expérience présente deux avantages. Le premier est qu'elle permet l'observation de noyaux peu sensibles (tels que le ^{13}C ou le ^{15}N) avec un gain de sensibilité de l'ordre du millier. Le second est l'éclatement du signal protonique dans la dimension de l'hétéroatome, ce qui permet une meilleure lisibilité des informations. Ainsi, dans le cas d'une protéine, chaque corrélation d'un spectre ^{1}H-^{15}N HSQC correspond à un groupement amide, c'est-à-dire à un résidu de la protéine (excepté les quelques groupements amides des chaînes latérales de certains acides aminés). On obtient ainsi une bonne lisibilité du signal de chaque résidu de la protéine (excepté les prolines qui ne possèdent pas de proton amide). Les informations apportées par l'expérience ^{1}H-^{15}N HSQC restent limitées. Cependant, une bonne dispersion du signal sur l'ensemble du spectre indique que les groupements amides se trouvent dans des environnements chimiques bien différenciés et donc que la protéine est bien structurée dans

les conditions d'enregistrement du spectre. Malheureusement cette expérience n'apporte que peu d'autres informations structurales (*Figure I-13*)

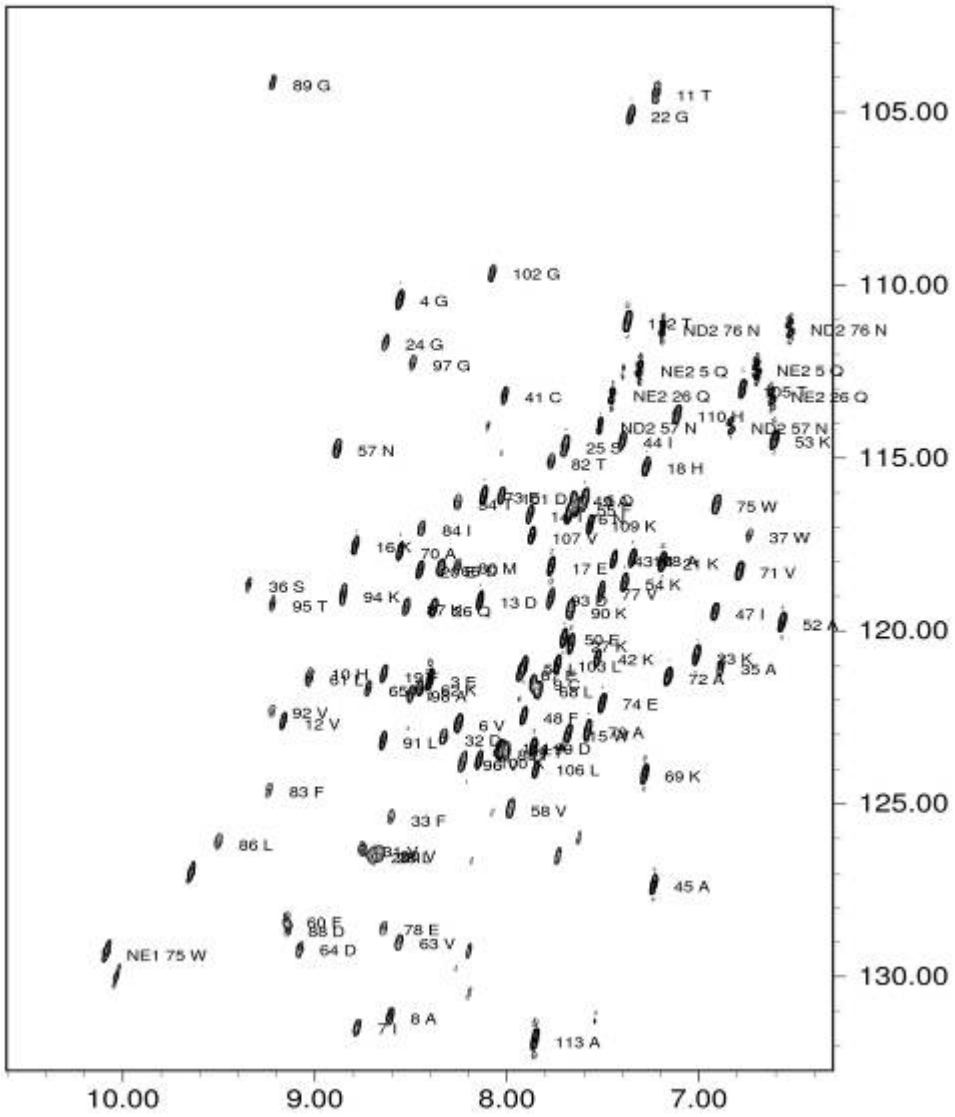


Figure I-13. : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de la thiorédoxine h1 du peuplier, une protéine de 113 résidus, enregistré à 600 MHz et 298 K (Coudevylle et coll., 2004).

I-2.1.2.2 RMN tridimensionnelle hétéronucléaire

L'expérience HSQC permet, idéalement, de séparer les signaux univoques de chaque acide aminé de la protéine mais n'apporte pas d'informations structurales précises. Il faudrait pouvoir associer l'éclatement du signal apporté par l'expérience HSQC aux informations contenues dans les spectres COSY, TOCSY ou NOESY. C'est le principe de la RMN tridimensionnelle qui, en mettant en jeu une troisième dimension, permet d'associer le signal COSY, TOCSY ou NOESY au signal de l'expérience ^{1}H-^{15}N HSQC. On obtient alors une expérience tridimensionnelle, par exemple l'expérience ^{1}H-^{15}N NOESY HSQC, où sont

séparés, dans la dimension de l'azote ^{15}N, les signaux protoniques qui étaient superposés dans l'expérience bidimensionnelle correspondante. Le signal de l'expérience bidimensionnelle homonucléaire est édité dans la dimension de l'azote ^{15}N (Marion *et coll.*, 1989 ; Mueller *et coll.*, 1992). Le spectre obtenu est un cube (*Figure I-14*) qui possède deux dimensions protoniques (ω_1 et ω_3) et une dimension ^{15}N (ω_2). Aux déplacements chimiques δ^N et δ^{HN} d'une corrélation HSQC selon ω_2 et ω_3, on peut observer le signal COSY, TOCSY ou NOESY associé à ce groupe amide selon ω_1.

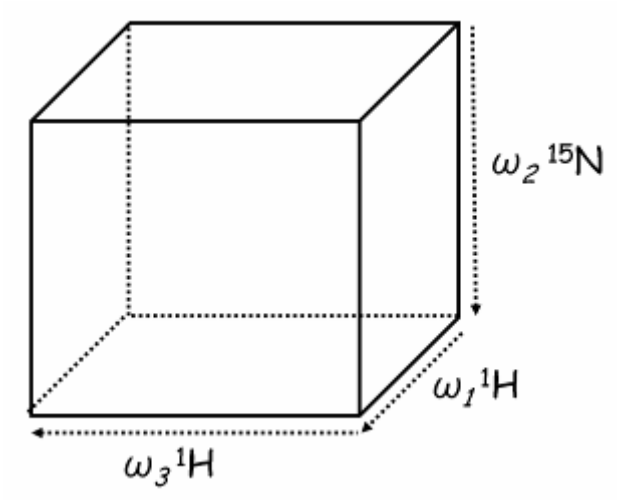


Figure I-14. : ***Principe d'un spectre RMN à trois dimensions.*** *Un spectre RMN à trois dimensions peut être représenté par un cube. Dans le cas d'une expérience éditée ^{15}N, le spectre présente deux dimensions protoniques (ω_1 et ω_3) et une dimension ^{15}N (ω_2).*

Cet ensemble de méthodes permet l'attribution et la détermination de la structure tridimensionnelle en solution de protéines ne dépassant pas 100 résidus. Au-delà, le temps de relaxation transversale (T_2) diminue au point d'annihiler presque complètement le signal des expériences COSY et TOCSY. De plus, un nombre important d'acides aminés de même nature rend l'attribution difficile. L'exploitation de l'expérience ^{1}H-^{15}N NOESY HSQC, qui permet d'aboutir à la structure tridimensionnelle en solution, est alors compromise.

I-2.1.2.3 Attribution du squelette peptidique et des chaînes latérales

L'éclatement, dans une troisième dimension, du signal des expériences bidimensionnelles homonucléaires ne suffit pas pour résoudre la structure en solution de protéines de plus de 100 résidus. Un apport conséquent a été réalisé dans le domaine de l'étude structurale des protéines en remplaçant une dimension protonique par une dimension ^{13}C. Cette innovation ouvrant la voie à de nouvelles méthodes d'études des protéines par RMN.

I-2.1.2.3.1 Attribution séquentielle du squelette peptidique

L'attribution séquentielle consiste à identifier, de manière séquentielle, les raies de résonance des noyaux de chacun des résidus constituant la protéine.

L'expérience HNCA (Ikura *et coll.*, 1990) est l'expérience hétéronucléaire tridimensionnelle la plus représentative des techniques hétéronucléaires permettant l'attribution séquentielle. Sa séquence d'impulsions consiste en une première sous séquence INEPT qui transfère la cohérence du proton $H^N i$ vers l'azote qui le porte N*i* (transfert 1), une seconde sous séquence INEPT transfère l'aimantation de l'azote N*i* vers le $C^\alpha i$ (transfert 2), suivies des séquences rétro INEPT nécessaires pour une détection physique du signal du ^1H. Les constantes de couplage $^1J_{Ni\ C\alpha i}$ et $^2J_{Ni,C\alpha i-1}$ étant très proches (respectivement 11 et 7 Hz), le transfert d'aimantation du N*i* au $C^\alpha i$ est peu spécifique et une partie de l'aimantation est transférée au $C^\alpha i-1$. On obtient un spectre tridimensionnel où ω_3 est la dimension protonique, ω_2 celle de l'azote ^{15}N et ω_1 celle du carbone ^{13}C. Aux déplacements chimiques δ_H, δ_N d'un groupe $H^N i$, N*i*, on observe, dans la dimension du ^{13}C, deux corrélations correspondant aux $C^\alpha i$ et $C^\alpha i-1$. Malheureusement, ces corrélations ne sont pas attribuables. Pour lever cette indétermination, on effectue une expérience complémentaire : l'expérience HN(CO)CA (Brutscher *et coll.*, 1995) où un couple de sous séquences INEPT et retro INEPT supplémentaire permet de transférer la magnétisation de l'azote N*i* vers le C'*i-1* (transfert 2) puis vers le $C^\alpha i-1$ (transfert 3). Le signal du C' n'est pas observable sur le spectre mais

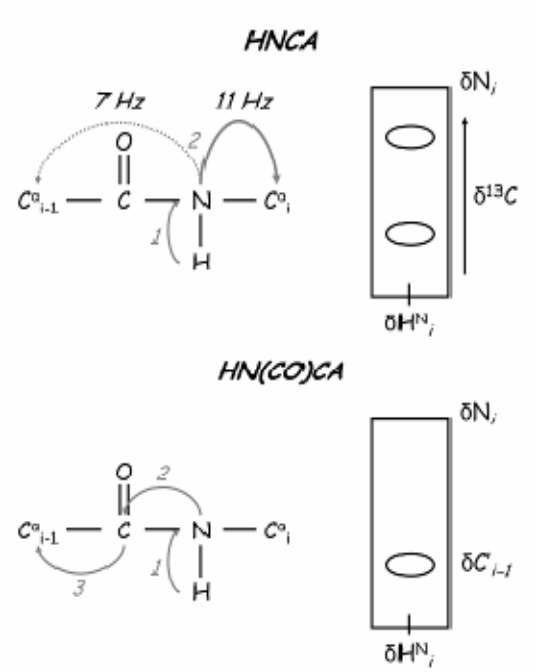


Figure I-15. : Principe du couple d'expériences HNCA/HNCOCA.

l'utilisation du carbone C' comme relais permet d'effectuer des transferts spécifiques du N*i* vers le C^{α}*i-1*. Ainsi, sur le spectre HN(CO)CA, on observe une unique corrélation correspondant au C^{α}*i-1* et, par la comparaison des deux spectres, il devient possible d'attribuer les deux pics de corrélation du spectre HNCA (*Figure I-15*).

Ce couple d'expériences permet d'accéder aux fréquences de résonances de C^{α}*i* et C^{α}*i-1* pour chaque groupe amide du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. L'attribution séquentielle consiste alors à associer le C^{α}*i-1* d'un résidu au C^{α}*i* d'un autre et ainsi de suite, en remontant de manière séquentielle toute la chaîne peptidique. Dans la pratique, ce travail s'effectue en extrayant des bandes (appelées « strips ») dans la dimension du ^{13}C pour chaque groupe amide H^{N}*i*, N*i* du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. Deux difficultés peuvent se présenter : (i) les prolines, ne possédant pas de proton amide, ne donnent pas de signal dans ce type d'expérience ce qui génère une lacune dans l'attribution ; (ii) plus le nombre de résidus est important plus le risque d'ambiguïté d'attribution augmente. Pour pallier à cette dernière difficulté, il existe de

Tableau I-1 : Expériences tridimensionnelles hétéronucléaires classiquement mises en œuvre lors de l'étude d'une protéine par RMN.

	Expérience	***Noyaux observés***	***Taille maximale conseillée de l'échantillon***	***Sensibilité (comparée à l'expérience HNCO) (%)***
Attribution séquentielle du squelette peptidique	HNCO	H^{N}(*i*), N(*i*), C'(*i-1*)	< 20 kDa	100
	HN(CA)CO	H^{N}(*i*), N(*i*), C'(i), C'(*i-1*)	< 20 kDa	13/4
	HNCA	H^{N}(*i*), N(*i*), C^{α}(i), C^{α}(*i-1*)	< 20 kDa	50/15
	HN(CO)CA	H^{N}(*i*), N(*i*), C^{α}(*i-1*)	< 20 kDa	71
	HNCACB/CBCANH[a]	H^{N}(*i*), N(*i*), C^{α}(i), C^{β}(*i*), C^{α}(*i-1*), C^{β}(*i-1*)	< 20 kDa	4/1,7 1,3/0,5
	HN(CO)CACB/CBCA(CO)NH[a]	H^{N}(*i*), N(*i*), C^{α}(*i-1*), C^{β}(*i-1*)	< 20 kDa	13/9
Attribution des chaînes latérales	CC(CO)NH	H^{N}(*i*), N(*i*), C^{ali}(*i-1*)	< 15-20 kDa	
	H(CC)(CO)NH	H^{N}(*i*), N(*i*), H^{ali}(*i-1*)	< 15-20 kDa	
	HNHA	H^{N}(*i*), N(*i*), H^{α}(*i*)	< 20 kDa	
	HCCH-TOCSY	H^{ali}(*i*), C^{ali}(*i*)	< 20 kDa	
	^{1}H-(^{15}N/^{13}C) COSY HSQC	H(*i*), H(*i*)	< 15 kDa	
	^{1}H-(^{15}N/^{13}C) TOCSY HSQC	H(*i*), H(*i*)	< 15 kDa	
	^{1}H-(^{15}N/^{13}C) NOESY HSQC	H(*i*), H(*j*)	< 20 kDa	

[a]Certaines expériences nécessitent d'être adaptées aux échantillons deutérés. Dans le cas de l'expérience CBCANH, l'expérience commence par une impulsion touchant les protons aliphatiques ; cette expérience a été adaptée aux échantillons deutérés en modifiant l'ordre des transferts d'aimantation pour donner l'expérience HNCACB.

nombreuses autres expériences tridimensionnelles hétéronucléaires permettant l'attribution séquentielle. Toutes reposent sur le même principe d'un couple d'expériences où le relais C' (ou C^{α}), imposé dans une expérience, permet d'attribuer le signal d'une autre. Ces couples sont, par exemple, HNCO/HN(CA)CO (Clubb *et coll.*, 1992 ; Ikura *et coll.*, 1990) ou HNCACB/HN(CO)CACB (Grzesiek et Bax, 1992a ; Grzesiek et Bax, 1992b ; Grzesiek et Bax, 1993). Les informations apportées par ces expériences sont résumées dans le tableau I-1.

Ainsi, une ambiguïté rencontrée pour un couple d'expériences peut être levée grâce à un autre couple. L'exploitation de ces expériences aboutit à des séquences de groupes amides (correspondant à une séquence d'acides aminés) (*Figure I-16*). Le déplacement chimique de certains noyaux (particulièrement les C^{α} et les C^{β}) étant spécifique pour chaque type d'acides aminés (*Figure I-17*), il devient aisé de les corréler à la nature chimique du résidu et, au regard de la séquence primaire de la protéine, de placer correctement les enchaînements

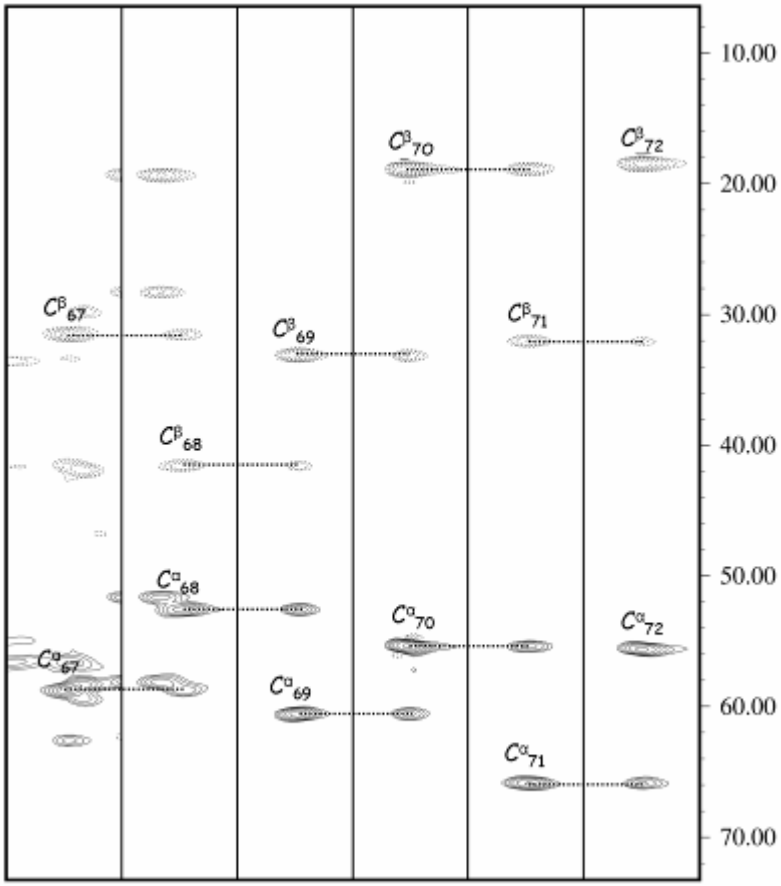


Figure I-16. : Exemple d'attribution : bandes 67 à 72 du spectre CBCANH de la thiorédoxine h1 de peuplier, enregistré à 600 MHz et 298 K (Coudevylle et coll., 2005). *Pour chaque corrélation du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC, l'expérience CBCANH associe quatre corrélations dans la dimension du ^{13}C correspondant aux $C^{\alpha}i$ et $C^{\alpha}i$-1 (contours continus) et $C^{\beta}i$ et $C^{\beta}i$-1 (contours en pointillés) identifiées grâce à l'expérience CBCA(CO)NH. L'association des corrélations i-1 d'une bande avec les corrélations i d'une autre permet d'identifier la séquence $E_{67}LKAVA_{72}$.*

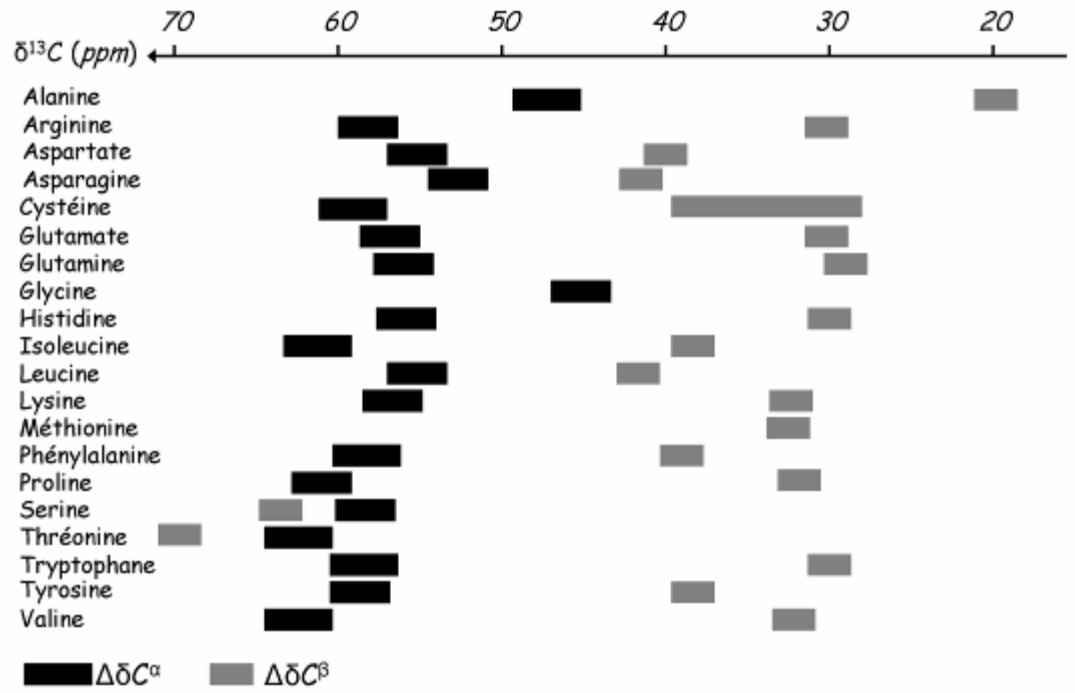


Figure I-17. : Gammes de déplacement chimique des C^{α} et C^{β} des 20 acides aminés (http://www.bmrb.wisc.edu).

partiels de bandes dans la séquence peptidique. Cette étape d'attribution peut être réalisée de manière semi automatique grâce à des logiciels tels que Autoassign (Zimmerman *et coll.*, 1997). Cependant, ces méthodes nécessitent une minutieuse inspection préalable des spectres ainsi qu'une vérification rigoureuse de l'attribution et n'aboutissent que rarement à une attribution complète.

L'attribution séquentielle du squelette peptidique permet : (i) d'attribuer le spectre ^{1}H-^{15}N HSQC, c'est-à-dire identifier à quel résidu de la protéine correspond chaque corrélation du spectre ; (ii) de déterminer les fréquences de résonance des noyaux H^{N}, N, C', C^{α} et C^{β} de ces résidus. Bien que l'attribution du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC soit un préalable nécessaire à de nombreuses études (telles que les études de dynamique, d'interaction ou de cartographie de déplacement chimique), l'attribution du squelette peptidique est nécessaire mais insuffisante pour aboutir à la structure tridimensionnelle en solution de la protéine étudiée. Pour ce faire, il est nécessaire d'attribuer également les raies de résonance des noyaux des chaînes latérales.

I-2.1.2.3.2 Attribution des chaînes latérales

Il existe de nombreuses expériences permettant l'attribution des chaînes latérales. Les expériences H(CC)(CO)NH et CC(CO)NH (Lin et Wagner, 1999) sont similaires aux expériences tridimensionnelles d'attribution du squelette peptidique et permettent d'accéder aux H^{ali}*i-1* et C^{ali}*i-1* du résidu qui précède le groupe H^{N}*i*,N*i*. L'expérience HNHA (Vuister et

Bax, 1993) permet d'obtenir la fréquence de résonance du proton H^{α} d'un résidu. Cette information est cruciale pour pouvoir exploiter l'expérience HCCH-TOCSY (Bax *et coll.*, 1990a ; Bax *et coll.*, 1990b ; Kay *et coll.*, 1990) qui est certainement le meilleur outil pour attribuer les chaînes latérales, en terme de sensibilité comme en terme de lisibilité des informations. En effet, l'expérience HCCH TOCSY, qui est une expérience tridimensionnelle à deux dimensions protoniques et une dimension ^{13}C, permet d'observer les corrélations d'un couple $H^{ali}i$, $C^{ali}i$ avec les autres protons de la chaîne aliphatique du résidu. Cette expérience est particulièrement sensible puisque les constantes de couplage qu'elle met en jeu ($^{1}J_{H-C}$, $^{1}J_{C-C}$) sont importantes. Les délais des sous séquences INEPT sont donc courts, si bien qu'il en résulte une perte d'aimantation moins importante. Les différentes expériences d'attribution des chaînes latérales sont résumées dans le tableau I-1.

L'ensemble de ces méthodes d'attribution du squelette peptidique et des chaînes latérales est particulièrement bien adapté aux contraintes rencontrées lors de l'étude des protéines par RMN. Néanmoins, il est nécessaire de disposer d'échantillons uniformément marqués à l'azote ^{15}N et au carbone ^{13}C (*cf.* Annexe-I pour plus de précisions sur les techniques d'enrichissement isotopique de protéines recombinantes).

I-2.1.2.4 Résolution d'une structure tridimensionnelle en solution

Les étapes d'attribution du squelette peptidique et des chaînes latérales sont un préalable à la résolution d'une structure tridimensionnelle en solution. Cette dernière est déterminée en mettant en jeu plusieurs types d'informations structurales, géométriques et conformationnelles, dans le cadre d'un protocole de modélisation moléculaire.

I-2.1.2.4.1 Contraintes de distance

Les contraintes de distance sont les informations structurales les plus utilisées lors de l'étude conformationnelle d'une macromolécule par RMN. Ces contraintes dérivent de l'estimation des distances entre noyaux proches dans l'espace. La collecte d'un jeu de contraintes de distance, décrivant la position relative de noyaux de la molécule les uns par rapport aux autres, et donc la forme de la molécule dans l'espace, est possible *via* l'exploitation d'expériences basées sur l'effet Overhauser nucléaire.

Cette spectroscopie est fondée sur l'existence d'un couplage direct (interaction dipôle dipôle) entre deux spins spatialement proches. Cette interaction est due aux phénomènes de relaxation croisée et est appelée effet Overhauser nucléaire nOe (nuclear Overhauser effect).

L'intensité de cette effet, notée σ, entre deux noyaux de même nature *i* et *j* distants de *r*, est inversement proportionnelle à r^6 (Neuhaus et Williamson, 1989) :

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6}\left(\tau_{eff} - \frac{6\tau_{eff}}{1+4\omega^2\tau_{eff}^2}\right) \qquad \textit{Eq. I-6}$$

où τ_{eff} est le temps de corrélation effectif de la molécule. On estime généralement que cette effet est nul lorsque *r* est supérieur à 6 Å. Un spectre NOESY montre donc une corrélation pour chaque couple de noyaux distants de moins de 6 Å.

L'attribution des noyaux de la protéine, réalisée grâce aux expériences tridimensionnelles hétéronucléaires décrites précédemment, va permettre l'exploitation des spectres ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC. La mesure de l'intensité des corrélations nOe permet, à partir d'un effet nOe de référence (pour une distance correspondante connue, comme celle entre deux H^β d'un même résidu), de déterminer la distance entre les noyaux à l'origine de la corrélation. En pratique, on estime les distances en les classant en trois catégories de contraintes (pour négliger les erreurs intervenant lors de la mesure) : effet nOe fort (1,5 < r < 3,5 Å), effet moyen (3,5 < r < 4,5 Å) et effet faible (4,5 < r < 6 Å). Les contraintes intra résidus permettent de décrire la conformation du résidu (si tant est qu'il adopte une conformation privilégiée). Les contraintes dites séquentielles (entre résidus distants de moins de 4 résidus dans la séquence peptidique) permettent de décrire les éléments de structures secondaires tels que les hélices α, les brins β et les coudes. Enfin, les contraintes dites à longues distances (entre résidus éloignés dans la séquence peptidique mais spatialement proches) permettent d'orienter les éléments de structures secondaires les uns par rapport aux autres. Plus le jeu de contraintes sera important, meilleure sera la qualité de la structure tridimensionnelle déterminée.

I-2.1.2.4.2 Contraintes angulaires

Dans le cas des peptides, la mesure de certaines constantes de couplage (telles que $^3J_{HN,H\alpha}$ ou $^3J_{H\alpha,H\beta}$), permet, à partir des courbes de Karplus (Karplus, 1959 ; Cung et Marraud, 1982 ; Cung *et coll.*, 1974), de déterminer les angles dièdres φ et χ_1 d'un résidu. En pratique, ces mesures s'effectuent simplement à partir du spectre 1D ^{1}H ou, avec moins de précision, à partir de spectres COSY phasés à double quantum. L'accès aux angles dièdres est particulièrement efficace pour identifier les éléments de structures secondaires et les prendre en compte lors des calculs de modélisation moléculaire.

Dans le cas des protéines, la mesure des constantes de couplage est compromise par le manque de résolution des spectres. Cependant, la fréquence de résonance des noyaux d'un résidu est dépendante de la conformation locale de ce résidu (Wishart et Sykes, 1994b). Il est donc possible de déterminer la conformation locale d'un résidu en comparant le déplacement chimique de ses noyaux avec les valeurs standards mesurées dans des pelotes statistiques (considérées comme ne possédant aucune conformation particulière) (Wishart *et coll.*, 1991). Deux méthodes consensuelles permettent ainsi d'estimer les éléments de structures secondaires d'une protéine : (i) l'index de déplacement chimique (Chemical Shift Index : CSI) (Wishart et Sykes, 1994a) ; (ii) le déplacement chimique secondaire (Secondary Chemical Shift : SCS). Un logiciel nommé TALOS (Cornilescu *et coll.*, 1999a), fonctionnant par homologie de séquence et de déplacement chimique secondaire, permet, à partir des déplacements chimiques des noyaux $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C^{\alpha}$ et $^{13}C^{\beta}$ d'un résidu, de prédire les angles dièdres φ et ψ de ce résidu. Si les dix prédictions faites par TALOS pour un résidu sont en bon accord entre elles, ces valeurs peuvent alors être utilisées comme contraintes dans les protocoles de modélisation moléculaire.

I-2.1.2.4.3 Contraintes orientationnelles et à longues portées

Grâce au logiciel TALOS, les contraintes angulaires peuvent facilement être estimées quelque soit la taille de la protéine pourvu que l'attribution séquentielle ait été réalisée. Ce n'est pas le cas pour les spectres ^{1}H-^{13}C et ^{1}H-^{15}N NOESY HSQC. En effet, au delà d'une masse de 20 kDa (ce qui correspond à environ 180 résidus), l'exploitation des spectres NOESY devient longue et fastidieuse, voire impossible, compte tenu du nombre de raies de résonance et de leur largeur importante.

Pour déterminer la structure tridimensionnelle en solution de protéine de plus de 20 kDa, il a fallu développer un nouveau type de contraintes dont la mesure et la collecte restent réalisables, même pour des protéines de tailles importantes. La catégorie des contraintes orientationnelles répond à ces critères. Leur principe est de mesurer l'orientation d'un vecteur (habituellement défini par deux spins) dans un repère généralement lié à la molécule. Ce type de contraintes peut être mesuré pour les systèmes orientés ou les systèmes paramagnétiques.

En effet, lorsqu'une molécule prend une orientation privilégiée vis-à-vis du champ magnétique, il en résulte un moyennage incomplet des interactions dipolaires. La composante anisotrope de l'interaction dipolaire dépend alors de l'orientation du vecteur internucléaire par rapport au champ. Ce phénomène se traduit par un couplage, appelé couplage dipolaire résiduel (Residual Dipolar Coupling : RDC), qui s'ajoute à la constante de couplage scalaire,

et se manifeste par une contribution résiduelle aux dédoublements des raies de résonance (sans suppression de couplage) et dont la mesure fournit des informations structurales sur l'orientation relative des vecteurs internucléaires. En milieu isotrope, ces interactions sont moyennées et la contribution dipolaire aux couplages est nulle dans la plupart des cas. D'où l'idée de placer les molécules à étudier dans un milieu orienté, donc anisotrope. Ces milieux orientés sont souvent constitués de cristaux liquides ou de phages. Si la molécule étudiée adopte une orientation privilégiée dans ce milieu, une composante dipolaire des couplages va alors apparaître. Ces constantes de couplage sont notées Dij, où i et j sont les noyaux couplés. Différentes constantes de couplage dipolaire résiduel sont ainsi mesurables, telles que $^{1}D_{C',C\alpha}$, $^{1}D_{HN,NH}$ ou $^{2}D_{C',HN}$ dont l'exploitation va aboutir à autant de contraintes orientationnelles pour ces vecteurs (Tjandra et Bax, 1997).

Les systèmes paramagnétiques comprennent les protéines contenant naturellement un métal paramagnétique (comme Co^{2+}) ou sur lesquelles a été fixé une sonde paramagnétique (un chélatant de synthèse dérivant généralement de l'EDTA). La présence d'un centre paramagnétique va avoir plusieurs conséquences : (i) le centre paramagnétique induit une orientation privilégiée de la molécule vis à vis du champ, ce qui rend possible la mesure de RDC (Tolman *et coll.*, 1995) ; (ii) la proximité d'un centre paramagnétique provoque une variation des fréquences de résonance des noyaux. La mesure de ces déplacements chimiques paramagnétiques permet d'en déduire une contrainte de distance à longue portée (inversement proportionnelle à r^3) et une contrainte orientationnelle entre les noyaux perturbés et le centre paramagnétique (Gochin et Roder, 1995) ; (iii) l'interaction Curie-dipolaire qui se manifeste par un couplage qui permet d'aboutir à une contrainte angulaire (Boisbouvier *et coll.*, 1999).

Ces différents types de contraintes sont relativement aisés à mesurer en comparaison de l'effort nécessaire pour l'exploitation des spectres ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC, et ce particulièrement dans le cas de protéines de taille importante. Néanmoins, une valeur de constante de couplage résiduel peut correspondre à plusieurs orientations possibles des vecteurs internucléaires, cette dégénérescence ne pouvant être levée que par la connaissance préalable de la forme globale de la molécule étudiée, c'est-à-dire soit de la structure cristalline soit d'une « pré structure » obtenue par exploitation des effets nOe. Ceci exclut donc la détermination d'une structure tridimensionnelle *de novo* par la simple exploitation de ces contraintes orientationnelles, mis à part dans quelques cas exceptionnels.

I-2.1.2.4.4 Modélisation moléculaire

Ces différents types de contraintes décrivent la structure tridimensionnelle en solution de l'objet étudié. Leur exploitation passe par la mise en œuvre de protocoles de modélisation moléculaire.

Les méthodes de modélisation moléculaire sont des méthodes théoriques, essentiellement basées sur le calcul. Le principe de toute méthode de modélisation moléculaire est d'estimer l'énergie potentielle (E_{pot}) d'une molécule. Ceci est rendu possible grâce à un champ de forces qui décrit l'énergie potentielle d'une molécule à partir des coordonnées cartésiennes de ses atomes, en prenant en compte les différents termes énergétiques (appelés potentiels) dus aux interactions inter atomiques libres ou liées (longueurs de liaison, interactions électrostatiques, etc.) :

$$E_{pot} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{dièdre} + E_{non-liée} \qquad \textit{Eq. I-7}$$

Une fois l'énergie potentielle d'une conformation moléculaire déterminée grâce au champ de force, cette conformation peut être optimisée, grâce à différents algorithmes de mécanique ou de dynamique moléculaire, dans le but d'aboutir à une conformation possédant l'énergie potentielle la plus faible.

Les contraintes expérimentales sont introduites dans ces méthodes sous la forme de potentiels expérimentaux ajoutés aux potentiels théoriques du champ de force :

$$E_{\exp} = E_{nOe} + E_{dièdre} + E_{RDC} \qquad \textit{Eq. I-8}$$

L'objectif d'un protocole de modélisation moléculaire sous contraintes expérimentales est d'obtenir une conformation (ou un ensemble de conformations) présentant l'énergie potentielle minimale et le plus en accord avec les contraintes expérimentales. Un tel protocole met à profit le recuit simulé, un algorithme de dynamique moléculaire. Cet algorithme permet d'explorer tout l'espace conformationnel de la molécule étudiée et de déterminer le nombre minimum de conformations différentes possibles. Son principe est de permettre au système moléculaire de franchir les barrières énergétiques, s'opposant à un changement conformationnel majeur, en lui apportant une énergie cinétique importante sous la forme d'une montée en température. Cette méthode permet de générer un ensemble de structures tridimensionnelles en accord avec les contraintes expérimentales et représentatives des différentes conformations qui peuvent être adoptées par la molécule étudiée. La qualité d'un ensemble de structures se détermine selon trois critères : (i) le rmsd (Root Mean Square Difference), qui traduit la variabilité de la position des atomes dans l'ensemble des structures : on considère qu'un rmsd inférieur à 1 est requis pour qualifier une structure de haute

résolution, bien que ce critère puisse être peu judicieux lorsqu'une protéine possède des zones de flexibilité importante ; (ii) l'analyse des angles de torsion est un critère important, ceux-ci doivent, en effet, se trouver dans les valeurs permises sur le diagramme de Ramachandran. Cependant, dans le cas de boucles, ces valeurs peuvent être violées ; (iii) l'analyse des violations des contraintes est le dernier critère et peut être le plus important. En effet, moins les violations de contraintes sont importantes, plus les structures sont en accord avec les données expérimentales et donc représentatives de la structure réelle.

I-2.1.3 Avancées méthodologiques et technologiques

Les techniques de RMN hétéronucléaires tridimensionnelles ont permis d'augmenter la taille des protéines étudiables. D'autres avancées ont encore fait reculer cette limite.

I-2.1.3.1 Matériel

La RMN est une technique pour laquelle la qualité des données expérimentales est très dépendante de la qualité du matériel utilisé. Des avancées dans le domaine des spectromètres et des sondes ont permis de repousser les limites de la taille des objets étudiables.

I-2.1.3.1.1 Les spectromètres à haut champ

La puissance du champ magnétique est un paramètre capital intervenant dans la qualité d'un spectre, puisque la résolution d'un spectre augmente linéairement avec B_0 et la sensibilité augmente selon $B_0^{3/2}$ (en effet, la différence d'énergie entre les deux orientations possibles des moments magnétiques dans le champ est proportionnelle à B_0). Ainsi, la puissance des aimants n'a cessé d'augmenter, depuis 1962 où les électro-aimants possédaient seulement une puissance maximale de 2,3 T (ce qui correspond à une fréquence protonique d'environ 100 MHz) jusqu'aux cryo-aimants supraconducteurs et l'apparition, en 2002, des premiers spectromètres à 21 T (900 MHz).

La puissance minimale du champ B_0 généralement requise pour l'étude d'une protéine est de 11,7 T (environ 500 MHz), bien que la plupart des équipes de RMN des biomolécules utilisent des spectromètres à 14 T (environ 600 MHz). Les spectromètres à très haut champ tels que ceux à 18,7 T (800 MHz) et 21 T (qui restent peu répandus en France compte tenu de leur coût d'achat et de maintenance) permettent l'étude de biomolécules de taille très élevée ou l'étude de molécules de taille plus raisonnable mais avec une résolution et une sensibilité très confortables.

I-2.1.3.1.2 Les sondes

La sonde joue un rôle central dans la mise en œuvre d'une expérience RMN. Elle permet l'émission des impulsions radiofréquences ainsi que la détection du mouvement de précession du vecteur d'aimantation. La performance d'une sonde va donc avoir une influence majeure sur le bon déroulement de la séquence d'impulsion, en terme de durée optimale et de spécificité des impulsions, mais aussi sur la sensibilité de la mesure. Des avancées techniques considérables ont donc été faites dans ce domaine. On trouve, en effet, des sondes possédant d'une part des bobines spécifiques du carbone ^{13}C et/ou de l'azote ^{15}N, plutôt que des bobines à large bande moins performantes, et d'autre part, douées d'une sensibilité et de performances sans cesse accrues. L'innovation la plus spectaculaire dans ce domaine est la cryosonde dont le principe est de refroidir l'électronique de la sonde (les bobines d'excitation/mesure mais aussi les préamplis) grâce à de l'hélium gazeux froid (à 20 K). Ceci a pour conséquence une diminution significative du bruit électronique. Ces sondes possèdent donc une sensibilité deux à trois fois plus importante que celle des sondes classiques (dites chaudes) ce qui rend possible l'étude de protéines à de faibles concentrations (de l'ordre de 100 µM).

I-2.1.3.2 L'expérience TROSY

Comme mentionné plus haut, la taille des protéines provoque un élargissement des raies de résonance. Cet élargissement, dû à des vitesses de relaxation transversale (R_2) particulièrement rapides associées aux mouvements de rotation moléculaire, est une limitation à l'obtention de spectres suffisamment bien résolus pour permettre leur exploitation.

En 1997, Wüthrich et ses collaborateurs mettent au point une technique de corrélation à deux dimensions, appelée TROSY (Transverse Relaxation Optimised SpectroscopY), permettant d'atténuer l'effet de la relaxation transversale sur la largeur des raies de résonance (Pervushin *et coll.*, 1997). Ce gain de résolution est permis grâce à l'annulation mutuelle des contributions d'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et d'interactions dipolaires de la vitesse de relaxation R_2. Cette annulation est d'autant plus efficace que le champ B_0 est élevé, mais n'est effective que pour les protons amides secondaires et aromatiques (Pervushin *et coll.*, 1998). Un spectre ^{1}H-^{15}N TROSY présente, en effet, des raies de corrélation plus fines que dans un spectre HSQC classique. L'intérêt de cette expérience à l'étude des protéines de grande taille étant évident, la séquence TROSY a été rapidement améliorée (Czisch et Boelens, 1998 ; Schulte-Herbruggen et Sorensen, 2000), et incorporée aux expériences 3D voire 4D, en remplacement de la classique séquence INEPT. La séquence TROSY est désormais incorporée dans les expériences tridimensionnelles hétéronucléaires : HNCO (Yang

et Kay, 1999), HNCA (Salzmann *et coll.*, 1998), HN(CO)CACB (Salzmann, 1999) etc. La séquence TROSY est aussi appliquée à la mesure des temps de relaxation et des effets nOe hétéronucléaires dans les études de dynamique (Kempf *et coll.*, 2003 ; Loria *et coll.*, 1999 ; Zhu *et coll.*, 2000). Ces techniques sont désormais très populaires et ont fait leur preuve en permettant l'étude de protéines de plus grande taille (Tugarinov *et coll.*, 2002) et d'homomultimères protéiques (multimère de 900 kDa) (Fiaux *et coll.*, 2002, *cf.* Fernandez et Wider, 2003 pour une revue).

I-2.1.3.3 La deutération

La vitesse de relaxation transversale (R_2) a une influence directe sur la largeur des raies de résonance, et donc sur la qualité des spectres. Or, les interactions dipolaires contribuent à l'augmentation de la vitesse de relaxation transversale. La deutération consiste à remplacer tout ou partie des protons (^{1}H) d'une molécule par des deutériums (^{2}H ou D) qui possèdent un nombre de spin égal à 1. Cette technique d'enrichissement isotopique n'apporte pas de noyau supplémentaire à détecter mais permet de limiter les interactions dipolaires et contribue donc à diminuer la vitesse de relaxation transversale, ce qui se traduit par des raies de résonance moins larges (Grzesiek *et coll.*, 1993). En effet, en raison du rapport gyromagnétique du noyau deutérium plus faible que celui du proton, les interactions dipolaires entre les spins des noyaux ^{2}H et ceux des autres noyaux ^{13}C ou ^{15}N sont considérablement diminuées. On observe, de plus, une diminution de la diffusion de spin, ces deux facteurs contribuant à une amélioration de la qualité des spectres.

Cette technique est généralement mise à profit pour l'étude de protéines de grande taille (supérieur à 20 kDa). On procède par un enrichissement isotopique grâce à une production bactérienne dans D_2O au lieu de H_2O, puis à un échange des deutériums amides par des protons en lyophilisant l'échantillon et en le resolubilisant dans H_2O. Un tel échantillon, totalement deutéré, permet d'effectuer la plupart des expériences tridimensionnelles hétéronucléaires (un grand nombre de ces expériences ayant été adaptées aux échantillons deutérés qui nécessitent un découplage deutérium) avec un gain de sensibilité et de résolution appréciable, mais ne permet pas d'aboutir à une structure tridimensionnelle qui nécessite la collecte d'un grand nombre d'effets nOe ^{1}H-^{1}H. Un bon compromis à la perdeutération (deutération totale) est la deutération à 50 – 75 % qui permet de compenser la perte de sensibilité due à la diminution du nombre de protons (LeMaster et Richards, 1988), la collecte d'effets nOe restant limitée.

I-2.2 La dynamique des protéines en RMN

Les biomolécules (protéines et acides nucléiques), comme tous les édifices moléculaires en solution, sont animées de mouvements. Ces derniers couvrent une large gamme de fréquences et d'amplitudes, des plus rapides (vibrations des liaisons et oscillations angulaires de l'ordre de la picoseconde) aux plus lents (échange conformationnel ou chimique de l'ordre de la seconde à l'heure). Cette dynamique des biomolécules est souvent associée à leur activité. En effet, dans le cas des protéines, les éléments de structures secondaires sont rigides. Alors que les boucles, qui composent généralement le site actif ou les zones impliquées dans l'activité, présentent des mouvements générant l'adaptabilité conformationnelle nécessaire à la reconnaissance et l'interaction avec le substrat ou un partenaire. Mesurer et comprendre la dynamique d'une protéine permet de mieux comprendre sa logique fonctionnelle et ses propriétés de reconnaissance ou d'interaction.

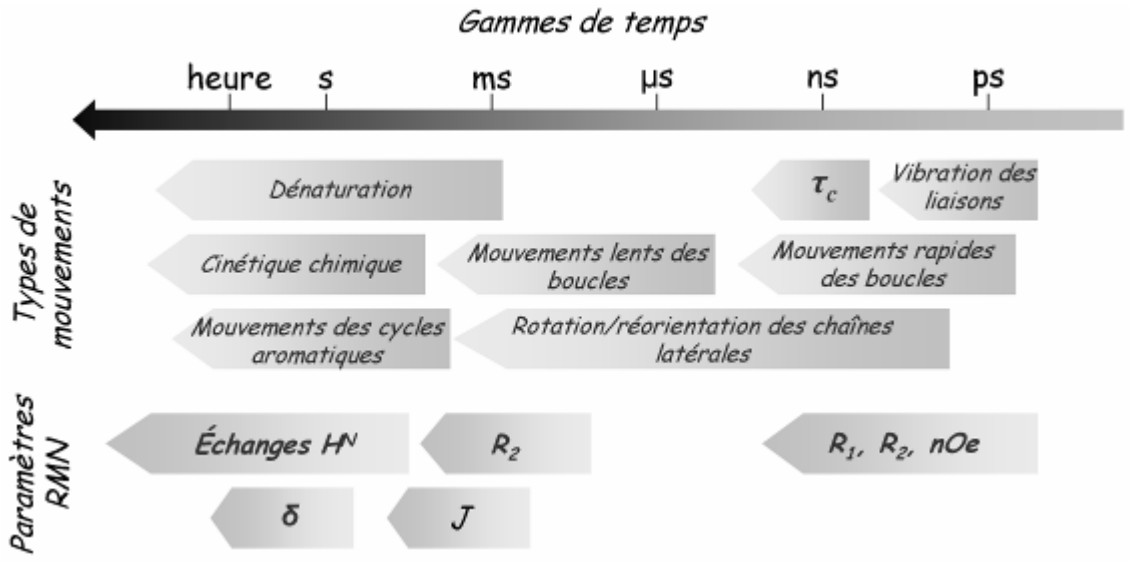


Figure I-18. : ***Gammes de temps des mouvements et phénomènes dynamiques dont sont animées les biomolécules ainsi que les paramètres RMN permettant leurs mesures et études.***

La RMN est un outil particulièrement efficace pour l'étude des phénomènes dynamiques puisqu'elle permet la mesure de paramètres sensibles aux différents types de mouvements moléculaires (*Figure I-18*). L'observation des phénomènes les plus rapides nécessite la mesure des vitesses de relaxation alors que les phénomènes les plus lents sont visibles directement sur le spectre RMN, en particulier dans les situations d'échanges lents.

I-2.2.1 Phénomènes d'échange

Qu'il s'agisse d'échange chimique ou conformationnel, ces phénomènes peuvent être particulièrement lents puisqu'ils ont lieu sur une gamme de temps allant de la milliseconde à

la seconde, voire l'heure (Wang et Palmer, 2003). Dans le cadre de la RMN, ces phénomènes d'échange peuvent être aisément formalisés. En effet, pour une situation où un noyau s'échange entre deux environnements chimiques distincts (états) *A* et *B*, correspondant à deux fréquences de résonance du noyaux : ν_A et ν_B et dont la différence de fréquence est $\Delta\omega$, l'échange est gouverné par les équations :

$$A \underset{k_3}{\overset{k_A}{\rightleftharpoons}} B \qquad \textit{Eq. I-9}$$

On peut définir le temps moyen de résidence dans chaque état τ_A et τ_B, avec :

$$k_A = \frac{1}{\tau_A} \;\; et \;\; k_B = \frac{1}{\tau_B} \qquad \textit{Eq. I-10}$$

La vitesse d'échange k_{ex} est définie par :

$$k_{ex} = k_A + k_B = \frac{1}{\tau_{ex}} \qquad \textit{Eq. I-11}$$

Les populations relatives P_A et P_B des états *A* et *B* sont alors définies par :

$$P_A = \frac{k_A}{k_{ex}} \;\; et \;\; P_B = \frac{k_B}{k_{ex}} \qquad \textit{Eq. I-12}$$

Il existe plusieurs régimes d'échange suivant la valeur de k_{ex} et $\Delta\omega$ (*Figure I-19*)

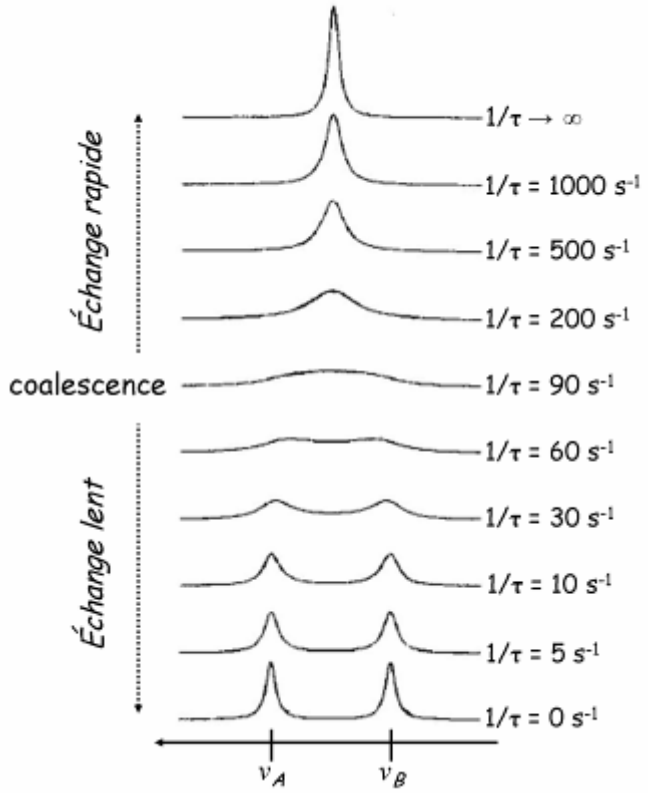


Figure I-19. : Spectres 1D ^{1}H théoriques d'un phénomène d'échange entre deux états A et B en fonction de la vitesse d'échange k_{ex}, pour P_A=P_B et $\Delta\nu$=20Hz, (d'après : Canet et coll., 2002).

I-2.2.1.1 Echange lent

En l'absence d'échange, à chaque état correspond une raie de résonance. Lorsque le système entre en régime d'échange lent, caractérisé par $k_{ex} << \Delta\omega$, les raies de résonance qui correspondes aux états *A* et *B* vont garder leur individualité mais vont s'élargir au fur et à mesure que la vitesse d'échange augmente.

Ce régime d'échange est observé, par exemple, lors d'un échange conformationnel tel que l'isomérie *cis*/*trans* de la liaison peptidique en amont d'une proline (définie par l'angle ω) dans un peptide. On observe alors deux familles de résonance, une correspondant à l'état *cis*, l'autre à l'état *trans*. Par le biais de l'intégration des raies de résonance correspondant à chaque état, les populations relatives de formes *cis* et *trans* peuvent être quantifiées.

I-2.2.1.2 Echange intermédiaire

La largeur des raies de résonance augmente avec k_{ex} jusqu'au cas limite où $k_{ex} \sim \Delta\omega$. Le système entre alors en régime intermédiaire, les raies de résonance vont se confondre en une unique raie large à la fréquence moyenne $P_A.\nu_A + P_B.\nu_B$. Ce phénomène, appelé coalescence, aboutit généralement à une disparition de la raie de résonance. Le signal des résidus les plus intéressants est donc généralement difficile, voire impossible, à observer.

I-2.2.1.3 Echange rapide

Un échange rapide est caractérisé par $k_{ex} >> \Delta\omega$. On observe alors un effet de moyennage sur l'échelle du temps des mesures RMN qui aboutit à un affinement de la raie unique observée pour un échange intermédiaire.

Les phénomènes d'échange lent sont rarement observés dans les protéines ; les phénomènes d'échange intermédiaire sont, par essence, difficilement observable mais sont généralement responsables des lacunes d'attribution lors de l'étude d'une protéine ; les phénomènes d'échange rapide sont eux accessibles à partir de la mesure des vitesses de relaxation.

I-2.2.1.4 Exemple d'échange lent : échange $^1H/^2H$

L'échange $^1H/^2H$ est un exemple d'échange chimique lent, largement mis à profit dans la détermination de structures tridimensionnelles.

Les protons amides du squelette peptidique (et des chaînes latérales de certains acides aminés) ont la propriété de s'échanger avec les protons de l'eau. La vitesse de ce phénomène

d'échange est ralentie si un proton amide est engagé dans une liaison hydrogène et/ou s'il est enfoui dans un environnement hydrophobe, peu accessible au solvant. La mesure de cette vitesse d'échange renseigne sur les protons amides engagés dans une liaison hydrogène et, dans une moindre mesure, sur le repliement de la protéine.

La RMN dispose d'outils permettant de mesurer ces vitesses d'échange, le but de cette démarche étant de déterminer les protons amides engagés dans une liaison hydrogène. Ces mesures facilitent la détermination de la structure en solution par l'ajout de contraintes de distance entre proton donneur et groupe accepteur électronégatif. Le principe de ces expériences est de solubiliser un échantillon lyophilisé de protéine dans D_2O. Les deutériums se comportant chimiquement comme des protons vont s'échanger avec les protons amides de la protéine ; les groupes amides qui s'échangent vont alors disparaître progressivement du spectre. En mesurant l'intensité du signal de chaque proton amide en fonction du temps, on peut déterminer leur constante cinétique d'échange k_m grâce à la relation :

$$I_t = I_0 . \exp(-k_m t) \qquad \textit{Eq. I-13}$$

où I_0 est l'intensité du signal au temps 0. Dans le cas des protéines, l'intensité du signal des groupes amides peut être aisément suivie grâce à des expériences de type ^{1}H-^{15}N HSQC en utilisant un échantillon marqué ^{15}N. La constante cinétique d'échange de chaque proton amide est alors normalisée avec la valeur théorique correspondante pour un acide aminé donné dans une « pelote statistique » (Bai *et coll.*, 1993). Cette conversion aboutit au facteur de protection qui permet de définir les régions de la protéine au sein desquelles l'échange des protons amides est ralenti. La mise en évidence de la présence des liaisons hydrogène à partir de ces données, en dehors des éléments de structure secondaire évidents, est délicate car le groupe électronégatif accepteur n'est *a priori* pas connu. Pour pallier à cette difficulté, des expériences RMN hétéronucléaires utilisant la constante de couplage scalaire existante au travers d'une liaison hydrogène ont été mises au point (Cornilescu *et coll.*, 1999b). Ces expériences corrèlent le proton du site donneur avec le groupe accepteur, levant ainsi toute ambiguïté. Elles sont malheureusement peu sensibles compte tenu de la constante de couplage faible entre proton et groupe accepteur (de l'ordre du Hz) et sont donc difficilement applicables aux protéines.

I-2.2.2 Dynamique des protéines et relaxation

Les paramètres décrivant la dynamique globale et locale d'une protéine peuvent être atteints par la mesure des vitesses de relaxation et du paramètre nOe hétéronucléaire.

I-2.2.2.1 Phénomènes de relaxation

Sous le terme de relaxation sont regroupés les phénomènes responsables du retour à l'équilibre de l'aimantation après une excitation. Les interactions dipolaires et l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) sont à l'origine de la relaxation. En effet ces deux phénomènes créent des champs locaux, fluctuants du fait des mouvements moléculaires. Lorsque la fluctuation des champs locaux correspond aux fréquences de résonance des noyaux, il en résulte une transition entre les différents niveaux d'énergie ce qui dissipe l'énergie et permet le retour à l'équilibre.

Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 d'un noyau X sont gouvernées par les mouvements internes de la liaison H-X et le mouvement global de la protéine. La relaxation transversale R_2 est principalement dominée par les mouvements lents, en particulier les mouvements de réorientation globale de la molécule, qui n'induisent pas de transition, mais font décroître la cohérence entre les spins en faisant varier de façon aléatoire leur fréquence de résonance. Qui plus est, R_2 comprend une composante due à l'échange R_2^{ech} définie telle que :

$$R_2^{obs} = R_2 + R_2^{ech} \qquad \textit{Eq. I-14}$$

La relaxation longitudinale R_1 est, elle, sensible aux mouvements de fréquence intermédiaire.

Le paramètre nOe hétéronucléaire traduit un échange d'aimantation entre deux spins en interaction dipolaire. Lorsque la distance entre les deux spins est connue et constante, comme c'est le cas entre ^{1}H et ^{15}N d'un groupe amide secondaire (~ 1,02 Å), l'effet nOe hétéronucléaire ne dépend plus que du temps de corrélation effectif entre les deux spins, c'est-à-dire de l'amplitude de leur mouvement. L'effet nOe hétéronucléaire est donc la combinaison des vitesses de relaxation longitudinale et de relaxation croisée $R_N(Hz \leftrightarrow Nz)$; il est très sensible aux mouvements rapides.

Ainsi, la mesure des temps de relaxation permet de déterminer l'amplitude et la vitesse des mouvements moléculaires. La mesure des vitesses de relaxation des noyaux ^{15}N est particulièrement judicieuse, puisque les champs locaux fluctuants proviennent principalement des mouvements de réorientation de la liaison H-N. De plus, ce type de noyaux est uniformément réparti le long du squelette peptidique, ce qui en fait une sonde idéale.

I-2.2.2.2 Mesure des vitesses de relaxation et du paramètre nOe

Les vitesses de relaxation sont mesurables grâce à l'enregistrement d'une série d'expériences bidimensionnelles hétéronucléaires de type HSQC. La vitesse de relaxation

transversale est mesurée grâce à une expérience basée sur la séquence CPMG (Carr et Purcell, 1954 ; Meiboom et Gill, 1958) appliquée durant un délai *t* variable. Il existe différentes méthodes pour mesurer la vitesse de relaxation longitudinale. Leur principe est de laisser relaxer l'aimantation des noyaux ^{15}N, selon l'axe z, durant un délai *t* variable. La mesure de l'intensité des corrélations de chaque expérience en fonction de *t* obéit à une monoexponentielle décroissante :

$$I(t) = I_0.\exp(-Rt) \qquad \textit{Eq. I-15}$$

La mesure du paramètre nOe ^{1}H-^{15}N nécessite deux expériences de mesure des effets nOe hétéronucléaires : dans l'une, le proton subit une saturation ; dans l'autre, on effectue une saturation hors résonance pour compenser d'éventuels effets d'échauffement. Le paramètre nOe ^{1}H-^{15}N est calculé en appliquant l'équation :

$$nOe = \frac{I}{I_0} \qquad \textit{Eq. I-16}$$

où I et I_0 représentent respectivement l'intensité des pics de corrélations avec et sans saturation.

Plus la liaison H-N est rigide, moins la perturbation des noyaux ^{1}H affectera la relaxation des spins ^{15}N et plus le paramètre nOe sera proche de 1.

Ces expériences permettent d'accéder aux valeurs de R_1, R_2 et nOe ^{1}H-^{15}N pour chaque groupe amide secondaire du squelette peptidique.

I-2.2.2.3 Analyse des valeurs de relaxation en terme de dynamique

En première lecture, les valeurs expérimentales des vitesses de relaxation et du paramètre nOe apportent des informations sur les mouvements moléculaires. Cependant ces valeurs restent des données brutes et nécessitent d'être traitées pour accéder à des informations dynamiques précises. Pour ce faire, on utilise un modèle décrivant, en un minimum de paramètre, la dynamique des molécules en solution et capable de corréler ces paramètres aux valeurs expérimentales des vitesses de relaxation et du paramètre nOe *via* les densités spectrales (la notion de densité spectrale et l'expression des temps de relaxation en fonction de ces densités ne seront pas abordées ici).

Le modèle le plus utilisé est celui de Lipari et Szabo (Lipari et Szabo, 1982a ; Lipari et Szabo, 1982b) qui doit son succès à un nombre limité de paramètres à ajuster. Son principe est de considérer que les vecteurs NH d'une macromolécule sont soumis à deux types de mouvements indépendants, puisque ayant lieu à des échelles de temps différentes : (i) le mouvement lent de rotation de la molécule dans son ensemble décrit par le temps de

corrélation global τ_c (de l'ordre de la nanoseconde) ; (ii) les mouvements internes locaux, qui sont rapides (dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde) décrits par le paramètre d'ordre S^2, compris entre 0 et 1, représentant la restriction de mouvement d'un vecteur NH (une valeur de 1 représente un mouvement complètement restreint, une valeur de 0 un mouvement non restreint) et le temps de corrélation local τ_e qui représente la vitesse de ces mouvements (*Figure I-20*). Une contribution d'échange à la vitesse de relaxation transversale R_2^{ech}, traduisant les mouvements les plus lents (dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde), peut aussi être extrapolée.

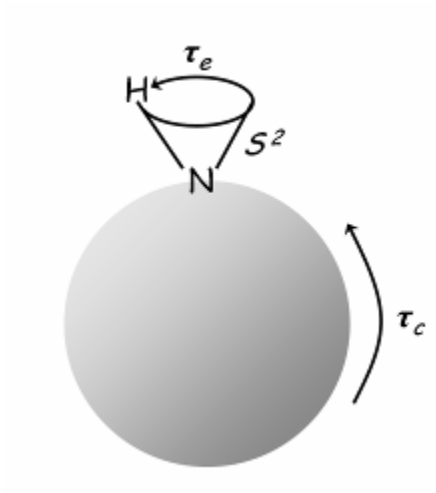


Figure I-20. : Représentation du modèle de mouvements de Lipari-Szabo.

Le formalisme de Lipari et Szabo a été étendu par Clore et ses collaborateurs (Clore *et coll.*, 1990). Ce nouveau modèle considère que les mouvements internes se déroulent sur deux échelles de temps différentes. Il comporte ainsi 5 paramètres : τ_c, S^2_f et τ_f, qui décrivent les mouvements internes rapides et enfin S^2_s et τ_s, qui décrivent les mouvements internes lents. Ce modèle étendu est plus difficile à mettre en œuvre puisqu'il nécessite d'extrapoler 5 valeurs à partir de 3 valeurs expérimentales. Une solution à cette difficulté est de mesurer les valeurs des vitesses de relaxation et du paramètre nOe à aux moins deux valeurs différentes du champs magnétique.

Quelque soit le modèle utilisé, il est nécessaire de déterminer préalablement le temps de corrélation global τ_c. La valeur de τ_c est accessible à partir du rapport R_2/R_1 à condition que : (i) τ_c soit supérieur à 1 ns ; (ii) le temps de corrélation interne soit supérieur à 100 ps ; (iii) les valeurs de R_2 ne soient pas trop surestimées à cause de la contribution d'échange R_2^{ech} (Kay *et coll.*, 1989). Les vecteurs NH remplissant ces conditions sont ceux des résidus faisant partie de structures secondaires. Pour ces vecteurs rigides, S^2 et τ_e sont négligeables et le rapport R_2/R_1 ne dépend plus que du temps de corrélation global.

Les valeurs des vitesses de relaxation et du paramètre nOe, interprétées grâce au formalisme de Lipari et Szabo, permettent d'aboutir au temps de corrélation global ainsi qu'aux paramètre S^2, τ_e et éventuellement R_2^{ech} pour chaque vecteur NH de la protéine. Cette approche permet de décrire les phénomènes dynamiques dont est animée la protéine et éventuellement de les corréler avec ses fonctions et propriétés.

I-2.3 Conclusion

La RMN est une technique relativement récente, mais soumise constamment à des avancées majeures. On lui trouve désormais un large domaine d'applications analytiques et structurales, aussi bien en phase liquide que solide. Dans le domaine de l'étude des biomolécules, les innovations récentes, aussi bien en terme de matériel (spectromètres, sondes) que de méthodes (techniques multidimensionnelles hétéronucléaires, génie génétique), ont permis d'étendre la taille limite des objets pouvant être étudiés. Au delà de l'étude structurale, la RMN offre une variété de méthodes permettant d'observer la dynamique des biomolécules en solution, mais aussi d'étudier, aussi bien qualitativement que quantitativement, les interactions moléculaires et de mesurer des constantes physicochimiques (constante de diffusion, K_D, pKa etc…). Le champ d'application de cette technique expérimentale semble donc presque illimité.

I-3 Objectif des travaux

L'étude des Msr s'est révélée intéressante à plus d'un titre. Leurs implications dans la prévention du stress oxydant et dans de nombreuses pathologies en font un sujet d'étude particulièrement sensible et susceptible d'applications thérapeutiques dans le domaine des maladies dégénératives et des phénomènes de vieillissement.

Cependant, en ce qui concerne les études structurales des Msr de classe A, de nombreuses questions subsistent, particulièrement en ce qui concerne l'adéquation entre les structures connues de MsrA et le mécanisme catalytique de ces enzymes. En effet : (i) les structures déterminées jusqu'à présent sont-elles représentatives de la structure en solution ? (ii) si c'est le cas, l'extrémité C-terminale des Msr est-elle animée de mouvements suffisamment importants pour permettre le rapprochement spontané des deux cystéines ? (iii) cette protéine subit-elle un changement conformationnel, lors d'une des étapes du mécanisme catalytique, qui pourrait permettre le rapprochement des cystéines et la formation d'un pont disulfure ?

Pour répondre à ces questions, la résonance magnétique nucléaire est la méthode idéale puisqu'elle permet la détermination de structures en solution, des études dynamiques et fonctionnelles de protéines. Nous nous proposons donc de déterminer les propriétés structurales, dynamiques et fonctionnelles permettant l'activité catalytique de MsrA et particulièrement la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Pour ce faire, notre système d'étude sera la MsrA d'*Escherichia coli*, ce choix étant justifié par deux raisons : (i) $MsrA^{E.coli}$ ayant déjà fait l'objet d'une étude structurale par diffraction des rayons X, cela nous permettra d'observer précisément les différences conformationnelles entre la structure cristalline et la structure en solution ; (ii) $MsrA^{E.coli}$ appartient à la sous classe des MsrA à deux cystéines de recyclage. Ce travail pourrait ainsi apporter des informations sur la formation du second pont disulfure intervenant lors de l'activité catalytique de cette sous classe de MsrA. Nos objectifs

seront, dans un premier temps, de déterminer la structure tridimensionnelle en solution de la $MsrA^{E.coli}$ sous sa forme réduite ($MsrA^{E.coli}{}_{Red}$) dans le but de confirmer ou d'infirmer la première hypothèse ainsi que d'étudier le comportement dynamique de cette protéine pour confirmer ou infirmer la seconde hypothèse.

L'étude structurale de MsrA d'*Erwinia chrysanthemii*, basée sur l'utilisation de contraintes orientationnelles ayant échoué, il nous sera nécessaire d'effectuer une étude conformationnelle basée sur l'utilisation des contraintes classiques de distances dérivant de la mesure d'effets nOe, ce qui reste d'une grande complexité dans le cas d'une protéine de 211 résidus.

Le cas échéant, nous étudierons d'un point de vue structural et dynamique les intermédiaires catalytiques que sont le complexe enzyme/substrat et l'intermédiaire acide sulfénique dans le but de déterminer si un de ces deux intermédiaires subit un changement conformationnel suffisant pour rapprocher les cystéines 51 et 198. Enfin, l'étude structurale et dynamique de la forme oxydée comprenant le pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} de $MsrA^{E.coli}$ ($MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$) devrait permettre de comprendre la formation du second pont disulfure (entre les cystéines Cys_{198} et Cys_{206}).

Pour réaliser cette étude, le laboratoire dispose d'un accès au spectromètre RMN Bruker DRX 600 MHz, équipé d'une sonde TXI, du Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaire de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 (dans le cadre de l'IFR 111). Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'enzymologie moléculaire, dirigée par le Professeur Guy Branlant du laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire (MAEM, UMR CNRS-UHP 7567). La totalité des échantillons protéiques, utilisés lors de cette étude, ont été produits et préparés par Saïd Azza et Mathias Antoine. Les études dynamiques ont été réalisées en collaboration avec Mr. le Professeur Pierre Mutzenhardt du laboratoire de Méthodologie RMN.

Références Bibliographiques

Abulimiti, A., Qiu, X., Chen, J., Liu, Y., Chang, Z. (2003) Reversible methionine sulfoxidation of Mycobacterium tuberculosis small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidants, *Biochem Biophys Res Commun* ***305***, 87-93.

Anantharamaiah, G. M., Hughes, T. A., Iqbal, M., Gawish, A., Neame, P. J., Medley, M. F., Segrest, J. P. (1988) Effect of oxidation on the properties of apolipoproteins A-I and A-II, *J Lipid Res* ***29***, 309-18.

Antoine, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from Neisseria meningitidis, *J Biol Chem* ***278***, 45352-7.

Arnold, J. T., Dharmatti, S. S., E., P. M. (1951) Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds, *J Chem Phys* ***4***, 507.

Aue, W. P., Bartholdi, E., Ernst, R. R. (1976) Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J Chem Phys* ***64***, 2229-2246.

Babior, B. M. (1999) NADPH oxidase: an update, *Blood* ***93***, 1464-76.

Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins* ***17***, 75-86.

Baldridge, C. W., Gerard, R. W. (1933) The extra respiration of phagocytosis, *Am J Physiol* ***103***, 235-236.

Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., Chock, P. B. (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J Biol Chem* ***274***, 34543-6.

Bauer, C. E., Elsen, S., Bird, T. H. (1999) Mechanisms for redox control of gene expression, *Annu Rev Microbiol* ***53***, 495-523.

Bax, A., Clore, G. M., Driscoll, P. C., Gronenborn, A. M., Ikura, M., Kay, L. E. (1990a) Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of 13C-labeled proteins, *J Magn Reson* ***87***, 620-627.

Bax, A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. (1990b) 1H---1H correlation via isotropic mixing of 13C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning 1H and 13C spectra of 13C-enriched proteins, *J Magn Reson* ***88***, 425-431.

Beraud, S., Bersch, B., Brutscher, B., Gans, P., Barras, F., Blackledge, M. (2002) Direct structure determination using residual dipolar couplings: reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution, *J Am Chem Soc* ***124***, 13709-15.

Beraud, S., Chambost, J. P., Bersch, B., Gans, P., Barras, F., Marion, D. (2001) Backbone H(N), N, Calpha, C' and Cbeta assignment of the 25 kDa peptide methionine sulfoxide reductase from Erwinia chrysanthemi, *J Biomol NMR* ***20***, 97-8.

Biaglow, J. E., Varnes, M. E., Epp, E. R., Clark, E. P., Tuttle, S. W., Held, K. D. (1989) Role of glutathione in the aerobic radiation response, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* ***16***, 1311-4.

Bielski, B. H., Richter, H. W., Chan, P. C. (1975) Some properties of the ascorbate free radical, *Ann N Y Acad Sci* ***258***, 231-7.

Bigelow, D. J., Squier, T. C. (2005) Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 121-34.

Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M. B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin, *Nature* ***425***, 980-4.

Black, S., Harte, E. M., Hudson, B., Wartofsky, L. (1960) A Specific Enzymatic Reduction of L(-) Methionine Sulfoxide and a Related Nonspecific Reduction of Disulfides, *J Biol Chem* ***235***, 2910.

Bloch, F. (1946) Nuclear Induction, *Phys. Rev.* ***70***, 460–474.

Bloch, F., Hansen, W. W., Packard, M. (1946) Nuclear Induction, *Phys. Rev.* ***69***, 127.

Bodenhausen, G., Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* ***69***, 185.

Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity, *Curr Opin Immunol* ***12***, 64-76.

Boisbouvier, J., Gans, P., Blackledge, M., Brutscher, B., Marion, D. (1999) Long-Range Structural Information in NMR Studies of Paramagnetic Molecules from Electron Spin-Nuclear Spin Cross-Correlated Relaxation, *J Am Chem Soc* ***121***, 7700-7701.

Bonizzi, G., Piette, J., Merville, M. P., Bours, V. (2000) Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1, *Biochem Pharmacol* ***59***, 7-11.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. (2001) E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide, *Protein Sci* ***10***, 2272-9.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli, *J Biol Chem* ***275***, 35908-13.

Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., Branlant, G. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 231-8.

Braunschweiler, L., Ernst, R. R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *J Magn Reson* ***53***, 521-528.

Brot, N., Weissbach, H. (1991) Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins, *Biofactors* ***3***, 91-6.

Brot, N., Weissbach, L., Werth, J., Weissbach, H. (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***78***, 2155-8.

Brutscher, B., Cordier, F., Simorre, J.-P., Caffrey, M., Marion, D. (1995), *J Biomol NMR* ***5***, 202-206.

Bulteau, A. L., Petropoulos, I., Friguet, B. (2000) Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis, *Exp Gerontol* ***35***, 767-77.

Burnett, A. L., Lowenstein, C. J., Bredt, D. S., Chang, T. S., Snyder, S. H. (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection, *Science* ***257***, 401-3.

Caldwell, P., Luk, D. C., Weissbach, H., Brot, N. (1978) Oxidation of the methionine residues of Escherichia coli ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***75***, 5349-52.

Canet, D., Boubel, D., Canet Soulas, E.: La RMN. Concepts, méthodes et applications, 2e edn. Paris: Dunod; 2002.

Carr, H. Y., Purcell, E. M. (1954) Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments, *Phys Rev* ***94***, 630-638.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* ***59***, 527-605.

Clemens, M. R., Waller, H. D. (1987) Lipid peroxidation in erythrocytes, *Chem Phys Lipids* ***45***, 251-68.

Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M. (1990) Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear 15N-1H NMR spectroscopy, *Biochemistry* ***29***, 7387-401.

Clubb, R. T., Thanabal, V., Wagner, G. (1992) A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue 1HN, 15N, and 13C' chemical shifts in 15N---13C-labelled proteins, *J Magn Reson* ***97***, 213-217.

Commoner, B., Townsend, J., Pake, G. E. (1954) Free radicals in biological materials, *Nature* ***174***, 689-91.

Coon, M. J., Ding, X. X., Pernecky, S. J., Vaz, A. D. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions, *Faseb J* ***6***, 669-73.

Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A. (1999a) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J Biomol NMR* ***13***, 289-302.

Cornilescu, G., Hu, J.-S., Bax, A. (1999b) Identification of the Hydrogen Bonding Network in a Protein by Scalar Couplings, *J Am Chem Soc* ***121***, 2949-2950.

Coudevylle, N., Thureau, A., Hemmerlin, C., Gelhaye, E., Jacquot, J. P., Cung, M. T. (2004) 1H, 13C and 15N resonance assignment of the reduced form of thioredoxin h1 from Poplar, a CPPC active site variant, *J Biomol NMR* ***30***, 229-30.

Coudevylle, N., Thureau, A., Hemmerlin, C., Gelhaye, E., Jacquot, J. P., Cung, M. T. (2005) Solution structure of a natural CPPC active site variant, the reduced form of thioredoxin h1 from poplar, *Biochemistry* ***44***, 2001-8.

Cung, M. T., Marraud, M. (1982) Conformational dependence of the vicinal proton coupling constant for the Ca-Cb bond in peptides, *Biopolymers* ***21***, 953-967.

Cung, M. T., Marraud, M., Neel, J. (1974) Experimental calibration of a Karplus relationship in order to study the conformations of peptides by nuclear magnetic resonance, *Macromolecules* ***7***, 606-13.

Czisch, M., Boelens, R. (1998) Sensitivity enhancement in the TROSY experiment, *J Magn Reson* ***134***, 158-60.

Davies, K. J., Delsignore, M. E., Lin, S. W. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, *J Biol Chem* ***262***, 9902-7.

Davies, M. J. (1996) Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage, *Arch Biochem Biophys* ***336***, 163-72.

Davies, M. J. (2005) The oxidative environment and protein damage, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 93-109.

Davis, D. A., Newcomb, F. M., Moskovitz, J., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Kaufman, J., Fales, H. M., Levine, R. L., Yarchoan, R. (2000) HIV-2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulphoxide reductase, *Biochem J* ***346 Pt 2***, 305-11.

Denninger, J. W., Marletta, M. A. (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway, *Biochim Biophys Acta* ***1411***, 334-50.

Devasagayam, T. P., Steenken, S., Obendorf, M. S., Schulz, W. A., Sies, H. (1991) Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen, *Biochemistry* ***30***, 6283-9.

Dhandayuthapani, S., Blaylock, M. W., Bebear, C. M., Rasmussen, W. G., Baseman, J. B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in Mycoplasma genitalium, *J Bacteriol* ***183***, 5645-50.

Douglas, T., Daniel, D. S., Parida, B. K., Jagannath, C., Dhandayuthapani, S. (2004) Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of Mycobacterium smegmatis within macrophages, *J Bacteriol* ***186***, 3590-8.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* ***82***, 47-95.

Ejiri, S. I., Weissbach, H., Brot, N. (1979) Reduction of methionine sulfoxide to methionine by Escherichia coli, *J Bacteriol* ***139***, 161-4.

Ejiri, S. I., Weissbach, H., Brot, N. (1980) The purification of methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli, *Anal Biochem* ***102***, 393-8.

Elfarra, A. A., Krause, R. J. (2005) Potential roles of flavin-containing monooxygenases in sulfoxidation reactions of l-methionine, N-acetyl-l-methionine and peptides containing l-methionine, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 183-9.

Ernst, R. R. (1992) Nobel Lecture. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy, *Biosci Rep* ***12***, 143-87.

Ernst, R. R., Bodenhausen, G., Wokaun, A.: Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. New York: Oxford University Press; 1987.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radic Biol Med* ***13***, 341-90.

Etienne, F., Spector, D., Brot, N., Weissbach, H. (2003) A methionine sulfoxide reductase in Escherichia coli that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide, *Biochem Biophys Res Commun* ***300***, 378-82.

Ezraty, B., Aussel, L., Barras, F. (2005) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 221-9.

Fernandez, C., Wider, G. (2003) TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules, *Curr Opin Struct Biol* ***13***, 570-80.

Fiaux, J., Bertelsen, E. B., Horwich, A. L., Wuthrich, K. (2002) NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex, *Nature* ***418***, 207-11.

Gabbita, S. P., Aksenov, M. Y., Lovell, M. A., Markesbery, W. R. (1999) Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain, *J Neurochem* ***73***, 1660-6.

Galter, D., Mihm, S., Droge, W. (1994) Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1, *Eur J Biochem* ***221***, 639-48.

Gao, J., Yao, Y., Squier, T. C. (2001) Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex, *Biophys J* ***80***, 1791-801.

Gao, J., Yin, D. H., Yao, Y., Sun, H., Qin, Z., Schoneich, C., Williams, T. D., Squier, T. C. (1998) Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation, *Biophys J* ***74***, 1115-34.

Garrison, M. W. (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, *Chem Rev* ***87***, 381-398.

Gerzer, R., Bohme, E., Hofmann, F., Schultz, G. (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper, *FEBS Lett* ***132***, 71-4.

Glaser, C. B., Yamin, G., Uversky, V. N., Fink, A. L. (2005) Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 157-69.

Gochin, M., Roder, H. (1995) Protein structure refinement based on paramagnetic NMR shifts: applications to wild-type and mutant forms of cytochrome c, *Protein Sci* ***4***, 296-305.

Gow, A. J., Stamler, J. S. (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions, *Nature* ***391***, 169-73.

Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., Barras, F. (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase, *J Biol Chem* ***276***, 48915-20.

Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K. J. (1996) Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome, *J Biol Chem* ***271***, 15504-9.

Grzesiek, S., Anglister, J., Ren, H., Bax, A. (1993) Carbon-13 line narrowing by deuterium decoupling in deuterium/carbon-13/nitrogen-15 enriched proteins. Application to triple resonance 4D J connectivity of sequential amides, *J Am Chem Soc* ***115***, 4369-4370.

Grzesiek, S., Bax, A. (1992a) Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR, *J Am Chem Soc* ***114***, 6291-6293.

Grzesiek, S., Bax, A. (1992b) An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins, *J Magn Reson* ***99***, 201-207.

Grzesiek, S., Bax, A. (1993), *J Biomol NMR* ***3***, 185-204.

Gutteridge, J. M., Halliwell, B. (1992) Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge, *Free Radic Biol Med* ***12***, 93-5.

Haddad, J. J. (2004) Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways, *Biochem Biophys Res Commun* ***316***, 969-77.

Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing, *Blood* ***92***, 3007-17.

Hansel, A., Heinemann, S. H., Hoshi, T. (2005) Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 239-47.

Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol* ***11***, 298–300.

Harman, D. (1981) The Aging Process, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***78***, 7124-7128.

Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F., Barras, F. (1999) The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a

virulence determinant of the plant pathogen Erwinia chrysanthemi, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***96***, 887-92.

Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochim Biophys Acta* ***1504***, 196-219.

Hehner, S. P., Breitkreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M. L., Droge, W. (2000) Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool, *J Immunol* ***165***, 4319-28.

Hiller, K. O., Masloch, B., Goebl, M., Asmus, D. K. (1981) Mechanism of the hydroxyl radical induced oxidation of methionine in aqueous solution, *J Am Chem Soc* ***103***, 2734-2743.

Ignarro, L. J., Kadowitz, P. J. (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* ***25***, 171-91.

Ikura, M., Kay, L. E., Bax, A. (1990) A novel approach for sequential assignment of 1H, 13C, and 15N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin, *Biochemistry* ***29***, 4659-67.

Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J Chem Phys* ***71***, 4546-4553.

Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F. L., Kutchukian, P. S., Musah, R. A., Wink, D. A., Grisham, M. B. (2001) Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo, *J Biol Chem* ***276***, 28799-805.

Karplus, M. (1959) Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments, *J Phys Chem* ***30***, 11-15.

Kauffmann, B., Aubry, A., Favier, F. (2005) The three-dimensional structures of peptide methionine sulfoxide reductases: current knowledge and open questions, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 249-60.

Kay, L. E., Ikura, M., Bax, A. (1990) Proton-Proton Correlation via Carbon-Carbon Couplings: A Three-Dimensional NMR Approach for the Assignment of Aliphatic Resonances in Proteins Labeled with Carbon- 13, *J Am Chem Soc* ***112***, 888-889.

Kay, L. E., Torchia, D. A., Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by 15N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease, *Biochemistry* ***28***, 8972-9.

Kempf, J. G., Jung, J. Y., Sampson, N. S., Loria, J. P. (2003) Off-resonance TROSY (R1 rho - R1) for quantitation of fast exchange processes in large proteins, *J Am Chem Soc* ***125***, 12064-5.

Koppenol, W. H. (2001) The Haber-Weiss cycle--70 years later, *Redox Rep* ***6***, 229-34.

Kryukov, G. V., Gladyshev, V. N. (2002) Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatics methods, *Methods Enzymol* ***347***, 84-100.

Kuge, S., Jones, N. (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides, *Embo J* ***13***, 655-64.

Lawrence, D. A., Loskutoff, D. J. (1986) Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants, *Biochemistry* ***25***, 6351-5.

LeMaster, D. M., Richards, F. M. (1988) NMR sequential assignment of Escherichia coli thioredoxin utilizing random fractional deuteriation, *Biochemistry* ***27***, 142-50.

Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E. R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage, *Mech Ageing Dev* ***107***, 323-32.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., Stadtman, E. R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***93***, 15036-40.

Lin, Y., Wagner, G. (1999) Efficient side-chain and backbone assignment in large proteins: application to tGCN5, *J Biomol NMR* ***15***, 227-39.

Lipari, G., Szabo, A. (1982a) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity, *J Am Chem Soc* ***104***, 4546-4559.

Lipari, G., Szabo, A. (1982b) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results, *J Am Chem Soc* ***104***, 4559-4570.

Loria, J. P., Rance, M., Palmer, A. G., 3rd (1999) A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins, *J Biomol NMR* ***15***, 151-5.

Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., Matthews, B. W. (2000) Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme, *Biochemistry* ***39***, 13307-12.

Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., Matthews, B. W. (2002) The mirrored methionine sulfoxide reductases of Neisseria gonorrhoeae pilB, *Nat Struct Biol* ***9***, 348-52.

Marion, D., Driscoll, P. C., Kay, L. E., Wingfield, P. T., Bax, A., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. (1989) Overcoming the overlap problem in the assignment of 1H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear 1H-15N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta, *Biochemistry* ***28***, 6150-6.

Mary, J., Vougier, S., Picot, C. R., Perichon, M., Petropoulos, I., Friguet, B. (2004) Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins, *Exp Gerontol* ***39***, 1117-23.

Maxwell, J. C. (1873) Electricity and Magnetism, *Oxford University Press, London*.

Meiboom, S., Gill, D. (1958) Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times, *Review of Scientific Instruments* ***29***, 688-691.

Miller, B. L., Kuczera, K., Schoeneich, C. (1998) One-Electron Photooxidation of N-Methionyl Peptides. Mechanism of Sulfoxide and Azasulfonium Diastereomer Formation through Reaction of Sulfide Radical Cation Complexes with Oxygen or Superoxide, *J Am Chem Soc* ***120***, 3345-3356.

Morris, G. A., Freeman, R. (1979) Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer, *J Am Chem Soc* ***101***, 760.

Moskovitz, J. (2005) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 213-9.

Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S., Stadtman, E. R. (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***98***, 12920-5.

Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M., Stadtman, E. R. (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***94***, 9585-9.

Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M., Stadtman, E. R. (1998) Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in Saccharomyces cerevisiae and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***95***, 14071-5.

Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., Stadtman, E. R. (2000) Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity, *J Biol Chem* ***275***, 14167-72.

Mueller, L., Campbell-Burk, S., Domaille, P. (1992) 15N-correlated three-dimensional relayed NOESY experiments in uniformly 15N-labeled proteins, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* ***96***, 408-415.

Nagayama, K., Kumar, A., Wüthrich, K., Ernst, R. R. (1979) Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy, *J Magn Reson* ***40***, 321-334.

Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K., Yodoi, J. (1994) Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide, *Immunol Lett* ***42***, 75-80.

Neuhaus, D., Williamson, M. P.: The Nuclear Overhauser Efect in Structural and Conformational Analysis. New York: VCH; 1989.

Nishikimi, M., Yamada, H., Yagi, K. (1980) Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate, *Biochim Biophys Acta* ***627***, 101-8.

Oberley, L. W. (1988) Free radicals and diabetes, *Free Radic Biol Med* ***5***, 113-24.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2004) Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from Neisseria meningitidis, *Biochemistry **43***, 11616-22.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from Neisseria meningitidis, *J Biol Chem **277***, 12016-22.

Packer, L. (1991) Protective role of vitamin E in biological systems, *Am J Clin Nutr **53***, 1050S-1055S.

Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J. (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic Biol Med **19***, 227-50.

Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation, *Biochem Biophys Res Commun **153***, 1251-6.

Panzenbock, U., Stocker, R. (2005) Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins, *Biochim Biophys Acta **1703***, 171-81.

Parks, D. A., Granger, D. N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology, *Acta Physiol Scand Suppl **548***, 87-99.

Pauli, W. (1927) Zur Quantenmechanik des magnetischen Elektrons, Z, *Z. Phys*.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K. (1997) 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.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K. (1998) Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy (TROSY) for NMR Studies of Aromatic Spin Systems in 13C-Labeled Proteins, *J. Am. Chem. Soc. **120***, 6394-6400.

Petropoulos, I., Friguet, B. (2005) Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases, *Biochim Biophys Acta **1703***, 261-6.

Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M., Friguet, B. (2001) Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging, *Biochem J **355***, 819-25.

Pianzzola, M. J., Soubes, M., Touati, D. (1996) Overproduction of the rbo gene product from Desulfovibrio species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in Escherichia coli, *J Bacteriol **178***, 6736-42.

Porque, P. G., Baldesten, A., Reichard, P. (1970) The Involvement of the Thioredoxin System in the Reduction of Methionine Sulfoxide and Sulfate, *J Biol Chem **245***, 2371-2374.

Purcell, E. M., Torrey, H. C., Pound, R. V. (1946) Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid, *Phys. Rev.* ***69***, 37–38.

Rabi, I. I. (1937) Space Quantization in a Gyrating Magnetic Field, *Phys. Rev.* ***51***, 652.

Rabi, I. I., Millman, S., Kusch, P., Zacharias, J. R. (1939) The Molecular Beam Resonance Method for Measuring Nuclear Magnetic Moments The Magnetic Moments of 3Li6, 3Li7 and 9F19, *Phys. Rev.* ***55***, 526–535.

Rahman, M. A., Moskovitz, J., Strassman, J., Weissbach, H., Brot, N. (1994) Physical map location of the peptide methionine sulfoxide reductase gene on the Escherichia coli chromosome, *J Bacteriol* ***176***, 1548-9.

Rahman, M. A., Nelson, H., Weissbach, H., Brot, N. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene, *J Biol Chem* ***267***, 15549-51.

Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., Grune, T. (1998) Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem J* ***335 (Pt 3)***, 637-42.

Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M. L., Joiner, M. L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Iverson, L., Wu, C. F., et al (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***99***, 2748-53.

Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H., Wuthrich, K. (1998) TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***95***, 13585-90.

Salzmann, M. W., G.; Pervushin, K.; Senn, H.; Wuthrich, K. (1999) TROSY-type Triple-Resonance Experiments for Sequential NMR Assignments of Large Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* ***121***, 844-848.

Saunders, M., Wishnia, A., Kirkwood, J. G. (1957) The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease, *J Am Chem Soc*.

Schoeneich, C., Aced, A., Asmus, D. K. (1993) Mechanism of oxidation of aliphatic thioethers to sulfoxides by hydroxyl radicals. The importance of molecular oxygen, *J Am Chem Soc* ***115***, 11376-11383.

Schoneich, C. (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 111-9.

Schulte-Herbruggen, T., Sorensen, O. W. (2000) Clean TROSY: compensation for relaxation-induced artifacts, *J Magn Reson* ***144***, 123-8.

Sekiguchi, M., Tsuzuki, T. (2002) Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention, *Oncogene* ***21***, 8895-904.

Shaw, P. X. (2004) Rethinking oxidized low-density lipoprotein, its role in atherogenesis and the immune responses associated with it, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* ***52***, 225-39.

Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense, *Eur J Biochem* ***215***, 213-9.

Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radic Biol Med* ***27***, 916-21.

Sigalov, A. B., Stern, L. J. (2001) Oxidation of methionine residues affects the structure and stability of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein particles, *Chem Phys Lipids* ***113***, 133-46.

Stadtman, E. R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N. B., Levine, R. L. (2005) Methionine oxidation and aging, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 135-40.

Stohs, S. J., Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic Biol Med* ***18***, 321-36.

Storz, G., Tartaglia, L. A., Ames, B. N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation, *Science* ***248***, 189-94.

Sun, H., Gao, J., Ferrington, D. A., Biesiada, H., Williams, T. D., Squier, T. C. (1999) Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase, *Biochemistry* ***38***, 105-12.

Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., Kamata, T. (2000) Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species, *J Biol Chem* ***275***, 13175-8.

Szatrowski, T. P., Nathan, C. F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, *Cancer Res* ***51***, 794-8.

Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N. G., Wehr, N., Moss, J., Levine, R. L. (2000) Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity, *J Biol Chem* ***275***, 27258-65.

Taha, M. K., Marchal, C. (1990) Conservation of Neisseria gonorrhoeae pilus expression regulatory genes pilA and pilB in the genus Neisseria, *Infect Immun* ***58***, 4145-8.

Tamburro, A., Allocati, N., Masulli, M., Rotilio, D., Di Ilio, C., Favaloro, B. (2001) Bacterial peptide methionine sulphoxide reductase: co-induction with glutathione S-transferase during chemical stress conditions, *Biochem J* ***360***, 675-81.

Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., Hart, P. J. (2003) Structure of Mycobacterium tuberculosis methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine, *J Bacteriol* ***185***, 4119-26.

Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., Aubry, A. (2000) Crystal structure of the Escherichia coli peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 A resolution, *Structure Fold Des* ***8***, 1167-78.

Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P., Craven, C. J. (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones, *Nat Struct Biol* ***8***, 701-4.

Thureau, A., Olry, A., Coudevylle, N., Azza, S., Boschi-Muller, S., Branlant, G., Cung, M. T. (2004) 1H, 13C and 15N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from Neisseria meningitidis, *J Biomol NMR* ***30***, 223-4.

Tjandra, N., Bax, A. (1997) Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium, *Science* ***278***, 1111-4.

Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A., Prestegard, J. H. (1995) Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* ***92***, 9279-83.

Travis, J., Beatty, K., Wong, P. S., Matheson, N. R. (1980) Oxidation of alpha 1-proteinase inhibitor as a major, contributing factor in the development of pulmonary emphysema, *Bull Eur Physiopathol Respir* ***16 Suppl***, 341-52.

Tugarinov, V., Muhandiram, R., Ayed, A., Kay, L. E. (2002) 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.

Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J Physiol* ***552***, 335-44.

Vargas, F., Martinez Volkmar, I., Sequera, J., Mendez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velasquez, M., Medina, R. (1998) Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation, *J Photochem Photobiol B* ***42***, 219-25.

Vuister, G. W., Bax, A. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in 15N-enriched proteins, *J Am Chem Soc* ***115***, 7772-7777.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J., Selkoe, D. J. (2002) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition, *Biochem Soc Trans* ***30***, 552-7.

Wang, C., Palmer, G. (2003) Solution NMR methods for quantitative identification of chemical exchange in 15N-labeled proteins, *Magn Reson Chem* ***41***, 866-876.

Wardman, P., Candeias, L. P. (1996) Fenton chemistry: an introduction, *Radiat Res* ***145***, 523-31.

Wardman, P., von Sonntag, C. (1995) Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells, *Methods Enzymol* ***251***, 31-45.

Weissbach, H., Resnick, L., Brot, N. (2005) Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage, *Biochim Biophys Acta* ***1703***, 203-12.

Williamson, M. P., Havel, T. F., Wuthrich, K. (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J Mol Biol* ***182***, 295-315.

Wishart, D. S., Sykes, B. D. (1994a) The 13C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using 13C chemical-shift data, *J Biomol NMR **4***, 171-80.

Wishart, D. S., Sykes, B. D. (1994b) Chemical shifts as a tool for structure determination, *Methods Enzymol **239***, 363-92.

Wishart, D. S., Sykes, B. D., Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J Mol Biol **222***, 311-33.

Wu, D., Cederbaum, A. I. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res Health **27***, 277-84.

Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2005) The N-terminal domain of PILB from Neisseria meningitidis is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases, *J Biol Chem **280***, 12344-50.

Wuthrich, K. (2003) NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture), *J Biomol NMR **27***, 13-39.

Yang, D., Kay, L. E. (1999) Improved 1HN-detected triple resonance TROSY-based experiments, *J Biomol NMR **13***, 3-10.

Yu, H., Schreiber, S. L. (1995) Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface, *Nature **376***, 788-91.

Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radic Biol Med **33***, 337-49.

Zheng, D., Cort, J. R., Chiang, Y., Acton, T., Kennedy, M. A., Montelione, G. T. (2003) 1H, 13C and 15N resonance assignments for methionine sulfoxide reductase B from Bacillus subtilis, *J Biomol NMR **27***, 183-4.

Zheng, D., Cort, J. R., Swapna, G. V. T., Aramini, J., Chiang, Y., Acton, T., Kennedy, M. A., Montelione, G. T. (2005) Solution NMR Structure of Methionine Sulfoxide Reductase B Using Minimal Constraint Strategy; Northeast Structural Genomics Target Sr10, *To be Published*.

Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science **279***, 1718-21.

Zhu, G., Xia, Y., Nicholson, L. K., Sze, K. H. (2000) Protein dynamics measurements by TROSY-based NMR experiments, *J Magn Reson **143***, 423-6.

Zhu, Z., Dumas, J. J., Lietzke, S. E., Lambright, D. G. (2001) A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release, *Biochemistry **40***, 3027-36.

Zimmerman, D. E., Kulikowski, C. A., Huang, Y., Feng, W., Tashiro, M., Shimotakahara, S., Chien, C., Powers, R., Montelione, G. T. (1997) Automated analysis of protein NMR assignments using methods from artificial intelligence, *J Mol Biol **269***, 592-610.

Chapitre II

Etude structurale et dynamique de la forme réduite et d'une forme oxydée (Cys_{51}-Cys_{198}) de la MsrA d'Escherichia coli

Sommaire du Chapitre II

II-1 INTRODUCTION 82

II-2 ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DE LA FORME REDUITE DE LA MSRA D'ESCHERICHIA COLI 84

II-2.1 ETUDE PRELIMINAIRE 84
II-2.2 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE DU SQUELETTE PEPTIDIQUE 87
II-2.3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE EN SOLUTION 90
II-2.4 ETUDE DYNAMIQUE 106
II-2.5 RELATION STRUCTURE FONCTION 114
II-2.6 CONCLUSION 115

II-3 ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE D'UNE FORME OXYDEE (CYS_{51}-CYS_{198}) DE LA MSRA D'ESCHERICHIA COLI 116

II-3.1 ETUDE PRELIMINAIRE 116
II-3.2 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE DU SQUELETTE PEPTIDIQUE 123
II-3.3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE EN SOLUTION 127
II-3.4 ETUDE DYNAMIQUE 140
II-3.5 RELATION STRUCTURE FONCTION 147
II-3.6 CONCLUSION 150

II-4 MATERIELS ET METHODES 151

II-4.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS 151
II-4.2 SPECTROSCOPIE 151
II-4.3 MESURE DE LA DIFFUSION TRANSLATIONNELLE 151
II-4.4 ATTRIBUTION SEQUENTIELLE 152
II-4.5 ETUDE STRUCTURALE 153
II-4.6 ETUDE DYNAMIQUE 154

II-1 Introduction

Malgré les nombreuses études structurales réalisées sur les Msr de classe A, les déterminants structuraux permettant la formation des ponts disulfure, intervenant lors du cycle catalytique des MsrA, demeurent inconnus. En effet, pour les trois structures cristallines connues, les distances entre les C^{β} des différentes cystéines catalytiques sont trop grandes pour permettre la formation des ponts disulfure sans réarrangement conformationnel. Les hypothèses les plus évidentes pour expliquer ce désaccord entre les structures tridimensionnelles, issues de la cristallographie, et le mécanisme catalytique sont que : (i) les structures cristallines ne sont *a priori* pas représentatives de la conformation fonctionnelle en solution ; (ii) l'extrémité C-terminale, qui comprend les cystéines de recyclage 198 et 206, pourrait être animée de mouvements amples permettant le rapprochement des cystéines catalytiques et ainsi la formation des ponts disulfure.

Dans le but de vérifier ces deux hypothèses, nous nous intéresserons, dans ce chapitre, à la détermination de la structure tridimensionnelle en solution de la MsrA réduite d'*Escherichia coli* ($MsrA^{E.coli}_{red}$) ainsi qu'à l'étude de la dynamique du squelette peptidique de cette enzyme. La même étude structurale et dynamique sera aussi réalisée sur une forme oxydée de $MsrA^{E.coli}$ (celle contenant le premier pont disulfure intervenant lors du cycle catalytique : Cys_{51}-Cys_{198}). Cette étude devrait permettre de mettre en évidence les différences structurales et dynamiques entre la forme réduite et cette forme oxydée et ainsi, d'en déduire les éventuels changements conformationnels nécessaires à la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. De plus, l'étude de cette forme oxydée ($MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$) pourrait fournir des informations sur la formation du second pont disulfure (Cys_{198}-Cys_{206}), dernière étape avant la régénération de l'activité réductase (*via* la réduction du pont Cys_{198}-Cys_{206} par la thiorédoxine) pour les MsrA possédant deux cystéines de recyclage.

Une étude RMN, réalisée sur la MsrA d'*Erwinia chrysanthemii* et basée sur l'utilisation des contraintes orientationelles à longue portée (residual dipolar coupling, RDC) (Beraud *et coll.*, 2002), n'a pas permis d'aboutir à une structure à haute résolution. De ce fait, il nous semble nécessaire, pour mener à bien les études structurales des formes réduite et oxydée de $MsrA^{E.coli}$, d'utiliser les classiques contraintes de distance dérivant de la mesure des effets nOe. Cela reste un défi technique compte tenu de la taille important de $MsrA^{E.coli}$ (23 kDa pour 211 résidus).

II-2 Etude structurale et dynamique de la forme réduite de la MsrA d'Escherichia coli

Cette partie s'intéresse à l'étude structurale et dynamique de la MsrA d'*Escherichia coli* en solution et sous forme réduite. Une telle étude nécessite l'attribution séquentielle du squelette peptidique et des chaînes latérales grâce à l'exploitation de spectres tridimensionnels hétéronucléaires. Cette première étape permet d'accéder aux fréquences de résonance de l'ensemble (ou presque) des noyaux de la protéine. La connaissance de ces fréquences est un préalable nécessaire à l'exploitation des spectres NOESY édités (qui permettront d'aboutir à la structure en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$) ainsi qu'au traitement des expériences de mesure des vitesses de relaxation des noyaux ^{15}N.

Pour cette étude, deux échantillons protéiques ont été produits au MAEM, un échantillon simplement marqué ^{15}N et un échantillon doublement marqué ^{13}C, ^{15}N de $MsrA^{E.coli}_{Red}$. L'étude dynamique a été réalisée en collaboration avec Monsieur le Professeur Pierre Mutzenhardt du Laboratoire de Méthodologie RMN.

II-2.1 Etude préliminaire

II-2.1.1 Examen de la séquence de $MsrA^{E.coli}$

La MsrA d'*Escherichia coli* est une enzyme monomérique de 211 résidus. L'examen de la structure primaire (*Figure II-1*) révèle que cette protéine possède 4 cystéines (Cys_{51}, Cys_{86}, Cys_{198} et Cys_{206}), dont trois sont impliquées dans le processus catalytique (Cys_{51}, Cys_{198} et Cys_{206}). De plus, $MsrA^{E.coli}$ possède 16 prolines, qui représentent autant de lacunes dans l'enchaînement des groupes amides secondaires et compliqueront le travail d'attribution séquentielle. On observe, enfin, de nombreuses répétitions d'acides aminés de même nature ($A_{147}AA_{149}$ et $D_{164}DD_{166}$) qui peuvent générer des ambiguïtés d'attribution.

L'examen des structures secondaires déterminées par diffraction des rayons X (Tete-Favier *et coll.*, 2000) (*Figure II-1*) indique que seuls 40 % des résidus de la protéine adoptent une structure secondaire régulière. Ceci présage que, même en solution, MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ possède de nombreuses boucles qui risquent de poser des difficultés ultérieures lors de l'étape de résolution de la structure tridimensionnelle.

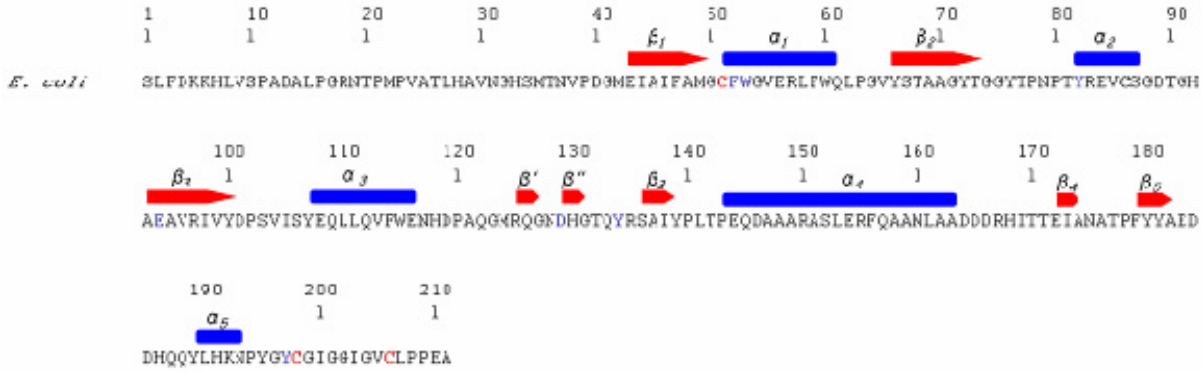


Figure II-1. : ***Séquence primaire de la MsrA sauvage d'<u>Escherichia coli</u>.*** *Les éléments de structures secondaires de la structure cristalline de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ sont représentés en rouge et en bleu ; les cystéines impliquées dans le processus catalytique sont représentées en rouge ; les résidus intervenant dans la reconnaissance du substrat en bleu (d'après les structures cristallines connues).*

II-2.1.2 Premiers spectres RMN

Les échantillons de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ marqués ont été préparés à une concentration de 1mM à pH 7,1 (10 mM de KH_2PO_3), en présence de 50 mM de dithiothréitol pour empêcher l'oxydation des groupes thiol de l'enzyme ; tous les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à une température de 298 K.

Les études structurales effectuées jusqu'à présent sur différentes MsrA, et notamment l'étude structurale par RMN réalisée sur la MsrA d'*Erwinia chrysanthemii* (Beraud *et coll.*, 2001), laissent supposer que ces protéines sont bien structurées en solution et que leur conformation est stable dans le temps. Ces suppositions sont confirmées par l'examen des premiers spectres RMN de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$.

Le spectre 1D protonique de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ marquée ^{15}N (*Figure II-2-A*) montre une bonne dispersion des fréquences de résonance des protons amides (qui s'étendent de 6,5 ppm à 10 ppm) ainsi que des protons aliphatiques. De plus, des résonances remarquablement blindées (vers -1 ppm) et déblindées (vers 13 ppm) sont observables. Le spectre 2D ^{1}H-^{15}N HSQC (Figure II-2-B) révèle une bonne dispersion des fréquences de résonance des protons amides, mais aussi des noyaux ^{15}N dans la dimension de l'azote (de 105 ppm à 135 ppm). Enfin, le décompte des corrélations du spectre indique que la plupart des groupes amides secondaires de la protéine sont visibles sur le spectre. Ces observations tendent à confirmer

que $MsrA^{E.coli}_{Red}$ adopte une conformation stable et bien définie dans les conditions d'étude choisies. Enfin, la mesure du cœfficient de diffusion translationnelle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$, réalisée grâce à une expérience DOSY, donne une valeur de $1{,}13.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$. Cette valeur permet d'estimer que le rayon moléculaire est de l'ordre de 19,3 Å, ce qui correspond bien à la taille d'un monomère de la maille cristalline de $MsrA^{E.coli}$. Ainsi, $MsrA^{E.coli}_{Red}$ semble monomérique en solution à la concentration choisie (1 mM).

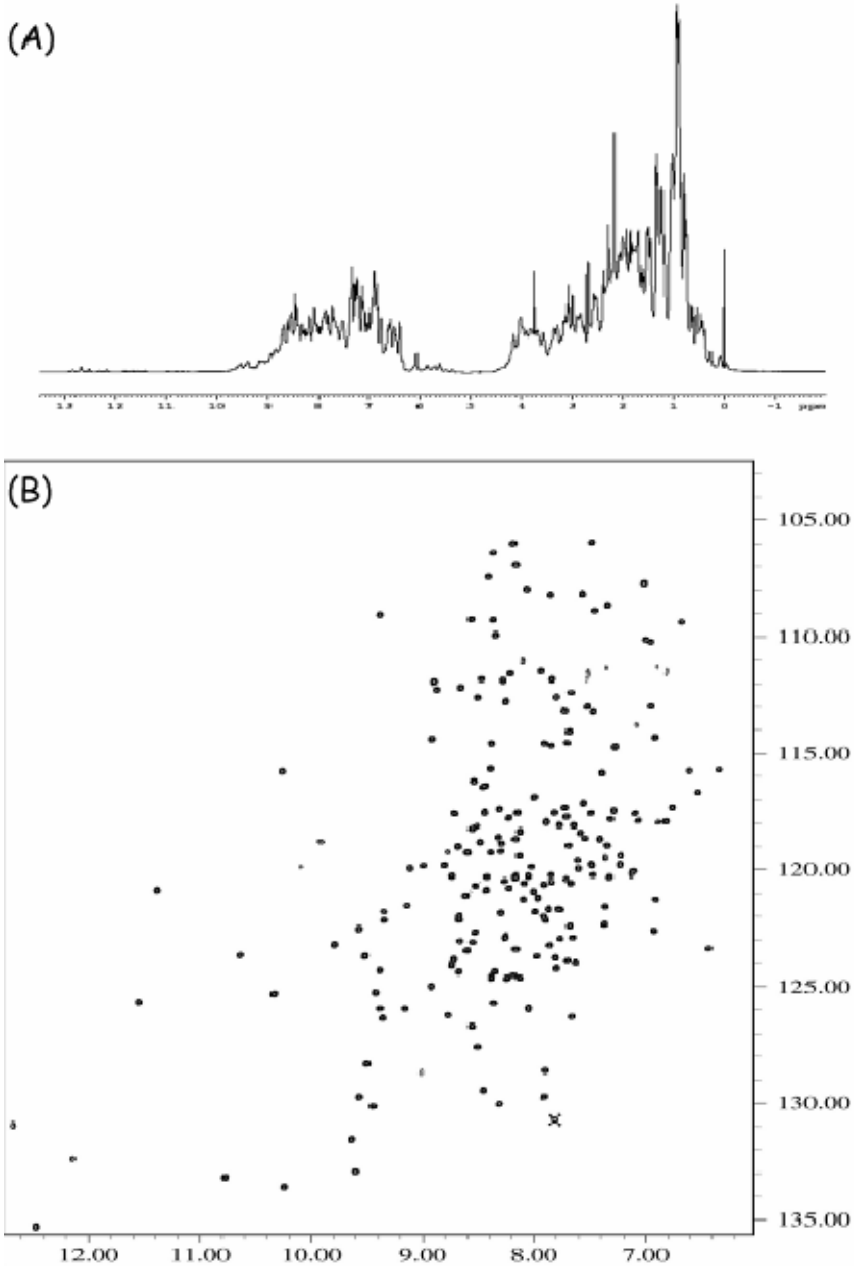


Figure II-2. : ***(A) Spectre 1D ^1H de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ ^{15}N, 1mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1. Le signal de l'eau a été éliminé grâce à la séquence WATERGATE ; le signal résiduel a été atténué grâce à un traitement polynomial de l'interférogramme. (B) Spectre ^1H-^{15}N HSQC de la $MsrA^{E.coli}_{Red}$ ^{15}N, 1 mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1.***

II-2.2 Attribution séquentielle du squelette peptidique

L'attribution séquentielle des résonances du squelette peptidique a été réalisée grâce à l'exploitation d'expériences RMN tridimensionnelles hétéronucléaires réalisées sur l'échantillon de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ doublement marqué ^{13}C, ^{15}N. Les expériences HNCA/HN(CO)CA, HNCO/HN(CA)CO, CBCANH/CBCA(CO)NH ont permis d'attribuer les noyaux $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C^{\beta}$, $^{13}C'$ du squelette peptidique (*Figure II-3*, on trouvera en Annexe I d'autre exemples de plan tirés d'expériences tridimensionnelle hétéronucléaire).

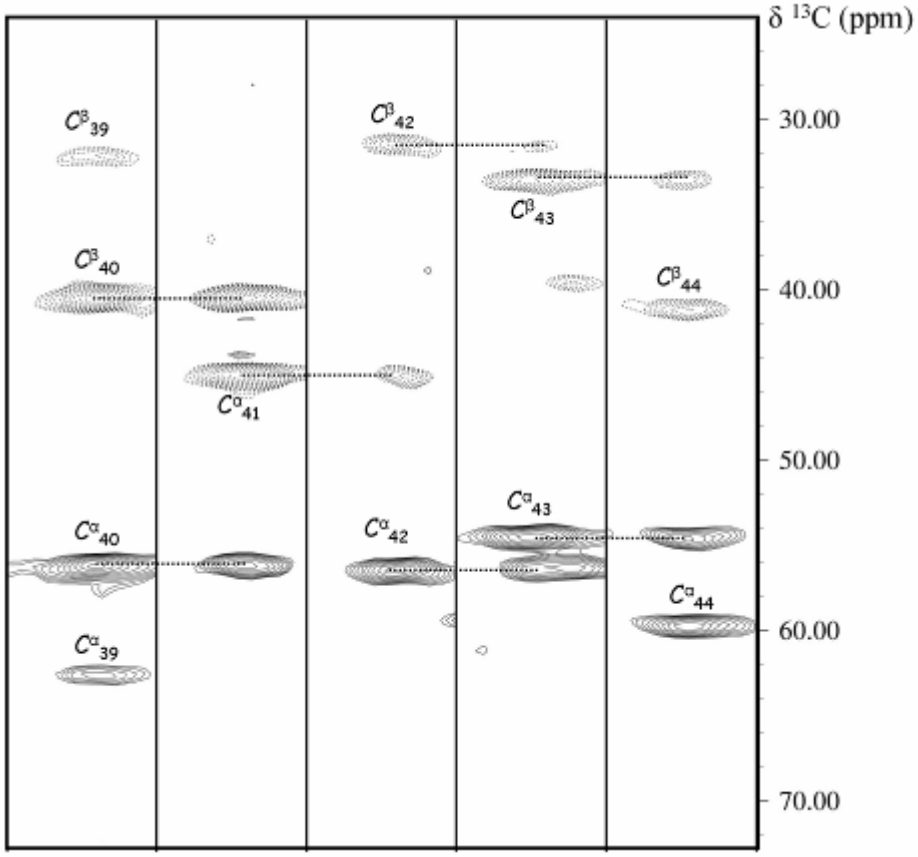


Figure II-3. : ***Bandes issues du spectre CBCANH de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ et correspondant à la séquence $D_{40}GMEI_{44}$.*** *Les corrélations positives (signaux en traits pleins) correspondent aux C^{α} et les corrélations négatives (signaux en traits pointillés) aux C^{β} et C^{α} de la glycine 41.*

Les expériences HNHA et HCCH-TOCSY ont permis d'attribuer les noyaux des chaînes latérales. Malgré la complexité des spectres à exploiter et les nombreux recouvrements de signaux observés, cette méthodologie a permis d'attribuer 94 % des noyaux du squelette peptidique (*Figure II-4*) ainsi que la grande majorité de ceux des chaînes latérales.

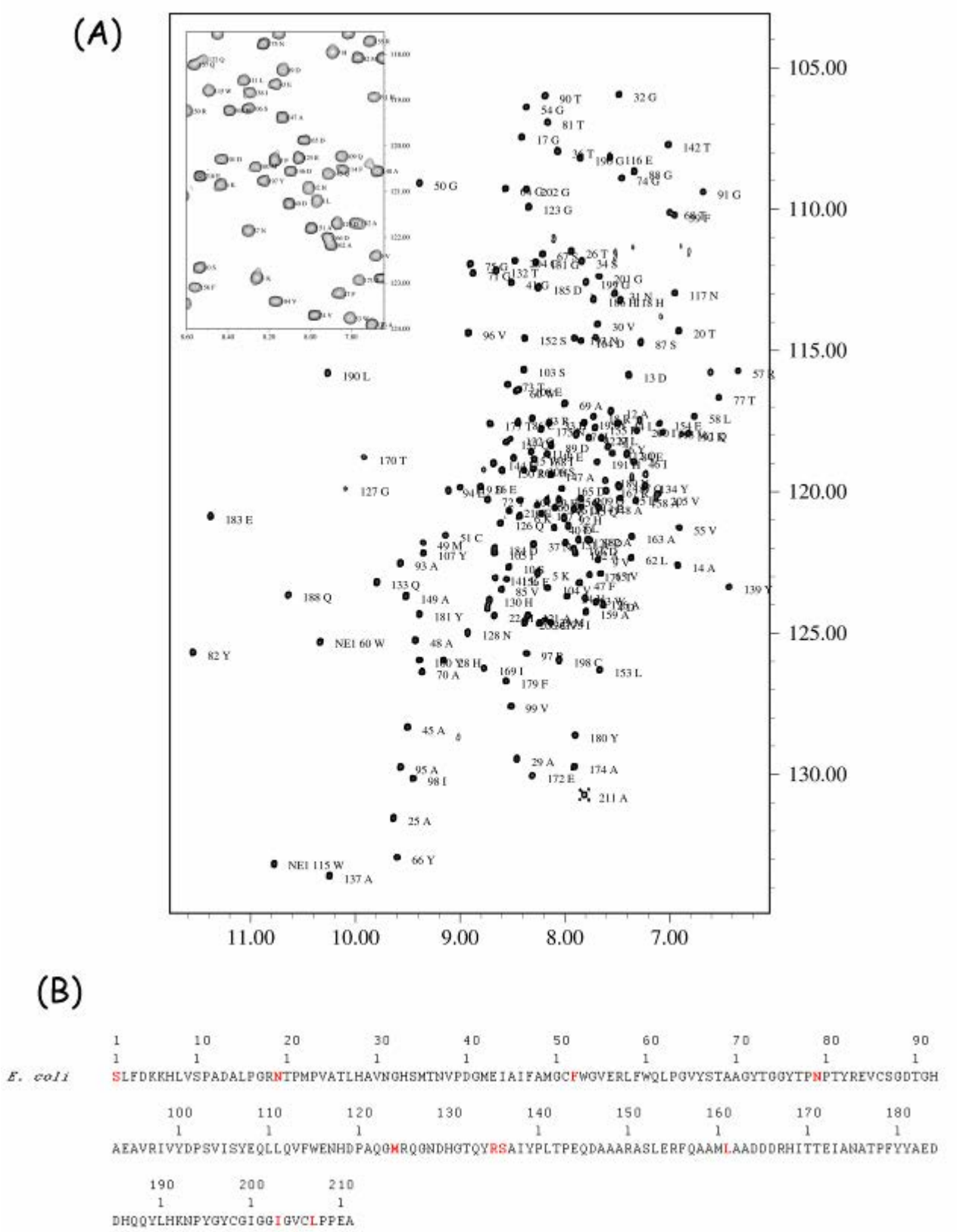


Figure II-4. : ***(A) Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC attribuée à 94 %, de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ à 600 Mhz et 298 K, pH 7,1. (B) Séquence primaire de la MsrA d'<u>Escherichia coli</u> ; les résidus non attribués sont représentés en rouge.***

Les valeurs des déplacements chimiques des noyaux ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N du squelette peptidique et des chaînes latérales ont été déposées dans la banque de données BMRB (http://www.bmrb.wisc.edu) sous la référence 6090. Les 10 résidus qui n'ont pas pu être attribués sont uniformément répartis dans la séquence : il s'agit des résidus Ser_{1}, Asn_{19}, Phe_{52}, Asn_{79}, Met_{124}, Arg_{135}, Ser_{136}, Leu_{161}, Ile_{203} et Leu_{208} (*Figure II-4*).

Compte tenu de la structure cristalline les résidus Asn_{19}, Met_{124}, Arg_{135}, Ser_{136}, Ile_{203} et Leu_{207} sont localisés dans des zones peu structurées (boucles, extrémité C-terminale), ce qui pourrait être à l'origine d'une dynamique lente (de l'ordre de la milliseconde) expliquant l'absence de signal observée pour ces résidus (certainement dû à une contribution R_2^{ech} trop importante). Le résidu Phe_{52} se situe dans le site actif, ce qui laisse supposer qu'il est lui aussi soumis à des phénomènes d'échange. Enfin, le résidu Asn_{79} se situe entre deux prolines ce qui rend virtuellement impossible son attribution par les techniques tridimensionnelles hétéronucléaires.

L'examen des valeurs de facteurs de protection des groupes amide, déterminées grâce aux expériences d'échanges H_2O/D_2O, et des angles de torsion φ et ψ prédits grâce au logiciel

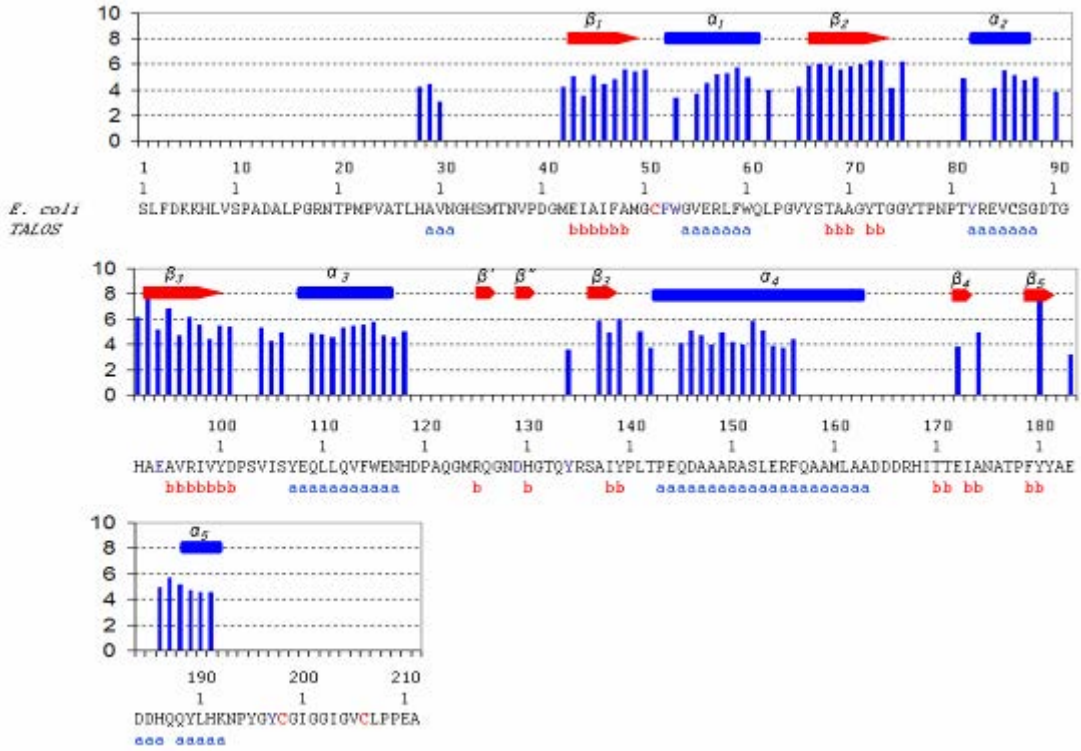


Figure II-5. : ***Prédictions des angles φ et ψ (TALOS) et facteurs de protection des groupes amides.*** *Les valeurs de Log(Fp) sont représentées sous forme d'histogramme, les éléments de structure secondaire représentés en rouge et bleu sont ceux de la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}$, les prédictions du logiciel TALOS sont indiquées sous la séquence par un* ***b*** *bleu (pour des valeurs de φ,ψ correspondant à un brin β) et par un* ***a*** *rouge pour des valeurs de φ, ψ correspondant à une hélice α).*

TALOS (Cornilescu *et coll.*, 1999), donne une première approximation des éléments de structures secondaires de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution (*Figure II-5*). Ces éléments de structures secondaires putatifs sont très proches de ceux de la structure cristalline, ce qui tendrait à indiquer que la conformation globale de la protéine en solution est similaire à celle obtenue à l'état cristallin.

II-2.3 Détermination de la structure tridimensionnelle en solution

L'attribution séquentielle du squelette peptidique et des chaînes latérales est un préalable à l'exploitation des spectres NOESY édités ^{15}N et ^{13}C, et à la collecte des effets nOe qui permettent d'aboutir à la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$.

II-2.3.1 Attribution des spectres NOESY et calcul de la structure tridimensionnelle

L'exploitation manuelle des spectres ^{1}H-^{15}N NOESY HSQC et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC, ainsi que d'un spectre ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC particulier réalisé dans le but d'observer les noyaux aromatiques, a permis de définir un premier ensemble d'environ 1700 contraintes non ambiguës, correspondant aux éléments de structure secondaire, incluant les 262 contraintes d'angles dièdres dérivant des prédictions de TALOS et les liaisons hydrogène stabilisant les éléments de structures secondaires évidents. Ce premier ensemble de contraintes a permis de définir la topologie globale de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution et ainsi, d'attribuer plus facilement les corrélations nOe ambiguës mais aussi de définir les hétéroatomes accepteurs de protons possédant une valeur de facteur de protection importante. On aboutit ainsi à un ensemble final de 3082 contraintes de distances et de 262 contraintes d'angles dièdres (Tableau II-1). De plus, toutes les liaisons peptidiques ont été maintenues planes et en configuration *trans* (ω = 180 °), puisque qu'aucune corrélation nOe indiquant une configuration *cis* n'a été observée (telle que la corrélation H^{α}_{i},H^{α}_{i+1}). Cet ensemble de contraintes a été utilisé dans un protocole de recuit simulé grâce au logiciel DYANA (Güntert *et coll.*, 1997) et a ainsi permis de calculer 500 structures. Les 20 structures possédant les valeurs de fonction cible les plus faibles (toutes inférieures à 1) ont été sélectionnées pour former l'ensemble final des conformations représentatives de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.

Tableau II-1 : Ensemble des contraintes utilisées pour déterminer la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution

Contraintes	Nombre
Distances interprotoniques	
Total	3082
liaisons hydrogène[a]	146
intrarésiduelles	1769
séquentielles	853
longues distances	314
Angles dièdres	262
Φ	130
Ψ	132

[a]Une liaison hydrogène est définie par deux contraintes de distance. Ainsi, 73 liaisons hydrogène mises en évidence conduisent à 146 contraintes de distance.

II-2.3.2 Statistiques structurales

L'examen de l'ensemble final des 20 structures tridimensionnelles (*Figure II-6*) indique que le cœur de l'enzyme est bien structuré (résidus 12 à 193) puisqu'il montre un rmsd par rapport aux coordonnées moyennes de 0,85 ± 0,14 Å pour le squelette peptidique et de 1,64 ± 0,21 Å pour l'ensemble des hétéroatomes.

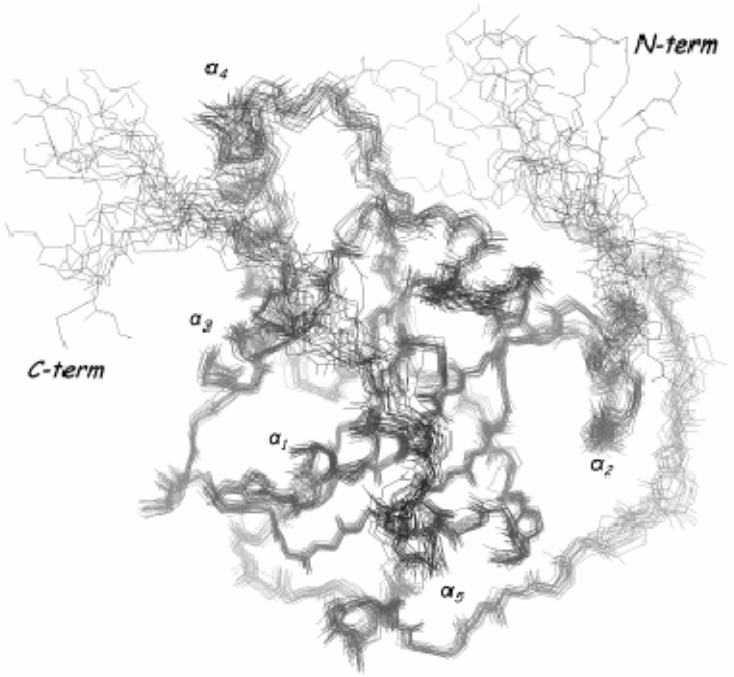


Figure II-6. : Superposition des squelettes peptidiques (résidus 12 à 193) des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.

Les extrémités N- et C-terminales sont moins bien définies, comme le confirment les données dynamiques (voir plus loin). La distribution des valeurs de rmsd le long de la séquence n'est pas homogène, ce qui indique le degré de flexibilité de certaines régions telles que les boucles entre les éléments des différentes structures secondaires (*Figure II-7*).

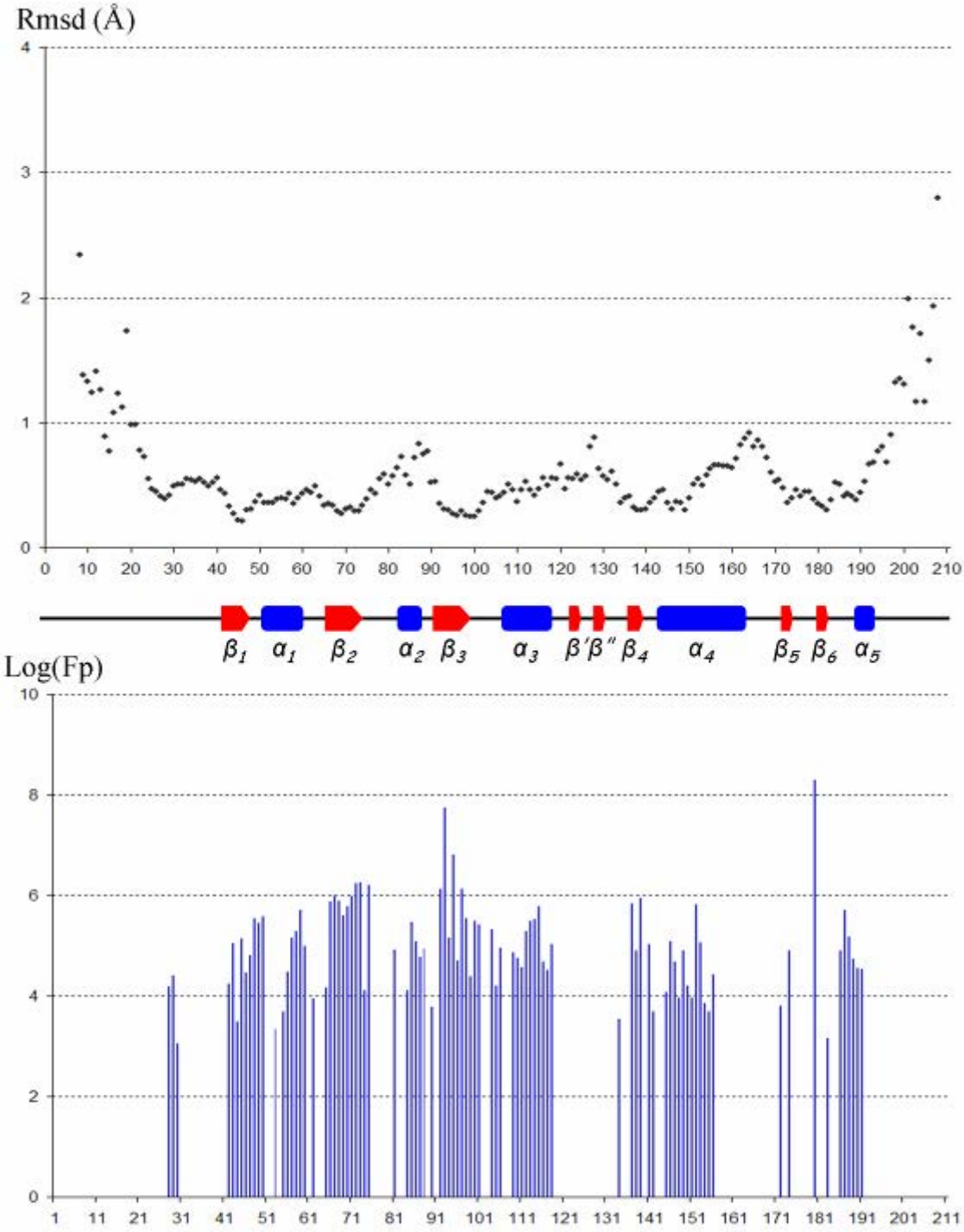


Figure II-7. : ***Eléments de structures secondaires de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution, rmsd du squelette peptidique et valeurs de facteur de protection des groupes amides secondaires le long du squelette peptidique.***

L'ensemble des structures tridimensionnelles est en accord avec les contraintes expérimentales. En effet, les violations de contraintes de distance ne dépassent pas 0,2 Å et les violations d'angles dièdres sont inférieures à 5 degrés (Tableau II-2). Enfin, toutes les valeurs d'angles dièdres du squelette peptidique (à l'exception des glycines) se trouvent dans les régions autorisées du diagramme de Ramachandran. L'ensemble des structures tridimensionnelles représentatives de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ en solution est d'une excellente qualité et d'une bonne définition.

Tableau II-2 : Statistiques structurales pour l'ensemble des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ en solution

Violation	Occurrence par conformère
Violations de distance	
> 0,0 Å	96 ± 12
> 0,1 Å	9 ± 3
> 0,2 Å	0
Violations d'angles dièdres	
> 0 deg.	36 ± 8
> 5 deg.	0
Diagramme de Ramachandran[a]	
Résidus dans les régions les plus favorables (%)	82,6
Résidus dans les régions supplémentaires autorisées (%)	17,3
Résidus dans les régions « généreusement » autorisées (%)	0,1
Résidus dans les régions interdites (%)	0

[a]Données déterminées grâce au logiciel PROCHECK NMR (Laskowski *et coll.*, 1996)

II-2.3.3 Description de la conformation globale

La conformation globale de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ est une conformation « α/β roll », telle qu'elle a été décrite dans toutes les études structurales de MsrA effectuées jusqu'à présent. Elle consiste en un principal feuillet *β* constitué de 6 brins, entouré de 5 hélices α et d'un petit feuillet *β* de 2 brins (*Figure II-8*).

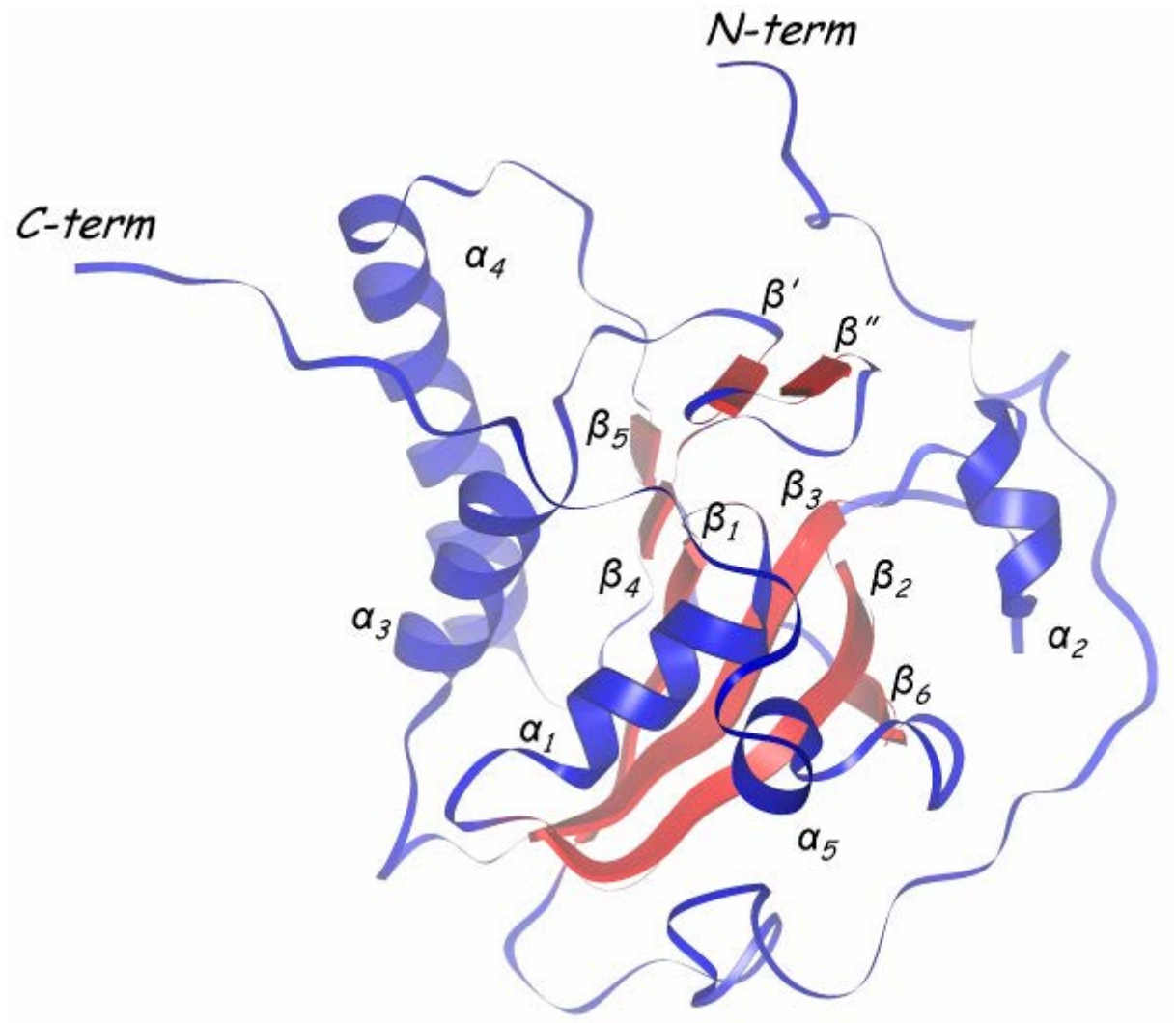


Figure II-8. : Structure la plus représentative de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution. *Les feuillets sont représentés en rouge, les hélices et les boucles en bleu.*

L'examen des structures secondaires indique que seuls 40 % des résidus de MsrA$^{E.coli}_{\mathrm{Red}}$ sont impliqués dans des éléments de structure secondaire (*Figure II-7*). Le cœur de MsrA$^{E.coli}_{\mathrm{Red}}$ est constitué d'un feuillet β de 6 brins. Ces brins comprennent les résidus Glu_{43} à Ala_{48} (β_1), Tyr_{66} à Thr_{73} (β_2), Ala_{93} à Tyr_{100} (β_3), Ala_{137} à Tyr_{139} (β_4), Glu_{172} à Ile_{173} (β_5) et Tyr_{180} à Tyr_{181} (β_6) et montrent la succession d'arrangements parallèle (p) et antiparallèle (a) suivante : β_5(p)β_4(a)β_1(a)β_3(a)β_2(a)β_6. Ce principal feuillet β est entouré d'un petit feuillet β et de 5 hélices α. Le petit feuillet β de 2 brins (β': Arg_{125} à Glu_{126} et β'': Asp_{129} à His_{130}) semble être très faiblement stabilisé compte tenu des valeurs de rmsd élevées et des valeurs de facteur de protection particulièrement faibles pour les groupes amides des résidus Glu_{126} à His_{130}, et cela malgré les valeurs d'angles de torsions φ, ψ et les corrélations nOe à longue distance définissant un feuillet. La première hélice, α_1, s'étend des résidus Phe_{52} à Trp_{60} et comprend 2 tours d'hélice. La seconde hélice α_2 est aussi une hélice régulière qui

s'étend des résidus Tyr_{82} à Ser_{87}. La troisième hélice α_3 s'étend des résidus Tyr_{107} à Asn_{117} et comprend 2 tours et demi d'hélice. La quatrième hélice α_4 s'étend des résidus Pro_{143} à Ala_{162}, elle est constituée de 3 tours réguliers d'hélice des résidus Pro_{143} à Phe_{156}. Les tours suivants (Gln_{157} à Ala_{162}), qui sont en interaction avec l'extrémité C-terminale, sont plus faiblement stabilisés. En effet, malgré les valeurs d'angles de torsions φ, ψ et la présence des effets nOe séquentiels définissant une hélice α, les résidus Gln_{157} à Ala_{162} montrent des valeurs de rmsd légèrement plus élevées que pour le reste de l'hélice et des valeurs de facteur de protection des groupes amides particulièrement faibles. La cinquième et dernière hélice s'étend des résidus Tyr_{189} à Lys_{192} et ne comprend qu'un unique tour d'hélice.

Le coeur de l'enzyme est flanqué des longues extrémités N- et C- terminales ne contenant que peu d'éléments de structure secondaire. L'extrémité N-terminale s'étend des résidus Ser_1 à Met_{42}, et ne possède qu'une boucle (des résidus Ser_{10} à Ala_{14}) comme unique élément de structure secondaire. Sa conformation n'est correctement définie qu'à partir du résidu Thr_{20} (comme le montrent les valeurs importantes de rmsd observées pour les résidus Ser_1 à Asn_{19}) et est maintenue au contact du cœur de l'enzyme par de nombreuses interactions hydrophobes et une liaison hydrogène entre les atomes H^N_{28} et O^{ε}_{188}.

L'extrémité C-terminale s'étend des résidus Tyr_{195} à Ala_{211} et comprend les deux cystéines de recyclage (Cys_{198} et Cys_{206}). Elle ne présente aucun élément de structure secondaire. La conformation de l'extrémité C-terminale est moins bien définie à partir du résidu Gly_{201} (comme le montrent les valeurs élevées de rmsd observées pour les résidus Gly_{201} à Ala_{210}) et semble maintenue au contact du cœur de l'enzyme grâce à des interactions hydrophobes entre les résidus Ile_{200}, Ile_{203}, Val_{205} et le cœur de l'enzyme.

II-2.3.4 Description du site actif et de l'extrémité C-terminale

II-2.3.4.1 Site actif

Le site actif des Msr de classe A a été largement décrit sous forme d'adduit, ou complexé avec différents mimes du substrat, dans les structures cristallines connues. C'est pourquoi les résidus supposés jouer un rôle important dans la reconnaissance du substrat ont bien été identifiés. Le site actif de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution que nous proposons est le premier à être décrit sous forme native, c'est-à-dire sans adduit ou complexe mimant le substrat. Il est organisé autour de la cystéine catalytique Cys_{51} incluse dans la séquence canonique $G_{50}CFW_{53}$ (*Figure II-9*). Cys_{51} est situé dans une courte boucle entre le brin β_1 et l'hélice α_1 ; cette boucle est surplombée par le feuillet β'-β'' comprenant le résidu Asp_{129} supposé

interagir avec le H^N de la MetSO par le biais d'une liaison hydrogène avec le groupe hydroxyle de l'acide aspartique. A la suite du résidu Cys_{51}, les chaînes latérales de résidus Phe_{52} et Trp_{53} forment une poche hydrophobe supposée interagir avec le groupe méthyle de la MetSO. Le noyau indol du Trp_{53} est stabilisé par un recouvrement de type π-π avec la chaîne latérale du résidu Tyr_{189}. Au dessus de cette poche hydrophobe, les résidus Tyr_{82} (qui fait partie de l'hélice α_2), Glu_{94} (inclus dans le brin β_3) et Tyr_{134} (qui se situe entre les brins β'' et β_4) sont supposés impliqués dans la reconnaissance de l'atome d'oxygène de la MetSO *via* la formation de liaisons hydrogène impliquant les groupes hydroxyles des chaînes latérales de ces trois résidus. Enfin, le site actif est exposé en surface et ainsi aisément accessible au substrat. Il présente un caractère hydrophobe très marqué compte tenu de la densité importante de résidus aromatiques (Phe_{52}, Trp_{53}, Tyr_{82} et Tyr_{134}). Les données statistiques du site actif (Tableau II-3, les diagrammes de Ramachandran des résidus Tyr_{197}, Cys_{198} et Cys_{206} sont représentés en Annexe I) montre que la plupart des résidus du site actif adoptent une conformation bien définie (comme le montrent les faibles valeurs de rmsd et la variabilité limitée des valeurs des angles dièdres φ, ψ et χ^1), en particulier pour les résidus aromatiques. Seules les chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Glu_{94} et Asp_{129} semblent plus flexibles (comme le montre la variabilité importante des valeurs de χ^1).

Tableau II-3 : Description statistique du site actif de $MsrA^{E.coli}_{Red}$

Résidus	**Rmsd squelette peptidique (Å)**	**Rmsd hétéroatomes (Å)**	**φ (deg.)**	**ψ (deg.)**	**χ^1 (deg.)**
Cys_{51}	0,36	0,80	-41 ± 1	110 ± 1	-150 ± 100
Phe_{52}	0,36	0,85	-83 ± 3	-3 ± 5	56 ± 11
Trp_{53}	0,36	0,55	-70 ± 3	-58 ± 4	-72 ± 8
Tyr_{82}	0,64	1,17	-54 ± 5	-42 ± 7	162 ± 3
Glu_{94}	0,30	1,33	-75 ± 6	117 ± 4	-109 ± 36
Asp_{129}	0,63	1,01	-109 ± 5	133 ± 10	-68 ± 31
Tyr_{134}	0,36	0,82	-105 ± 10	43 ± 11	-75 ± 6
Tyr_{197}	0,90	1,97	-81 ± 28	124 ± 10	-114 ± 84
Cys_{198}	1,32	1,73	-129 ± 10	166 ± 96	-62 ± 70
Cys_{206}	1,50	2,16	-85 ± 30	128 ± 50	-102 ± 68

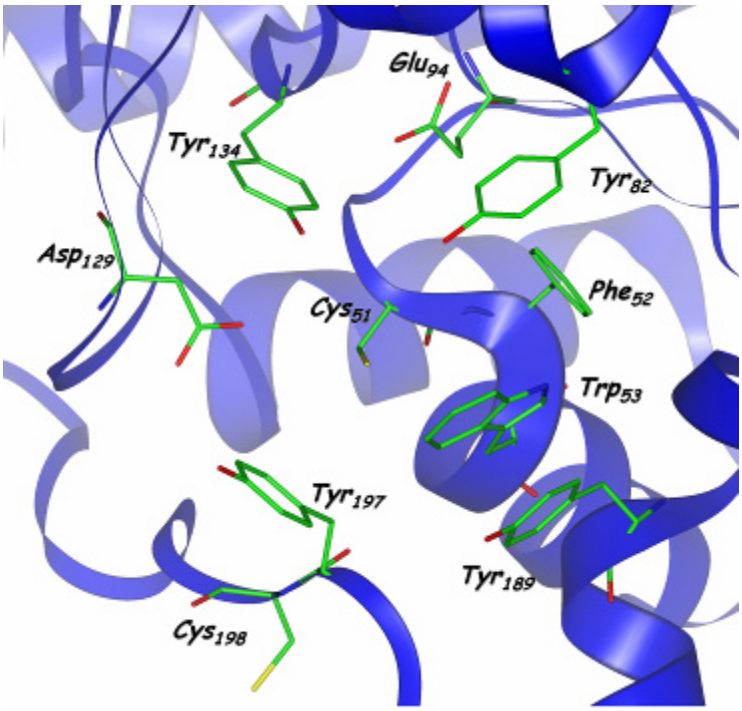


Figure II-9. : Site actif de la structure la plus représentative de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.

II-2.3.4.2 Extrémité C-terminale

Faisant face au site actif, se trouvent les résidus Tyr_{197} et Cys_{198} appartenant à l'extrémité C-terminale de l'enzyme. Le résidu Tyr_{197} est supposé être impliqué dans la fixation du substrat par le biais d'une interaction entre sa chaîne latérale et la liaison peptidique du substrat. Le résidu Tyr_{197} semble interagir avec les résidus Trp_{53} et Tyr_{189}, bien que sa position ainsi que la conformation de sa chaîne latérale montrent une variabilité importante comme le révèlent les valeurs de rmsd élevées ainsi que la variabilité élevée des angles dièdres φ, ψ et χ^1 (Tableau II-3). Le résidu Cys_{198} est la première cystéine de recyclage : sa chaîne latérale est orientée vers le solvant (*Figure II-10-A*). Sa position et sa conformation montrent une importante variabilité comme le confirment les valeurs de rmsd élevées ainsi que la variabilité importante des angles dièdres φ, ψ et χ^1 (Tableau II-3). Cette variabilité se répercute sur la distance entre les atomes C^{β}_{198} et C^{β}_{51} qui est de 8,4 ± 1,9 Å avec une distance minimale de 6,1 Å (au lieu de 11,2 Å dans la structure cristalline). Comme c'est le cas pour l'ensemble des structures tridimensionnelles de MsrA déterminées jusqu'alors, cette distance est trop grande pour permettre, en l'état, la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Le résidu Cys_{206}, la seconde cystéine de recyclage, est située à la fin de l'extrémité C-terminale et possède, elle aussi, une flexibilité importante comme l'attestent les valeurs de rmsd élevées ainsi que la variabilité des angles dièdres φ, ψ et χ^1 (Tableau II-3). La distance entre les atomes C^{β}_{206} et C^{β}_{198} est de 23,7 ± 2,69 Å avec une distance minimale de

20,8 Å (au lieu de 21,2 Å dans la structure cristalline) : cette distance est trop importante pour permettre la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}. Au sein de l'ensemble finale des 20 structures, les distances dC^{β}_{51}-C^{β}_{198} et dC^{β}_{198}-C^{β}_{206} sont très variables (ce qui est confirmé par le rmsd des chaînes latérales des résidus Cys_{51} et Cys_{198}, ainsi que la variabilité de leur angle dièdre χ^1). Aucune corrélation n'a été observée entre ces deux distances, ce qui suggère que les conformations de ces deux cystéines sont indépendantes (*Figure II-10-B*).

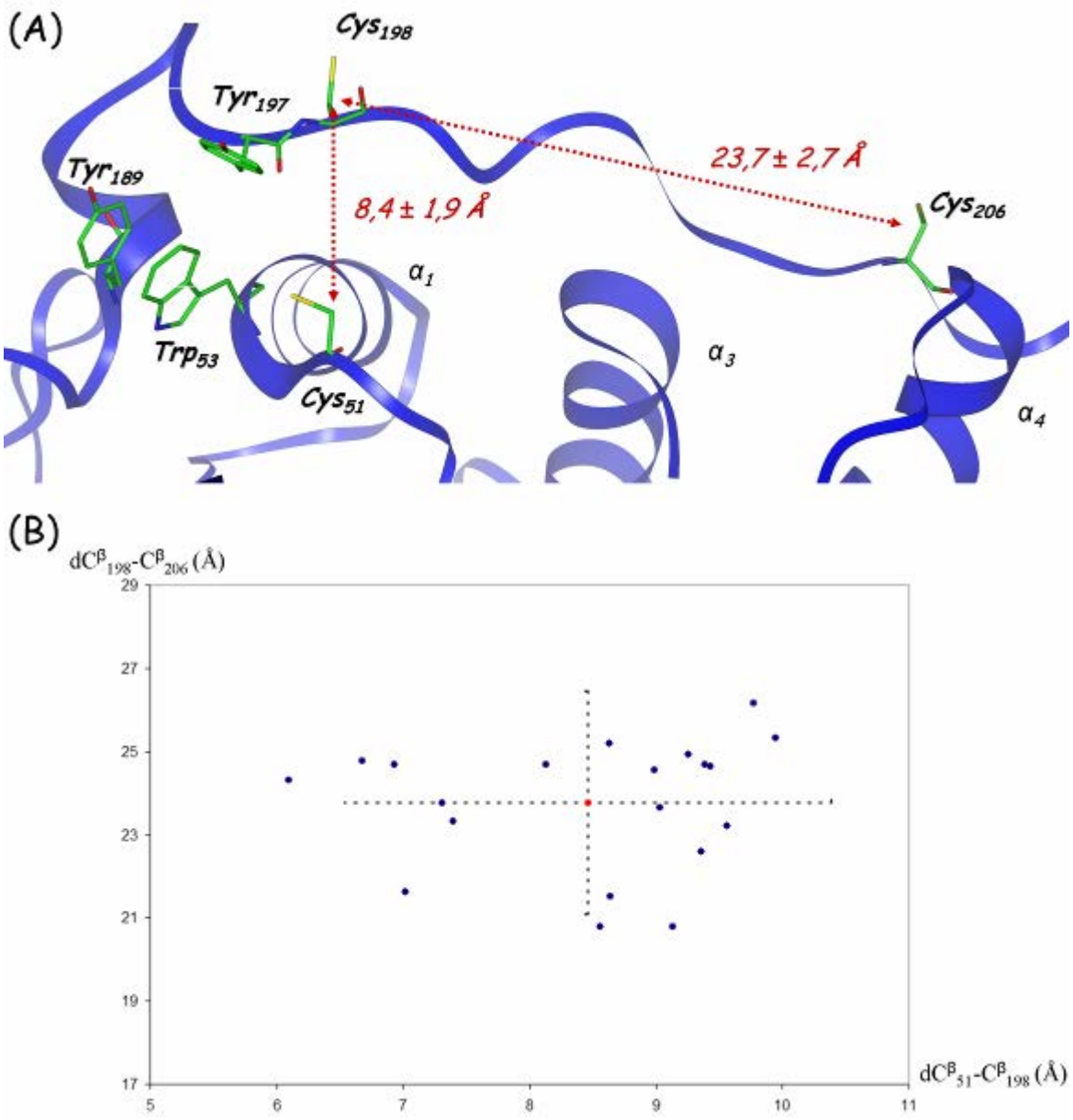


Figure II-10. : ***(A) Conformation de l'extrémité C-terminale de la structure la plus représentative de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.*** *Les distances entre les cystéines sont de 8,4 ± 1,9 Å entre C^{β}_{51} et C^{β}_{198} et 23,7 ± 2,7 Å entre C^{β}198 et C^{β}206.* ***(B) Couples de distances dC^{β}_{51}-C^{β}_{198} et dC^{β}_{198}-C^{β}_{206} mesurés dans l'ensemble des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.*** *Les couples de valeurs sont indiqués par des points bleus. Le couple de valeurs moyennes (dC^{β}_{51}-C^{β}_{198} = 8,4 Å, dC^{β}_{198}-C^{β}_{206} = 23,7 Å) est indiqué par un point rouge. Les valeurs de variabilité pour les deux distances (± 1,7 Å pour dC^{β}_{51}-C^{β}_{198} et ± 2,7 Å pour dC^{β}_{198}-C^{β}_{206}) sont représentées par des traits pointillés.*

II-2.3.5 Comparaison de la structure en solution avec les structures cristallines connues

Compte tenu des distances dC^{β}_{51}-C^{β}_{198} et dC^{β}_{198}-C^{β}_{206} observées, la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution ne permet pas d'expliquer la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Cependant, il est intéressant de comparer la conformation en solution avec celle des différentes structures cristallines et en solution qui ont été déterminées.

L'examen des structures primaires des MsrA ayant fait l'objet d'une étude structurale (*Figure II-11*) montre que ces enzymes peuvent présenter une variabilité non négligeable dans leur séquence primaire. Cependant, il s'avère qu'elles possèdent toutes la même conformation globale.

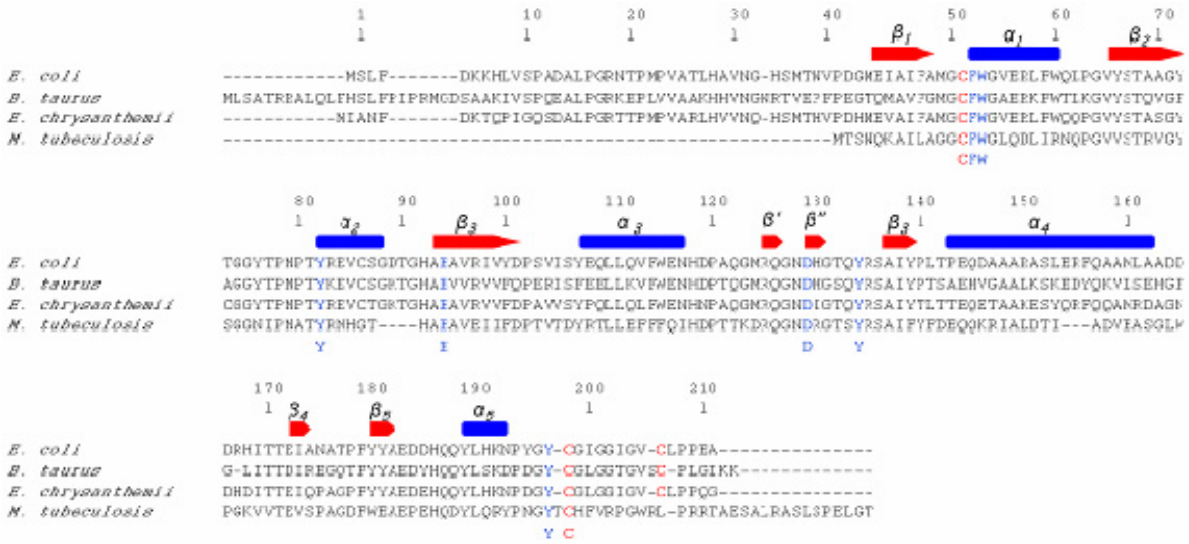


Figure II-11. : Alignement des séquences des MsrA d'E. coli, B. taurus, E. chrysanthemii, M. tuberculosis. *La numérotation des résidus est basée sur celle de la MsrA d'E. coli ; les éléments de structures secondaires représentés en bleu (brins β) et en rouge (hélices α) sont ceux de* $MsrA^{E.coli}_{Red}$ *en solution.*

En effet, la superposition des squelettes peptidiques de la structure tridimensionnelle en solution avec la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (Tete-Favier *et coll.*, 2000) aboutit à une valeur de rmsd de 1,27 Å pour les résidus 12 à 193 (*Figure II-12-A*). Exception faite de l'extrémité C-terminale, les deux conformations sont très semblables, quelques différences mineures peuvent être observées pour certaines boucles et pour le dernier tour de l'hélice α_4 qui apparaît comme moins bien structurée dans le cas de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution. La conformation du site actif est très semblable dans les deux structures (*Figure II-12-B*). Malgré quelques valeurs d'angles dièdres différentes (Tableau II-4), tous les résidus adoptent la même position relative dans l'espace, sauf le résidu Phe_{52} qui possède une position

sensiblement différente. Les chaînes latérales des résidus Trp_{53}, Asp_{129}, Tyr_{134} et Tyr_{189} adoptent la même conformation dans les deux structures tridimensionnelles, alors que les chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Tyr_{82} et Glu_{94} présentent des conformations légèrement différentes (Tableau II-4). Dans la structure cristalline, le résidu His_{186} est supposé interagir avec le résidu Trp_{53} *via* une liaison hydrogène entre les atomes $H^{\varepsilon 1}{}_{53}$ et $N^{\delta 1}{}_{186}$. Dans la structure en solution cette interaction n'est pas observée, car la valeur du facteur de protection du proton $H^{\varepsilon 1}{}_{53}$ est particulièrement faible. On peut supposer que l'ensemble de ces différences entre structure cristalline et structure en solution est dû à la présence de l'adduit diméthyl arsenate dans la structure cristalline.

L'extrémité C-terminal possède une conformation différente dans les deux structures (*Figure II-12-C*). Tout d'abord, pour la structure en solution, la chaîne latérale du résidu Tyr_{197} semble interagir avec les chaînes latérales des résidus Trp_{53} et Tyr_{189}, alors que, dans la structure cristalline, elle fait face à la cystéine 51. De plus, alors que dans la structure cristalline le segment Pro_{194}-Ile_{203} adopte une conformation étendue, l'extrémité C-terminal de la structure en solution montre un coude impliquant les résidus Pro_{194} à Tyr_{197}, cette conformation rapprochant les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ et $C^{\beta}{}_{51}$ à une distance moyenne de 8,4 ± 1,9 Å (avec une distance minimale de 6,1 Å) en comparaison de 11,2 Å dans la structure cristalline. Le reste de l'extrémité C-terminale possédant une flexibilité importante, il est hasardeux de comparer une conformation moyenne ou donnée avec la structure cristalline. Néanmoins, la position globale de cette partie de la protéine par rapport au coeur de l'enzyme est la même dans les deux structures. De plus, la cystéine 206 adopte une position comparable dans les deux structures : la distance moyenne entre les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ à $C^{\beta}{}_{206}$ de la structure en solution est de 23,7 ± 2,7 Å (avec une distance minimale de 20,8 Å), soit une distance comparable à celle trouvée dans la structure cristalline (21,2 Å).

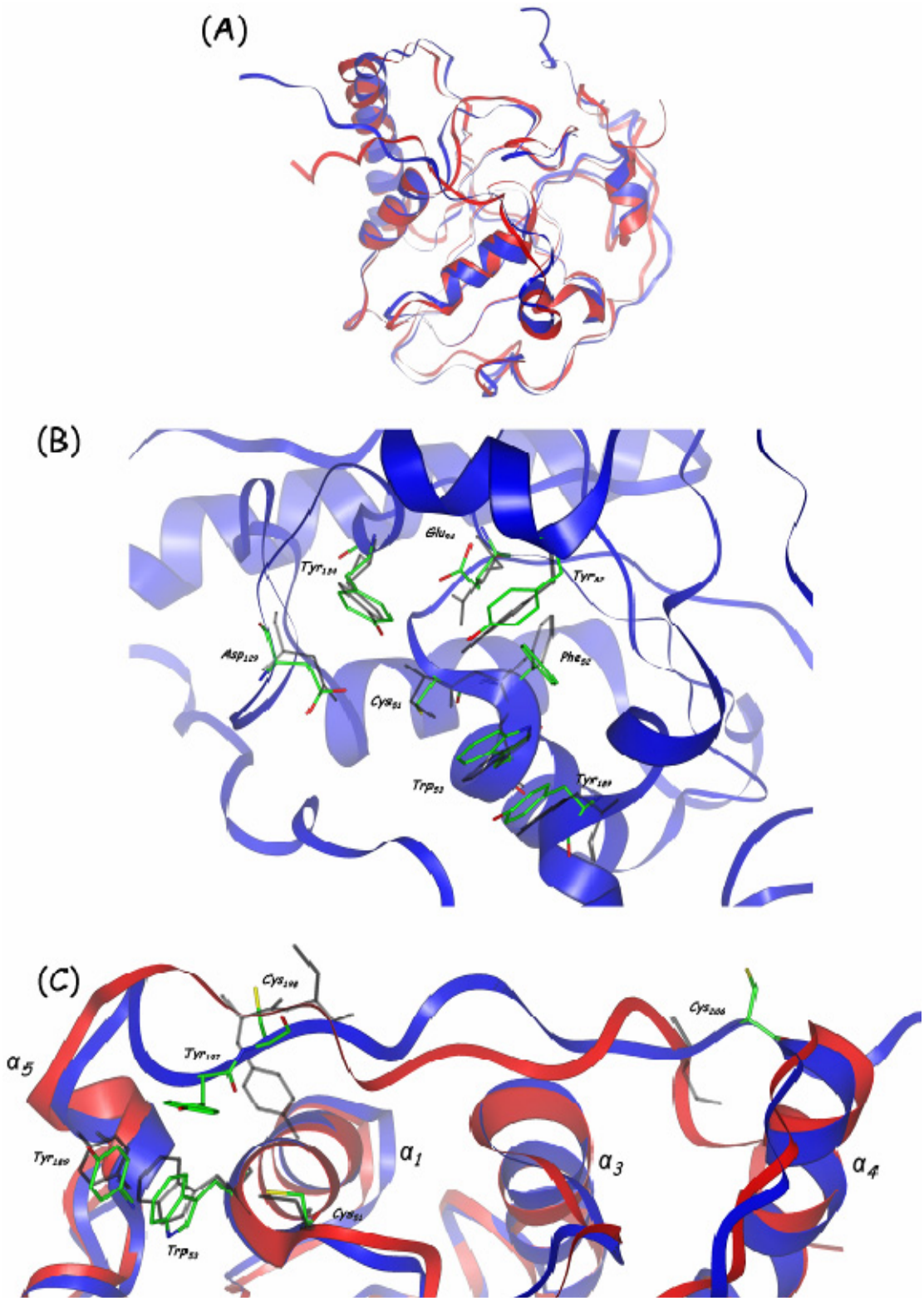


Figure II-12. : ***(A) Comparaison des conformations de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution (représentée par un ruban bleu) avec la structure cristalline (représentée par un ruban rouge). (B) Comparaison du site actif de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution avec celui de la structure cristalline :*** *le ruban bleu correspond au squelette peptidique de la structure en solution ; les résidus de la structure en solution sont représentés en vert, ceux de la structure cristalline en noir.* ***(C) Comparaison des extrémités C-terminales de la structure en solution (représentée par un ruban bleu) et de la structure cristalline (représentée par un ruban rouge)*** *; les résidus de la structure en solution sont représentés en vert, ceux de la structure cristalline en noir.*

Tableau II-4 : Valeurs des angles dièdres φ, ψ et χ^1 (en degrés) des résidus impliqués dans le site actif des différentes structures tridimensionnelles connues de MsrA.

Résidue	Angles dièdres	$MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ RMN	$MsrA^{E.coli}$ R-X	$MsrA^{B.tau}$ R-X	$MsrA^{M.tub}$ R-X
Cys_{51}	φ	-41 ± 1	-43	-60	-44
	ψ	110 ± 1	113	126	120
	χ^1	-150 ± 100	176	175	168
Phe_{52}	φ	-83 ± 3	-66	-70	-72
	ψ	-3 ± 5.1	-8	-11	-16
	χ^1	56 ± 11	54	55	51
Trp_{53}	φ	-70 ± 3	-63	-63	-59
	ψ	-58 ± 4	-52	-60	-48
	χ^1	-72 ± 8	-73	-60	-57
Tyr_{82}	φ	-54 ± 5	-55	-51	-56
	ψ	-42 ± 7	-45	-44	-46
	χ^1	162 ± 3	-173	-177	-160
Gu_{94}	φ	-75 ± 6	-72	-72	-67
	ψ	117 ± 4	131	127	128
	χ^1	-109 ± 36	-79	-73	-71
Asp_{129}	φ	-109 ± 5	-99	-93	-85
	ψ	133 ± 10	113	113	113
	χ^1	-68 ± 31	-63	-68	-61
Tyr_{134}	φ	-105 ± 10	-104	-112	-113
	ψ	43 ± 11	9	11	12
	χ^1	-75 ± 6	-56	-58	-53
Tyr_{195}	φ	-103 ± 0,5	-77	-95	-98
	ψ	12 ± 10	165	13	14
	χ^1	-31 ± 85	-62	-65	-56
Gly_{196}	φ	-68 ± 10	-71	-71	-70
	ψ	-161 ± 7	133	175	168
Tyr_{197}	φ	-81 ± 28	-136	-59	-57
	ψ	124 ± 10	119	121	135
	χ^1	-114 ± 84	-172	179	169
Cys_{198}	φ	-129 ± 10	-131	-124	-126
	ψ	166 ± 96	46	17	17
	χ^1	-62 ± 70	-53	59	80
Cys_{206}	φ	-85 ± 30	-99	-103	
	ψ	128 ± 50	144	126	
	χ^1	-102 ± 68	-67	-179	

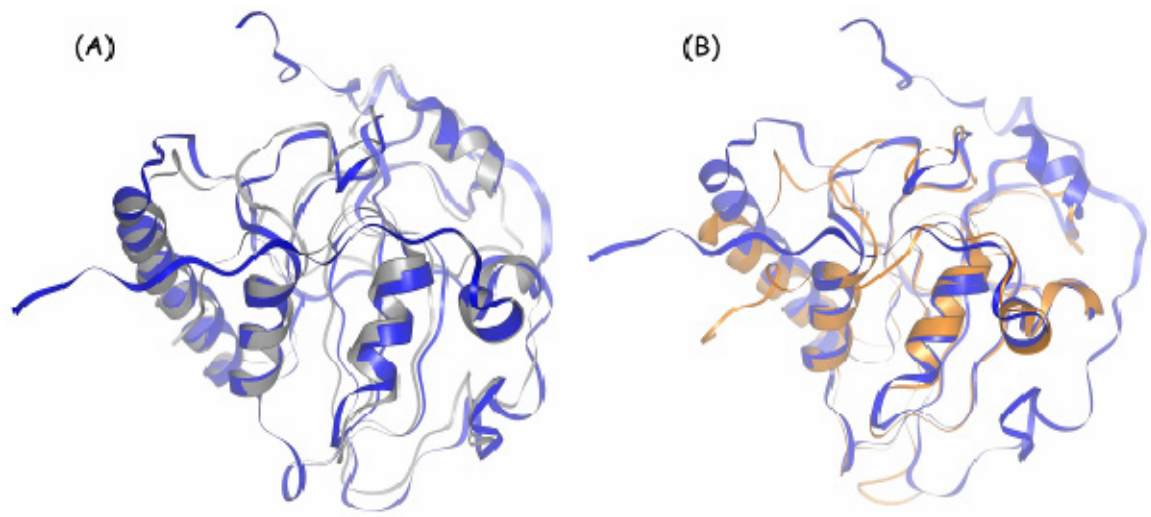


Figure II-13. : ***(A) Superposition des squelettes peptidiques de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution (ruban bleu) et de MsrA$^{B.tau}$ (ruban gris), qui aboutit à un rsmd de 1,24 Å sur 186 résidus. (B) Superposition des squelettes peptidiques de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution (ruban bleu) et de MsrA$^{M.tub}$ (ruban orange), qui aboutit à un rsmd de 1,22 Å sur 141 résidus***

La superposition du squelette peptidique de la structure en solution de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ avec celui de la structure cristalline de Msra$^{M.tub}$ (44 % d'identité de séquence avec MsrA$^{E.coli}$) aboutit à un rmsd de 1,22 Å sur 141 résidus, et 1,24 Å sur 186 résidus avec celle de MsrA$^{B.tau}$ (61 % d'identité de séquence avec MsrA$^{E.coli}$). Exception faites de parties « manquantes » de MsrA$^{M.tub}$, la structure en solution de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ possède la même conformation globale que les structures cristallines de MsrA$^{B.tau}$ et MsrA$^{M.tub}$ (*Figure II-13*).

Contrairement à la structure cristalline de MsrA$^{E.coli}$, les structures cristallines de MsrA$^{B.tau}$ et MsrA$^{M.tub}$ possèdent le même coude, impliquant les résidus Pro$_{194}$ à Tyr$_{197}$, que la structure en solution de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ (*Figure II-14*). En effet, les valeurs des angles de torsion φ et ψ pour les résidus Tyr$_{195}$, Gly$_{196}$, Tyr$_{197}$ et Cys$_{198}$ de la structure en solution de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ sont plutôt proches des valeurs mesurées pour les structures cristallines de MsrA$^{B.tau}$ et MsrA$^{M.tub}$ (Tableau II-4). De part la présence de ce coude dans les structures cristallines de MsrA$^{B.tau}$ et MsrA$^{M.tub}$, la distance entre les atomes C^{β}_{51} et C^{β}_{198} de MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ en solution (8,4 ± 1,9 Å) est comparable avec celle mesurée pour la structure cristalline de MsrA$^{B.tau}$ (8 Å). Dans le cas de la structure cristalline de MsrA$^{M.tub}$, la cystéine 198 étant en position *i+2* par rapport à la tyrosine 197, la distance entre les atomes C^{β}_{51} et C^{β}_{198} (6,6 Å) n'est pas comparable avec celles mesurées dans les autres structures tridimensionnelles. Néanmoins, pour la structure en solution, la chaîne latérale du résidu Tyr$_{197}$ possède une conformation différente de celles observées dans les structures cristallines de MsrA$^{B.tau}$ et MsrA$^{M.tub}$. En effet, dans la structure en solution, elle interagit avec les chaînes latérales des résidus Trp$_{53}$ et Tyr$_{189}$, alors que dans les structures cristallines, elle fait face au site actif,

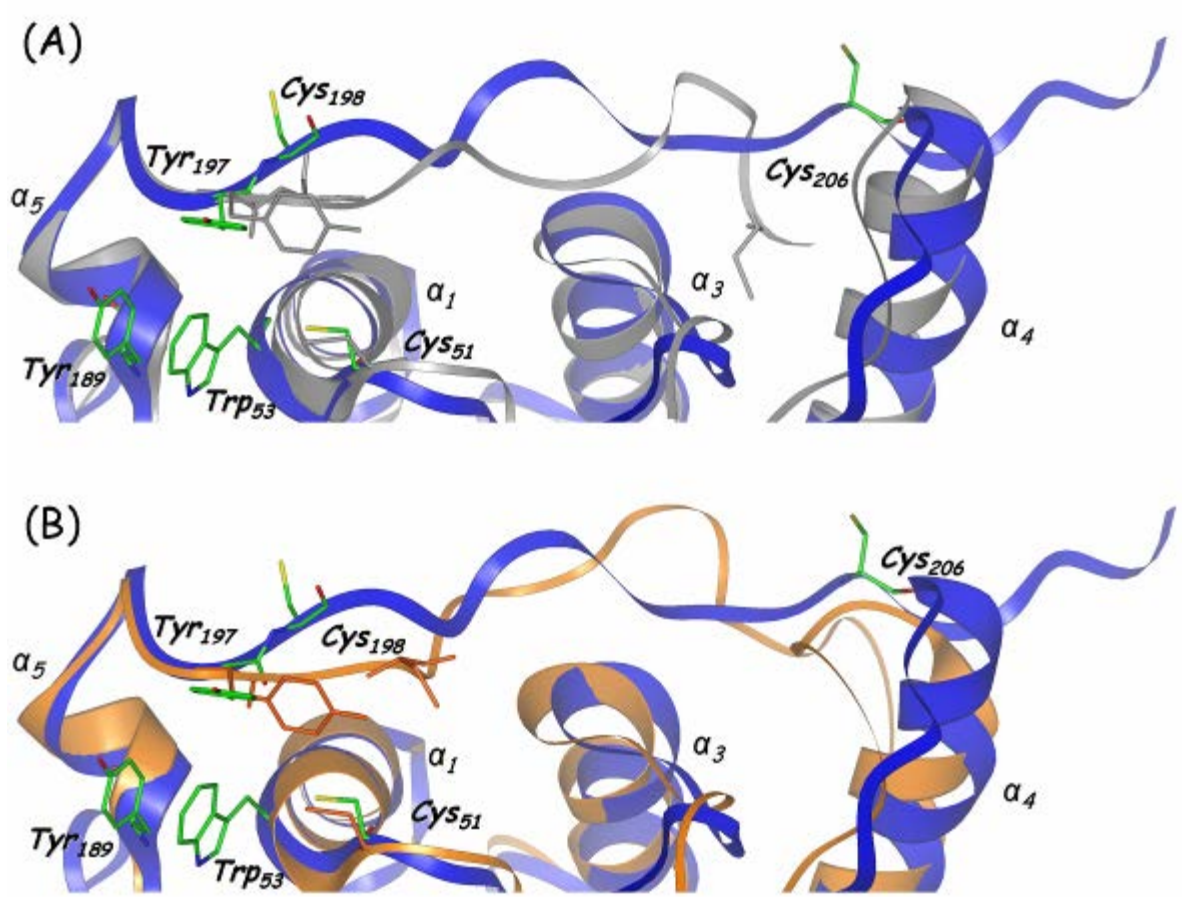


Figure II-14. : (A) Comparaison de l'extrémité C-terminale de MsrA$^{E.coli}{}_{Red}$ en solution (ruban bleu et résidus verts) avec celle de MsrA$^{B.tau}$ (ruban et résidus gris). (B) Comparaison de l'extrémité C-terminale de MsrA$^{E.coli}{}_{Red}$ en solution (ruban bleu et résidus verts) avec celle de MsrA$^{M.tub}$ (orange)

cette différence de conformation étant peut être due à la présence d'adduit (ou complexe) dans le site actif des structures cristallines. Enfin, dans la structure cristalline de MsrA$^{B.tau}$, le reste de l'extrémité C-terminale possède une conformation légèrement différente de celle observée dans la structure en solution de MsrA$^{E.coli}{}_{\mathrm{Red}}$, bien que pour les deux structures, la position de cette partie par rapport au cœur de l'enzyme reste très semblable. La distance entre les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ et $C^{\beta}{}_{206}$ est un peu plus courte dans la structure cristalline de MsrA$^{B.tau}$ (19,4 Å) que dans la structure en solution de MsrA$^{E.coli}{}_{\mathrm{Red}}$ (23,7 ± 2,7 Å avec une distance minimale de 20,8 Å). Rappelons que MsrA$^{M.tub}$ ne possède pas de seconde cystéine de recyclage.

Enfin, la seule autre étude structurale réalisée par RMN d'une MsrA en solution porte sur celle d'*Erwinia chrysanthemii* (MsrA$^{E.chr}$, 76 % d'identité de séquence avec MsrA$^{E.coli}$). Malheureusement, les auteurs n'ont pas déposé la structure tridimensionnelle qu'ils ont déterminée dans la PDB mais la décrivent sommairement. Les auteurs signalent une conformation globale identique à celle de la structure cristalline de MsrA$^{E.coli}$. De plus, ils ont mesuré une distance entre les atomes $C^{\beta}{}_{51}$ et $C^{\beta}{}_{198}$ de 7,9 Å, ce qui est une distance similaire à celle mesurée pour MsrA$^{E.coli}{}_{\mathrm{Red}}$ en solution (8,4 ± 1,9 Å). D'autre part, pour MsrA$^{E.chr}$, les

auteurs ont indiqué que la chaîne latérale du résidu Cys_{198} est orientée vers le site actif, alors que, dans toutes les autres structures tridimensionnelles décrites, la chaîne latérale du résidu Cys_{198} pointe vers le solvant (mis à part dans le cas de $MsrA^{M.bac}$ dont le résidu Cys_{198} est en position *i+2* par rapport au résidu Tyr_{197}).

Ainsi, la comparaison de la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ avec les structures cristallines de $MsrA^{E.coli}$, $MsrA^{B.tau}$ et $MsrA^{M.tub}$ révèle que :

(i) les conformations globales de ces 4 protéines sont identiques, en solution comme à l'état cristallin.

(ii) la présence d'adduits ou de complexes (mimant le complexe enzyme/substrat ou l'intermédiaire covalent enzyme/substrat) dans les structures cristallines semble être à l'origine des différences de conformation des chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Tyr_{82}, Glu_{94} et Tyr_{197} observées entre la structure en solution et les structures cristallines. Ce qui indique que la formation du complexe enzyme/substrat provoque un changement de conformation de ces résidus.

(iii) en solution comme à l'état cristallin, la conformation du segment Pro_{194} à Tyr_{197} de l'extrémité C-terminale montre un coude qui approche les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ et $C^{\beta}{}_{51}$ à une distance de l'ordre de 8 Å (8,4 ± 1,9 Å pour $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ en solution, 8 Å pour $MsrA^{B.tau}$, $MsrA^{M.tub}$ étant un cas particulier), ce qui reste une distance trop importante pour permettre la formation d'un pont disulfure sans d'importants mouvements ou réarrangements conformationnels. La différence de conformation du segment Pro_{194} à Tyr_{197} observée pour la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}$, ainsi que la distance $dC^{\beta}{}_{51}$-$C^{\beta}{}_{198}$ plus importante (11,2 Å) en comparaison avec les autres structures tridimensionnelles (en solution comme à l'état cristallin), pourraient être la conséquence de la présence dans la maille cristalline d'un pont disulfure non natif entre la Cys_{206} et la Cys_{86} d'un monomère voisin de la maille cristalline.

(iv) la conformation du reste de l'extrémité C-terminal (à partir du résidu Val_{205}) montre une variabilité importante au sein des structures cristallines mais aussi au sein de l'ensemble des structures représentatives de la conformation de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ en solution. Cette observation suggère que cette partie de la protéine est animée de mouvements, bien que la distance entre les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ et $C^{\beta}{}_{206}$ reste de l'ordre de 20 Å (23,7 ± 2,7 Å pour $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$, 19,4 Å pour la structure cristalline de $MsrA^{B.tau}$ et 21,2 Å pour la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}$), ce qui reste une distance trop importante pour permettre la formation d'un pont disulfure sans réarrangement conformationnel important.

II-2.4 Etude dynamique

L'étude structurale de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ n'a pas permis d'expliquer la formation des ponts disulfure Cys_{51}-Cys_{198} et Cys_{198}-Cys_{206}. Néanmoins, l'examen de l'ensemble des conformations représentatives de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution indique que les segments Gly_{196}-Gly_{199} et Val_{205}-Glu_{211} présentent une variabilité importante de leurs conformations. Cette observation suggère l'existence d'une flexibilité et d'éventuels mouvements qui pourraient permettre de rapprocher les différentes cystéines. L'étude de la dynamique du squelette peptidique de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution, grâce à la mesure des vitesses de relaxation transversale (R_2) et longitudinale (R_1) des noyaux ^{15}N, ainsi que de l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N, devrait permettre de caractériser ces mouvements putatifs, tant du point de vue de leur amplitude que de leur gamme de vitesse.

II-2.4.1 Vitesses de relaxation et paramètre nOe hétéronucléaire

La mise en œuvre d'expériences classiques décrites par Farrow et coll. (Farrow *et coll.*, 1994) a permis de déterminer les vitesses de relaxation longitudinale (R_1) et transversale (R_2) des noyaux ^{15}N, ainsi que la paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (nOe) pour la plupart des groupes amides secondaires du squelette peptidique (*Figure II-15*). Par suite de problèmes de recouvrements de certaines résonances, les valeurs des R_1, R_2 et nOe n'ont pas pu être déterminées pour certaines corrélations du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. De plus, peu d'informations sont disponibles sur le segment Pro_{208} à Ala_{211} compte tenue de la présence des prolines 208 et 209 (qui ne possèdent pas de groupe amide secondaire).

Ces données sont brutes et nécessitent d'être interprétées, selon un modèle de dynamique moléculaire, pour en extraire les paramètres décrivant la mobilité interne. Néanmoins, il est possible de faire plusieurs observations préliminaires.

En premier lieu, les valeurs moyennes des vitesses de relaxation des noyaux ^{15}N sont R_1 = 1,1 s^{-1} et R_2 = 18,9 s^{-1}, le rapport R_2/R_1 moyen est alors de 17,8 ± 2,6. Ce rapport correspond à un temps de corrélation global τ_c de 13,3 ± 0,5 ns. Compte tenu de la masse moléculaire de $MsrA^{E.coli}$ (23 kDa), le temps de corrélation global théorique est 9,2 ns, si on suppose que la protéine est globulaire. Le temps plus important, calculé à partir du rapport R_2/R_1, indique que $MsrA^{E.coli}_{Red}$ n'a pas une forme totalement globulaire et possède un volume hydrodynamique important, ce qui est en accord avec la structure tridimensionnelle en solution déterminée précédemment. Ce temps de corrélation important pourrait aussi indiquer une dimérisation de la protéine en solution, mais la mesure du coefficient de diffusion

translationnelle de ces protéines révèle que ce n'est pas le cas (*cf.* § II-2.1.2). Toutefois, l'hypothèse d'une auto association de faible affinité n'est pas à exclure, la valeur du coefficient de diffusion translationnelle n'étant que très peu sensible à un équilibre monomère/dimère.

En second lieu, certains segments de la protéine présentent des valeurs remarquables de R_1, R_2 et nOe. C'est le cas de l'extrémité N-terminale qui possède des valeurs de R_1 importantes (jusqu'à 1,65 s^{-1}) et des valeurs de nOe particulièrement faibles (de 0,04 à 0,75) pour les résidus Phe_3 à Asp_{13}, ces valeurs indiquant que l'extrémité N-terminale, jusqu'au résidus Asp_{13}, est peu structurée. Le segment Tyr_{195} à Gly_{202}, qui comprend la première cystéine de recyclage Cys_{198}, possède lui aussi des valeurs de R_1 élevées (de 1,13 à 1,45 s^{-1}, le résidu Cys_{198} présentant la valeur de R_1 la plus élevée) et des valeurs de nOe faibles (0,78 à 0,5, le résidu Ile_{200} présentant la valeurs de nOe la plus faible). Ces observations révèlent que pour le segment Tyr_{195}-Gly_{202}, les vecteurs NH sont animés d'une dynamique d'amplitude moyenne (comme le montrent les faibles valeurs de nOe), dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde (comme l'indiquent les valeurs élevées de R_1). Il est intéressant de constater que le résidu possédant la valeur de R_1 la plus élevée (Cys_{198}) n'est pas celui qui possède la valeur de nOe la plus faible (Ile_{200}). Compte tenu de ces observations préliminaires, il est particulièrement intéressant d'interpréter ces données selon le modèle de dynamique interne de Lipari-Szabo.

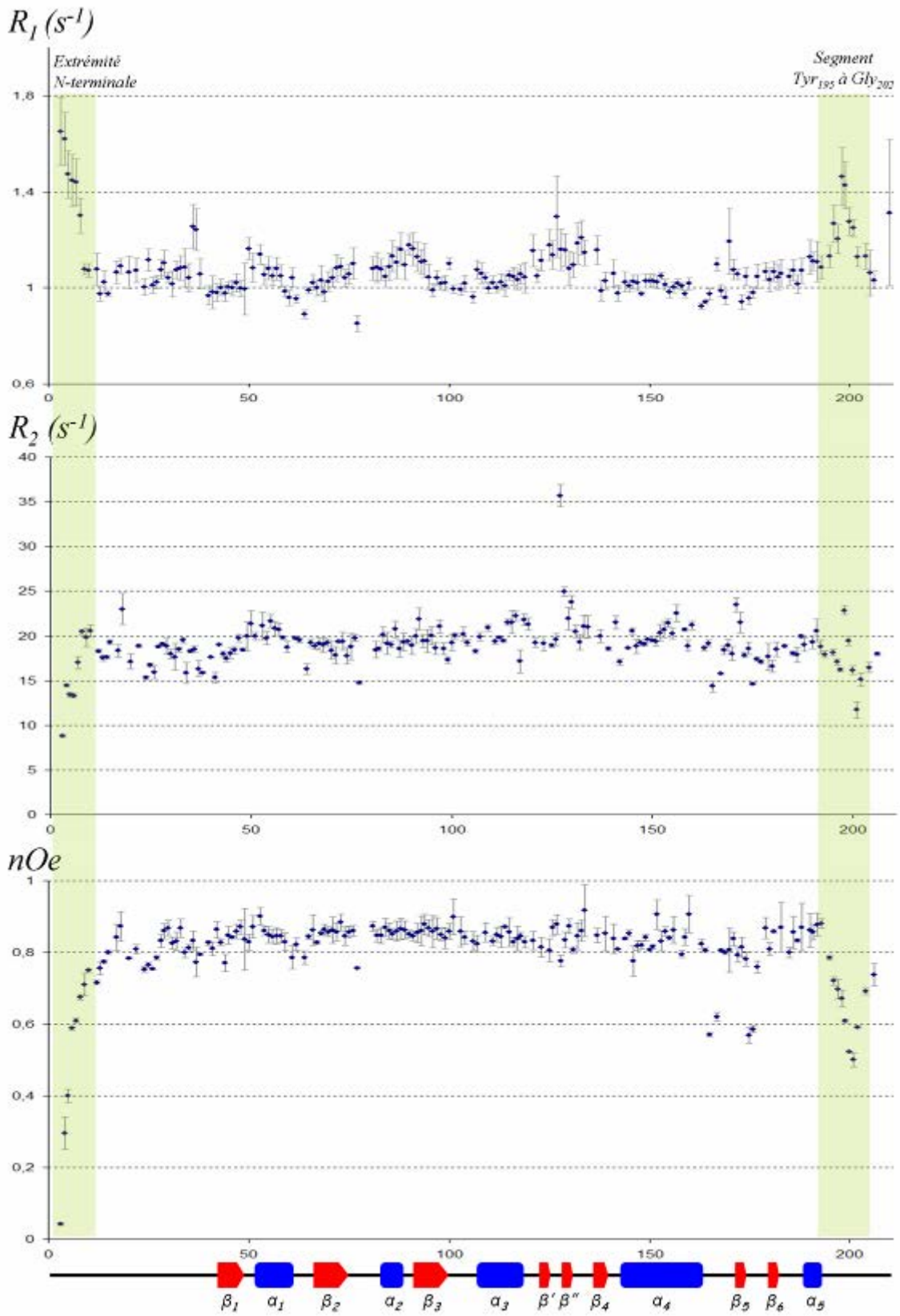


Figure II-15. : ***Distribution des vitesses de relaxation longitudinale (R_1) et transversale (R_2) des noyaux ^{15}N et effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (nOe) le long de la séquence peptidique de $MsrA^{E.coli}_{Red}$.*** *Les intervalles d'erreur sont représentés par des barres grises ; les zones d'intérêt sont mises en évidence par un fond vert.*

II-2.4.2 Mobilité interne

Les valeurs de R_1, R_2 et du paramètre nOe ont permis de déterminer la dynamique interne de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution selon le formalisme de Lipari-Szabo en utilisant un modèle de réorientation anisotrope. Les valeurs des rapports R_2/R_1 ont permis de déterminer les tenseurs de diffusion rotationnelle décrivant le modèle de réorientation globale de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution (Tableau II-5)

Tableau II-5 : Modèle de réorientation globale anisotrope de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution

α (°)[a]	β (°)[a]	γ (°)[a]	Dx	Dy	Dz	τ_c[b]	χ^2/N[c]
-50 ± 43	-8 ± 29	86 ± 44	$1{,}087.10^7 \pm 2{,}9.10^5\ s^{-1}$	$1{,}267.10^7 \pm 2{,}3.10^5\ s^{-1}$	$1{,}339.10^7 \pm 2{,}9.10^5\ s^{-1}$	13,53 ns	$3{,}13.10^{-2}$

[a]*Angles polaires α, β et γ décrivant la position des tenseurs de diffusion, Dx Dy et Dz respectivement, dans le repère d'inertie moléculaire. Les intervalles d'erreur proviennent du protocole de Monte-Carlo utilisé pour extrapoler les valeurs expérimentales de R_1 et R_2.*

[b]*Temps de corrélation global anisotrope : $\tau_c = 1/(2Dz+2Dx+2Dy)$.*

[c]*N est le nombre de groupes amides utilisés pour déterminer le modèle de réorientation anisotrope de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution. Les groupes amides ont été choisis sur les critères d'une valeur de paramètre nOe supérieur à 0,8 et des valeurs de R_2/R_1 comprises dans l'intervalle défini par le rapport R_2/R_1 moyen plus ou moins sa déviation standard. Ces critères réduisent l'analyse à des résidus qui ne sont pas soumis à des mouvements trop importants ou à des phénomènes d'échange.*

Ce modèle de réorientation globale montre des niveaux d'erreur importants. Toutefois, il a permis de calculer les valeurs de paramètre d'ordre (S^2) pour chaque vecteur NH et, le cas échéant, les valeurs de temps de corrélation local (τ_e) et de contribution d'échange à la vitesse de relaxation transversale (R_2^{ech}), bien que cette analyse reste hautement qualitative, compte tenu de la mauvaise qualité du modèle de réorientation (*Figure II-16*). Les paramètres S^2 et τ_e décrivent respectivement la restriction du mouvement et la vitesse de mouvement des vecteurs NH dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde, le terme R_2^{ech} étant associé à des mouvements (généralement des phénomènes d'échange) de l'ordre de la micro à la milliseconde.

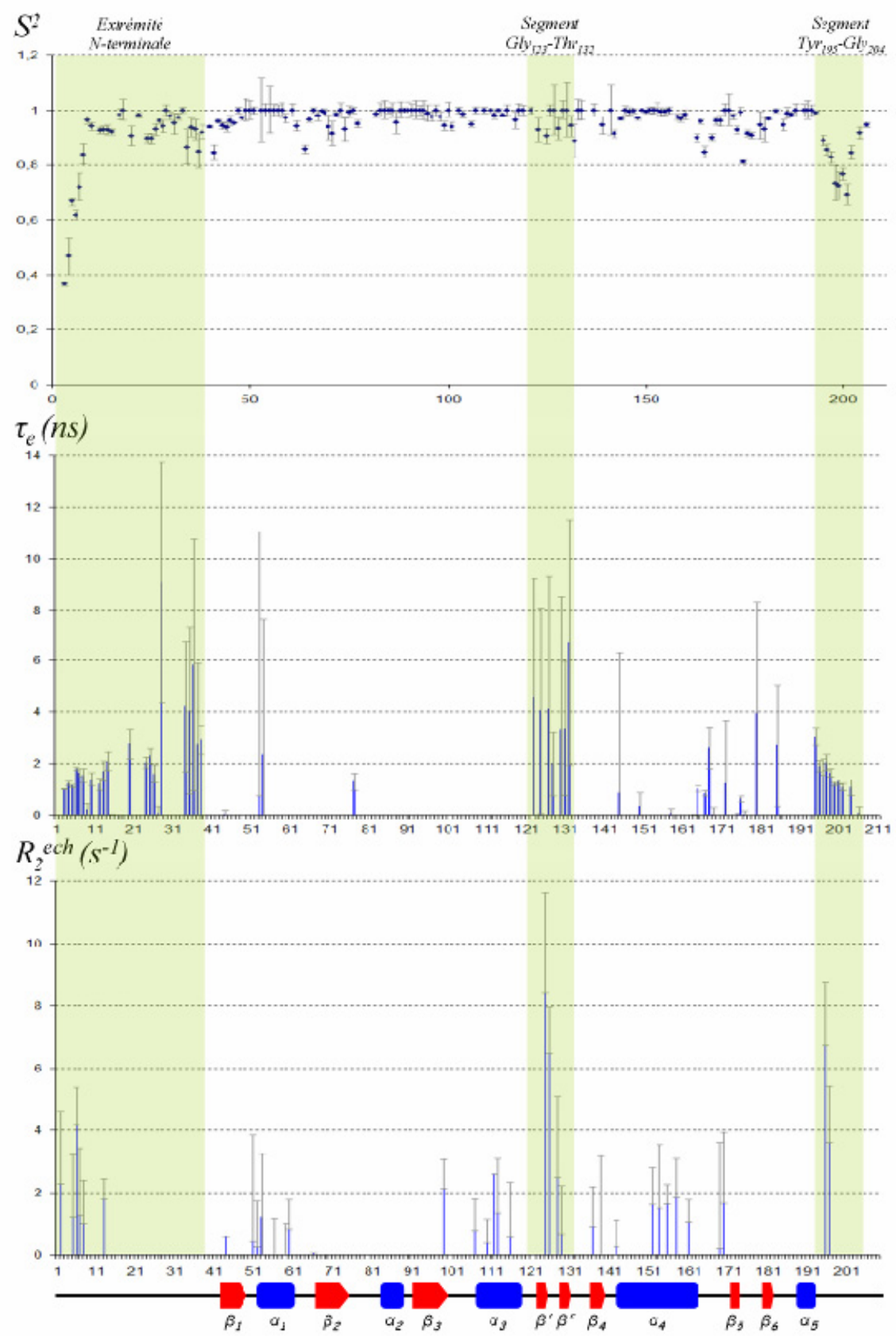


Figure II-16. : Valeurs de mobilité interne de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution. *Les valeurs de mobilité sont indiquées par un point bleu (pour les valeurs de S^2) ou une barre bleue (pour les valeurs de τ_e et R_2^{ech}) ; les intervalles d'erreur sont indiqués par des barres grises ; les zones d'intérêt sont mises en évidence par un fond vert.*

L'examen des valeurs de paramètre d'ordre indique que l'ensemble de la protéine est relativement rigide (avec des valeurs de S^2 supérieures à 0,9). Certaines valeurs de nOe sont particulièrement élevées (égale à 1), ce qui signifie que le mouvement des vecteurs NH concernés est totalement restreint. Le modèle de Lipari-Szabo conduisant à certaines approximations, ces valeurs peuvent être considérées comme des artefacts bien qu'elles indiquent, sans ambiguïté, les parties rigides de l'enzyme. Certaines boucles possèdent des valeurs de S^2 un peu plus faibles ce qui suggère une certaine flexibilité de ces segments situés entre les éléments de structure secondaire (*Figure II-16)*

Les vecteurs NH des résidus de l'extrémité N-terminale présentent des valeurs de S^2 particulièrement faibles (de 0,3 pour le résidu Phe_3 à 0,8 pour le résidu Leu_8) et associées à des valeurs de temps de corrélation local significatives (de l'ordre de 1 à 2 ns). Ce segment est ainsi animé d'une dynamique importante. De plus, certains de ces résidus ayant un terme d'échange de l'ordre de 1 à 5 s^{-1}, cette contribution est certainement due à de l'échange conformationnel associé aux mouvements de ce segment. Le reste de l'extrémité N-terminale présente des valeurs de S^2 plus faibles que pour le reste de la protéine ainsi que des valeurs de temps de corrélation local plus importantes (de 2 à 9 ns) et ce, jusqu'au résidu Val_{38} qui précède de quelques résidus le début du premier élément de structure secondaire (le brin β_1). Ainsi, l'ensemble de l'extrémité N-terminale (jusqu'au résidu Val_{38}) est caractérisé par une certaine flexibilité, le segment Ser_1 à Leu_8 présentant la dynamique la plus importante (*Figure II-17-A*). Cette observation est en accord avec les valeurs importantes de rmsd mesurées sur l'ensemble des 20 structures calculées de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ pour les résidus Ser_1 à Val_{38}.

Les vecteurs NH des résidus du segment Gly_{123} à Thr_{132}, qui comprend le petit feuillet *β'-β''* surplombant le site actif, possèdent eux aussi des valeurs de S^2 plus basses que celles observées pour le reste de la protéine. A ces valeurs de S^2 sont associés des valeurs de temps de corrélation local de l'ordre 2 à 6 ns et des contributions d'échange particulièrement importantes pour les résidus Asn_{128} (7,2 s^{-1}), His_{130} (3,8 s^{-1}) et Gly_{131} (1,5 s^{-1}). Ces données suggèrent que ce segment est animé d'une dynamique dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde mais dont les mouvements restent relativement restreints (S^2 de l'ordre de 0,9). A ces mouvements, semble être associé un phénomène d'échange, probablement conformationnel, particulièrement localisé au niveau du résidu Asn_{128} qui se trouve à la pointe de la boucle entre les brins *β'* et *β''*. Ces données sont en bon accord avec les valeurs de rmsd plutôt élevées mesurées pour ce segment et avec les faibles valeurs de facteur de protection mesurées pour les groupes amides des résidus formant le feuillet *β'-β''*. Cet ensemble d'informations indique que ce feuillet, surplombant le site actif, est flexible, animé de

mouvements (d'échange) dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde et faiblement stabilisé.

Les vecteurs NH des résidus de l'extrémité C-terminale (résidus Tyr_{195} à Gly_{204}) possèdent des valeurs de S^2 plus faibles que pour le reste de la protéine (de 0,82 à 0,72). Ces faibles valeurs sont associées à des valeurs de temps de corrélation local de 1 à 2 ns ainsi qu'à des contributions d'échange importantes pour les résidus Cys_{198} (7,7 s^{-1}) et Gly_{199} (4,5 s^{-1}). Ces observations indiquent que ce segment de l'extrémité C-terminale est animé d'une dynamique relativement importante (S^2 de l'ordre de 0,7) dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde et associée à des phénomènes d'échange conformationnel, les mouvements les plus importants étant localisés au niveau des résidus Cys_{198} et Gly_{199} (avec des valeurs de S^2 de 0,73 et 0,72 respectivement). Ces résidus présentent, de plus, des contributions d'échange importantes indiquant un phénomène d'échange dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde. Ces observations sont en bon accord avec les valeurs de rmsd importantes observées pour ces résidus. Bien que, compte tenu des valeurs de S^2 (qui restent supérieurs à 0,7) et du bon accord entre les données dynamiques et structurales (en particulier les valeurs de rmsd), cette dynamique complexe ne permet pas, *a priori*, de rapprocher suffisamment la cystéine 198 de la cystéine 51, pour permettre la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Peu d'informations sont disponibles sur le reste de l'extrémité C-terminale (résidus Val_{205} à Ala_{211}), mais compte tenu des valeurs de rmsd observées pour ce segment, il est fort probable que cette partie soit elle aussi animée d'une dynamique importante.

Enfin, de nombreux segments de l'enzyme présentent de faibles contributions d'échange (résidus Trp_{53} à Val_{55}, Gln_{112} à His_{118} et Glu_{154} à Met_{160}). La mise en évidence des résidus sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure II-17-B*) révèle que ces résidus sont spatialement proches de l'extrémité C-terminale, voire, en interaction avec cette dernière. Cette observation suggère que les mouvements de l'extrémité C-terminale sont responsables des contributions d'échange mesurées pour ces résidus et particulièrement pour les derniers tours de l'hélice α_4 (résidus Arg_{155} à Ala_{162}) qui présentent des valeurs de rmsd importantes ainsi que des valeurs de facteurs de protection faibles. Ainsi, les mouvements de l'extrémité C-terminale seraient susceptibles de perturber les zones du cœur de la protéine avec lesquelles elle interagit, et seraient ainsi responsables de la faible stabilité des deux derniers tours de l'hélice α_4.

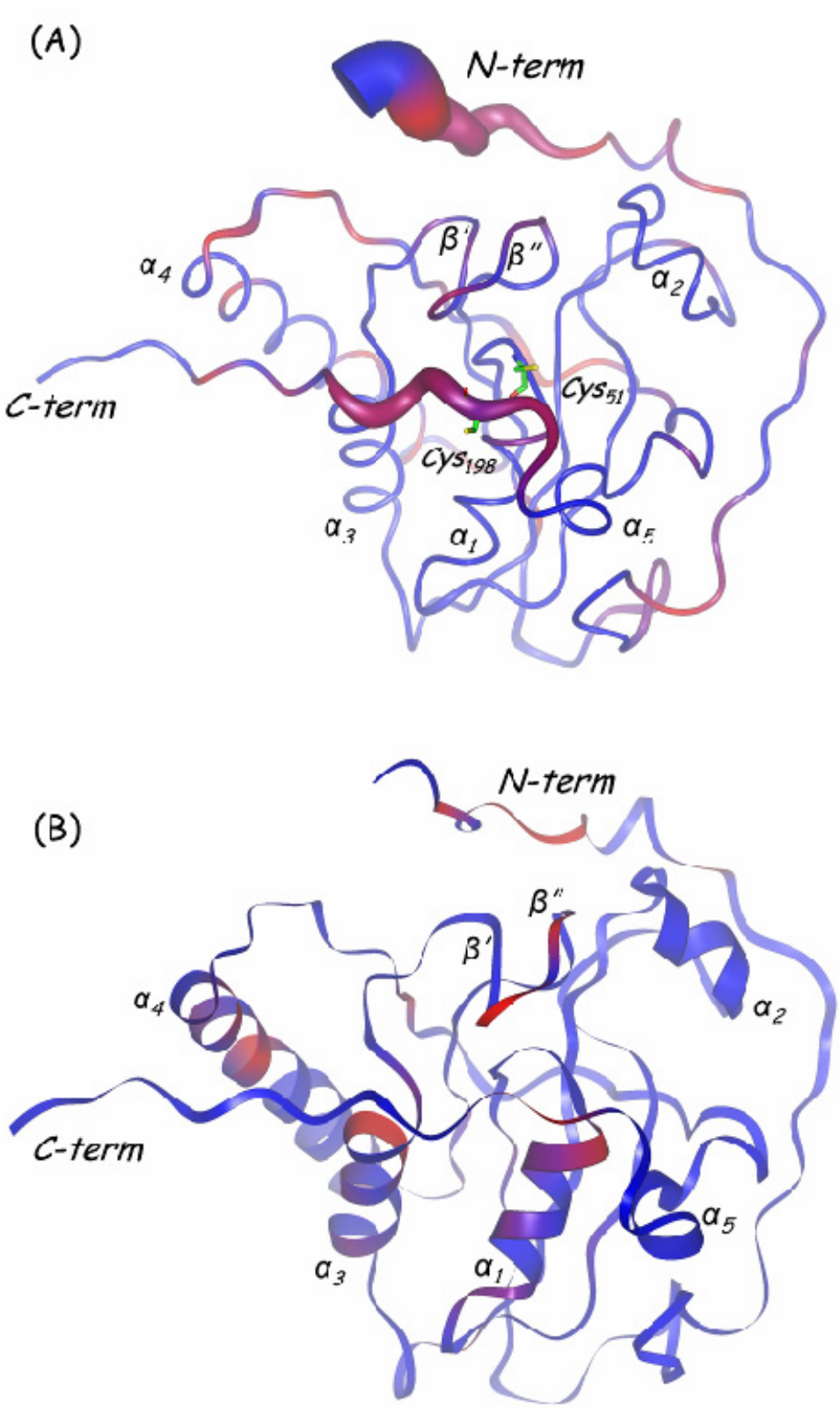


Figure II-17. : Représentation de la mobilité interne sur la structure la plus représentative de la conformation de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution. *(A) S^2 et τ_e : la taille du ruban représente l'amplitude des mouvements (plus la valeur de S^2 est faible, plus le ruban est épais) ; la couleur représente la vitesse des mouvements (l'intensité du rouge dépend de la valeur de τ_e). (B) R_2^{ech} : la couleur du ruban représente la valeur de R_2^{ech}.*

Ainsi, l'extrémité C-terminale de l'enzyme est animée d'une dynamique relativement importante (dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde) mais dont l'amplitude ne semble pas suffisante pour permettre le rapprochement des deux cystéines. Néanmoins, il est satisfaisant de remarquer le bon accord entre ces données dynamique et les autres données expérimentales (telles que le rmsd mesuré sur l'ensemble des structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution, ainsi que les facteurs de protection des groupes amides). De plus, cette étude confirme les propriétés dynamiques de l'extrémité N-terminale, celles du segment Gly_{123}-Thr_{132}, qui est principalement animé de mouvements lents (dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde), et celles des deux derniers tours de l'hélice α_4.

II-2.5 Relation structure fonction

L'étude structurale et dynamique de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution n'a pas permis d'expliquer le mécanisme de formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Toutefois, la fonction première de la forme réduite de l'enzyme n'est pas de former ce pont disulfure, mais d'interagir avec le substrat dans le but de réduire la fonction sulfoxyde. Il se trouve que la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution répond bien à cette exigence.

En effet, la comparaison de la structure en solution avec les structures cristallines indique que la formation du complexe enzyme/substrat génère des changements conformationnels, plus ou moins importants, pour les chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Tyr_{82}, Glu_{94} et Tyr_{197}. De plus, les chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Glu_{94}, Asp_{129}, Cys_{198} et Tyr_{197} semblent être plus flexibles (comme le montre la variabilité importante des valeurs de χ^1). Enfin, l'étude de la dynamique du squelette peptidique a montré que le segment Gly_{123}-Thr_{132} est soumis à des phénomènes d'échange et que le segment Tyr_{195} à Gly_{204} est animé d'une dynamique relativement importante. Ces observations indiquent que le site actif de MsrA, en particulier les résidus les plus exposés en surface (segment Gly_{123}-Thr_{132} et Tyr_{195}-Gly_{204}), est flexible. Cette flexibilité génère l'adaptabilité conformationnelle nécessaire à l'interaction avec le substrat sulfoxyde. Cette adaptabilité est particulièrement importante dans le cas de MsrA qui est capable de réduire une grande variété de substrats (de la MetSO libre à la MetSO située en surface d'une protéine). Ainsi, $MsrA^{E.coli}_{Red}$ possède les propriétés structurales et dynamiques nécessaires à sa fonction, celle d'interagir spécifiquement avec l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde (interaction impliquant les résidus aromatiques plutôt rigides du site actif), mais aussi d'être peu spécifique vis-à-vis du squelette peptidique dont fait partie le résidu MetSO (interaction impliquant les résidus les plus flexibles et animés d'une dynamique, en surface du site actif), ce qui permet à MsrA de

réduire une grande variété de substrats sulfoxydes. Le rapprochement des deux cystéines et la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} doivent donc nécessairement se produire lors d'une étape du cycle catalytique postérieure à la formation du complexe enzyme/substrat.

II-2.6 Conclusion

Nous avons réalisé l'étude structurale et dynamique d'une protéine de 23 KDa grâce à un spectromètre à 600 MHz, en utilisant les classiques contraintes de distances dérivant de la mesure des effets nOe, et ce malgré les nombreux recouvrements observés et la qualité médiocre du signal pour certaines parties de l'enzyme.

Cette étude a permis de constater que, malgré les différences conformationnelles entre la structure en solution et la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$, les distances entre les différentes cystéines restent trop importantes pour permettre la formation des ponts disulfure intervenant lors de l'activité catalytique de cette enzyme. De plus, l'étude de la dynamique du squelette peptidique a montré que les mouvements, dont est animée l'extrémité C-terminale, ne sont pas d'une amplitude suffisante pour permettre le rapprochement des cystéines et la formation des ponts disulfure, qui doivent donc se produire lors d'une étape du cycle catalytique postérieure à la formation du complexe enzyme/substrat. Toutefois, cette étude a révélé que les conformations globales des différentes structures tridimensionnelles de MsrA connues sont identiques, et qu'en solution comme à l'état cristallin, la conformation du segment Pro_{194} à Tyr_{197} de l'extrémité C-terminale présente un coude qui approche les atomes $C^{\beta}{}_{198}$ et $C^{\beta}{}_{51}$ à une distance de l'ordre de 8 Å. La différence de conformation du segment Pro_{194} à Tyr_{197}, observée pour la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}$ par rapport aux autres structures tridimensionnelles, pourrait être la conséquence de la présence dans la maille cristalline d'un pont disulfure non natif entre la Cys_{206} et la Cys_{86} d'un monomère voisin de la maille cristalline. Enfin cette étude a permis de décrire le site actif de MsrA dans un état natif (sans adduit ou complexe mimant la présence du substrat) et a montré que cette enzyme possède les propriétés structurales et dynamiques nécessaires à sa fonction de reconnaissance du substrat sulfoxyde et en bon accord avec ses propriétés de spécificité.

Ainsi la connaissance de la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ a permis de mieux comprendre les propriétés structurales mais surtout dynamiques de cette enzyme. Ces informations étant difficilement accessibles à partir des différentes structures cristallines connues.

II-3 Etude structurale et dynamique d'une forme oxydée (Cys_{51}-Cys_{198}) de la MsrA d'Escherichia coli

L'étude de la structure tridimensionnelle et de la dynamique en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$, même si elle a apporté de nombreuses informations sur les propriétés des MsrA en solution, n'a pas révélé les mécanismes moléculaires permettant la formation des deux ponts disulfure (Cys_{51}-Cys_{198} et Cys_{198}-Cys_{206}) intervenant lors du processus catalytique. Dans ce contexte, l'étude structurale et dynamique d'une forme oxydée de $MsrA^{E.coli}$ (celle contenant le premier pont disulfure : Cys_{51}-Cys_{198}) devrait permettre d'observer les différences structurales et dynamiques engendrées par la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}, mais aussi d'apprécier le changement conformationel nécessaire au rapprochement de la cystéine 198 vers la cystéine 51. De plus, cette étude pourrait apporter des informations sur la formation du second pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}, dernière étape avant la régénération de l'activité réductase (*via* la réduction du pont Cys_{198}-Cys_{206} par la thiorédoxine) pour les MsrA à deux cystéines de recyclage. Enfin, dans le cas des MsrA à une cystéine de recyclage (telle que $MsrA^{M.tub}$), la régénération de l'activité réductase intervient à ce stade du cycle catalytique, par le biais de la réduction du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} par la thiorédoxine. Le pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} étant réductible par la thiorédoxine chez les MsrA à deux cystéines de recyclage, cette étude pourrait permettre de mettre en évidence les déterminants structuraux impliqués lors de l'interaction $MsrA_{C51\text{-}C198}$/Trx.

II-3.1 Etude préliminaire

Dans le but d'obtenir spécifiquement la forme oxydée contenant le pont disulfure C_{51}-C_{198}, une MsrA mutée, où les résidus Cys_{86} et Cys_{206} ont été remplacés par des sérines, a été

préparée par mutagenèse dirigée (*cf.* annexe I) et produite au MAEM. En effet, la sérine ne possède pas la même réactivité que la cystéine, mais les chaînes latérales de ces acides aminés sont isostères, ce qui laisse supposer que le remplacement d'une cystéine par une sérine ne devrait pas perturber de manière importante la conformation locale de la protéine. Néanmoins, compte tenu du caractère plus hydrophile de la chaîne latérale de la sérine, ce type de mutation n'est à envisager que pour des cystéines situées dans un environnement ne possédant pas un caractère trop hydrophobe. Les cystéines 86 et 206 étant situées en surface de la protéine, les remplacer par des sérines ne devrait pas perturber outre mesure la conformation locale de la protéine.

II-3.1.1 Le mutant C86S, C206S réduit

Un échantillon marqué ^{15}N du mutant C86S, C206S réduit de $MsrA^{E.coli}$ a été préparé (1mM, 10 mM de KH_2PO_3, 50 mM de DTT, pH 7,1) dans le but d'observer les éventuelles perturbation générées par ces mutations. Ces perturbations ont été estimées par l'examen du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. Ce spectre a été aisément attribué par analogie avec le spectre de la protéine sauvage, la plupart des noyaux ayant des valeurs de déplacement chimique proches. Seules les résonances des résidus Ser_{86} et Ser_{206} n'ont pu être attribuées qu'*a posteriori* grâce à l'attribution séquentielle du squelette peptidique du double mutant oxydée ($MsrA^{E.coli}{}_{C51-C198}$, *cf.* ci après) (*Figure II-18*).

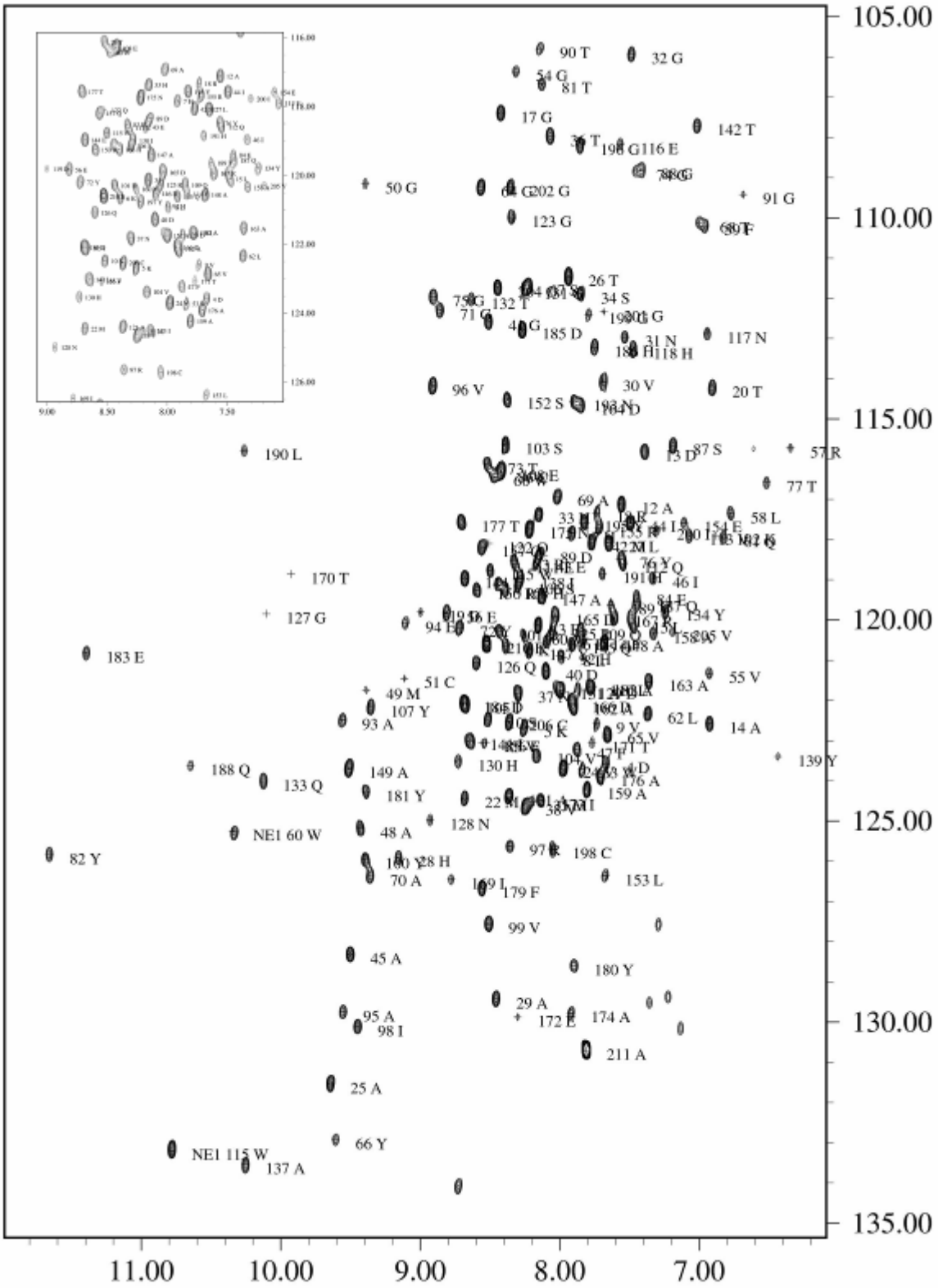


Figure II-18. : Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de la MsrA C86S C206 réduite ^{15}N, 1 mM, 600 MHz et 298 K, pH 7,1.

Les perturbations d'environnement chimique générées par les mutations sont estimées en comparant les différences de déplacement chimique des groupes amides entre la protéine sauvage et la protéine mutée grâce à une valeur consensuelle Δδ dont l'expression est :

$$\Delta\delta = \frac{\left|\Delta\delta^{15}N\right|}{f} + \left|\Delta\delta^{1}H\right| \qquad \textit{Eq. II-1}$$

où *f* est un facteur de proportionnalité (Williamson *et coll.*, 1997). En effet, les corrélations du spectre HSQC s'étendent sur une largeur spectrale (LS) plus importante dans la dimension de l'azote ^{15}N (de 104 à 135 ppm, soit LS(^{15}N) = 29 ppm) que dans la dimension du ^{1}H (de 6,3 à 11,6 ppm, soit LS(^{1}H) = 5,3 ppm). Ainsi, pour prendre en compte les changements de déplacement chimique dans la dimension de l'azote ^{15}N sans les surévaluer par rapport aux changements dans la dimension du ^{1}H, Δδ^{15}N est corrigé d'un facteur de proportionnalité *f* égal à LS(^{15}N)/LS(^{1}H), soit 5,47 (29/5,3).

La valeur de Δδ pour chaque groupe amide secondaire du squelette peptidique a été déterminée et est représentée Figure II-19-A. On estime qu'une valeur de Δδ supérieure à 0,1 ppm indique un changement d'environnement chimique représentatif. Les mutations C86S et C206S affectent significativement les résidus Tyr_{82} à Gly_{88}, ainsi que le résidu Gln_{133}. La mise en évidence de ces perturbations significatives sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure II-19-B*) montre qu'elles sont toutes spatialement proches de la sérine 86. Ainsi la mutation C86S perturbe raisonnablement (Δδ < 0,3 ppm) l'environnement chimique de l'ensemble de l'hélice α_2 et de manière plus importante celui du résidu Gln_{133} (Δδ = 0,48 ppm). *A contrario*, la mutation C206S n'engendre manifestement aucune perturbation d'environnement chimique. Les mutations C86S et C206S ne génèrent donc que de faibles modifications d'environnement chimique très localisés, ceci suggère qu'elles n'influent que légèrement et très localement sur la structure tridimensionnelle initiale.

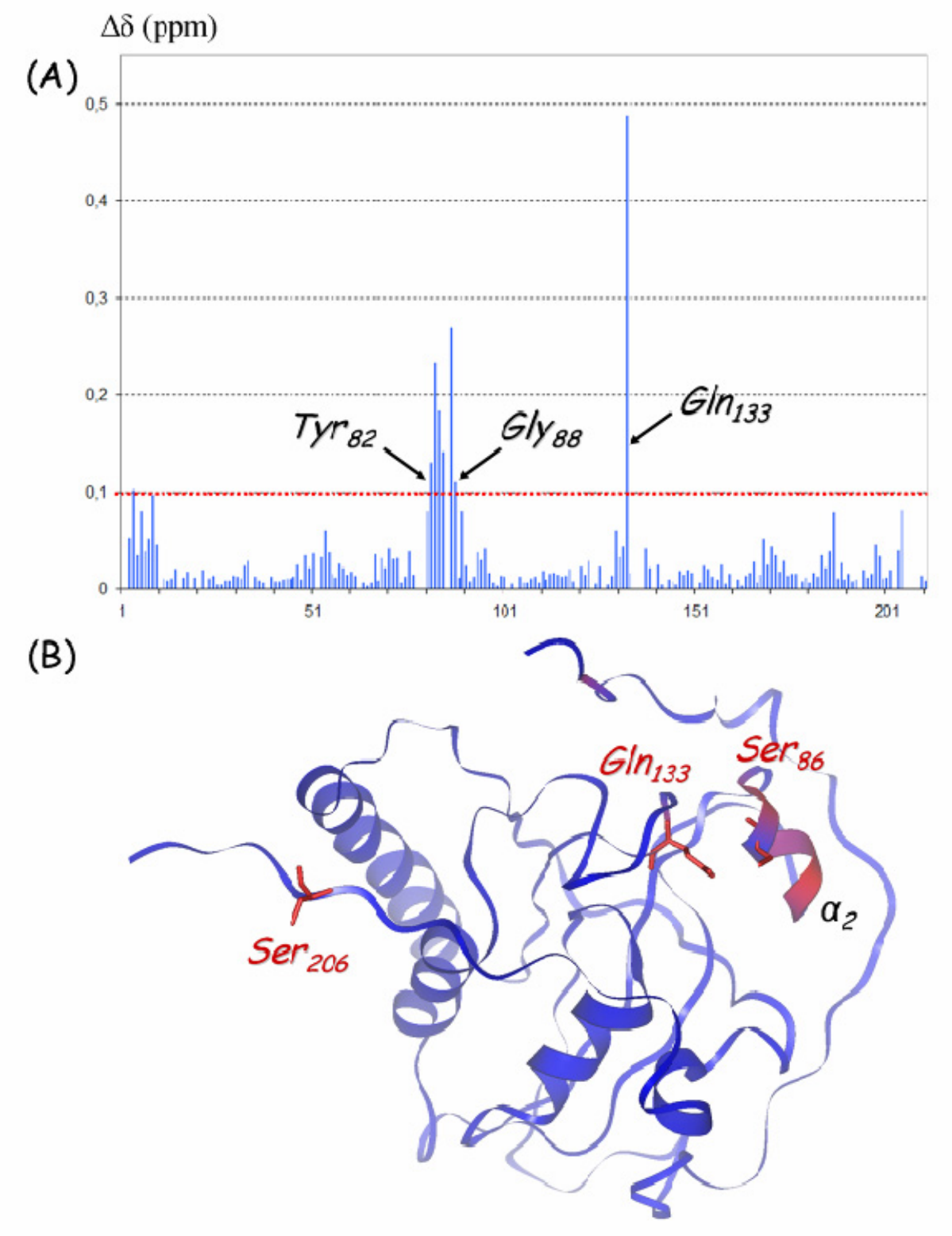


Figure II-19. : ***(A) Perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par les mutations C86S et C206S le long du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation, sur la structure tridimensionnelle en solution de MsrA$^{E.coli}_{Red}$, des perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par les mutations C86S et C206S.*** *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus perturbés de manière significative (Δδ > 0,1 ppm) ; sont aussi représentés les résidus Ser_{86}, Ser_{206} et Gln_{133}, ce dernier étant particulièrement perturbé par la mutation C86S.*

II-3.1.2 Le mutant C86S, C206S oxydé

Les mutations réalisées n'engendrant pas de perturbations importantes, un échantillon oxydé de ce mutant a été préparé par le biais de son oxydation par 3 équivalents de MetSO (la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} a été vérifiée par un dosage des thiols libres au DTNB). Après purification, cet échantillon de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ a été préparé à 1 mM, pH 7,1 (10 mM de KH_2PO_3), dégazé et scellé sous azote. L'examen des premiers spectres, enregistrés à 600 MHz et 298 K (*Figure II-20*), montre que la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} ne modifie pas la conformation globale de la protéine. En effet, le spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ est semblable à celui de $MsrA^{E.coli}_{Red}$. Certaines différences sont néanmoins observables, ce qui semble indiquer que les changements conformationnels provoqués par la formation du pont disulfure sont relativement localisés. Malgré les similitudes avec le spectre de la forme réduite, le spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ n'est pas attribuable directement par analogie, si bien qu'il est nécessaire de réaliser l'attribution séquentielle de cette protéine. Enfin, la mesure du cœfficient de diffusion translationnelle de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$, réalisée grâce à une expérience DOSY, donne une valeur de $9{,}6.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$. Cette valeur permet d'estimer que le rayon moléculaire est de l'ordre de 22,7 Å, ce qui correspond bien à un monomère mais est une valeur légèrement plus importante que pour $MsrA^{E.coli}_{Red}$, ce qui suggère que le volume de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ est un peu plus important (comme il sera confirmé par l'étude structurale).

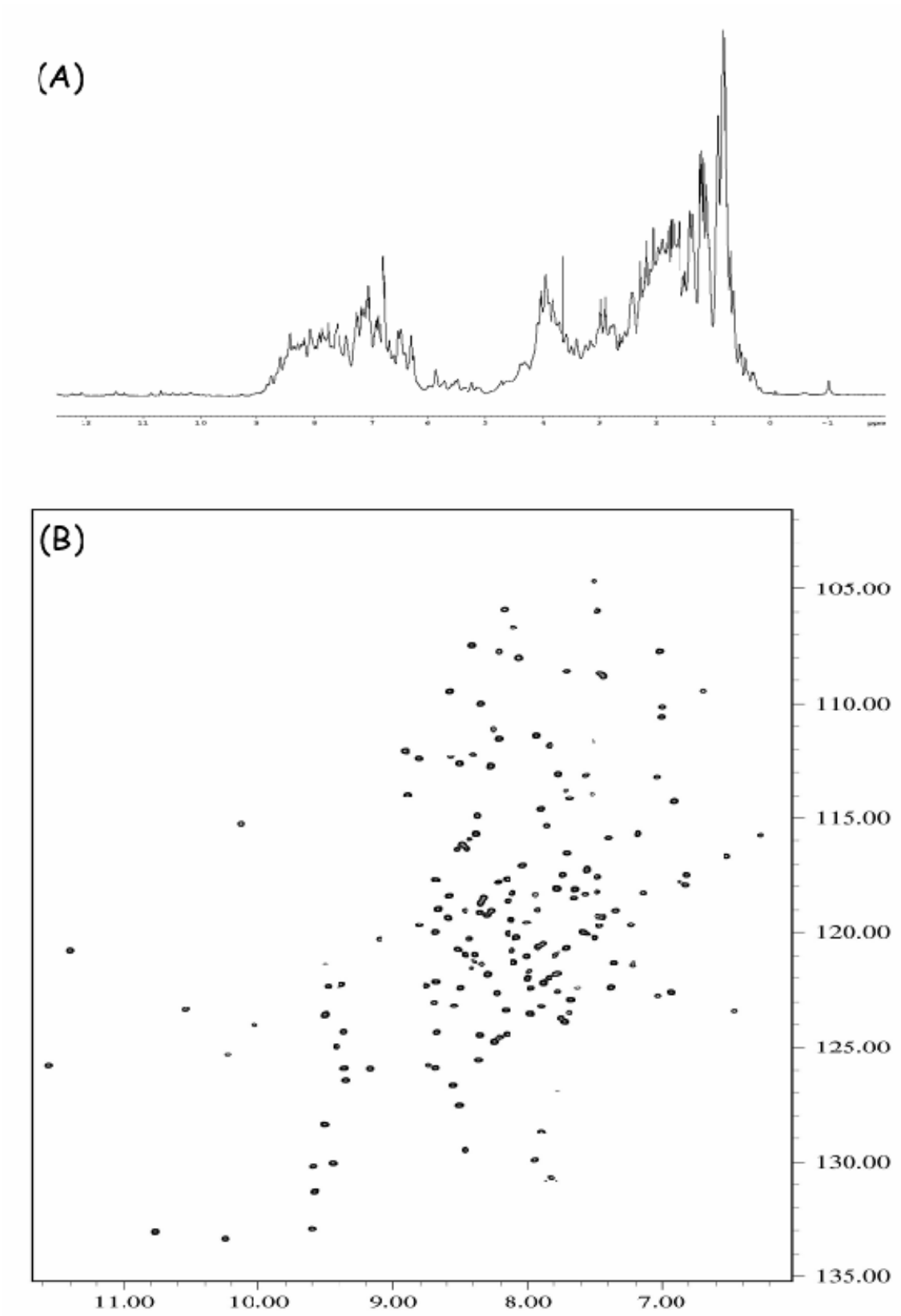


Figure II-20. : (A) Spectre 1D ^{1}H de la $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ ^{15}N, 1mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1. Le signal de l'eau a été éliminé grâce à la séquence WATERGATE ; le signal résiduel a été atténué grâce à un traitement polynomiale de l'interférogramme. (B) Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ ^{15}N, 1 mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1.

II-3.2 Attribution séquentielle du squelette peptidique

L'attribution séquentielle du squelette peptidique a été réalisée grâce à l'analyse des expériences tridimensionnelles hétéronucléaires réalisées sur l'échantillon de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ doublement marqué ^{13}C, ^{15}N. Les expériences HNCA/HN(CO)CA, HNCO/HN(CA)CO, CBCANH/CBCA(CO)NH ont permis d'attribuer les noyaux $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C^{\beta}$, $^{13}C'$ du squelette peptidique (*Figure II-21*, on trouvera en Annexe I d'autres exemples de plan tirés d'expériences tridimensionnelles hétéronucléaires). Les expériences HNHA et HCCH-TOCSY ont permis l'attribution des noyaux des chaînes latérales. Malgré la complexité des spectres et les nombreux recouvrements de signaux observés, cette méthodologie a permis d'attribuer 80 % du squelette peptidique, d'importantes difficultés étant ensuite apparues dans l'avancement de l'attribution. Pour pallier à ces difficultés, des spectres HNCACO et HNCACB ont été enregistrés à 800 MHz avec un échantillon triplement marqué (^{13}C, ^{15}N, ^{2}H) grâce à l'accès national au service de RMN à très haut champ de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ISCN, CNRS) de Gif sur Yvette. Ces expériences complémentaires présentent une sensibilité plus importante et une meilleure résolution que les spectres réalisés à 600 MHz et ont permis d'atteindre 88 % d'attribution du squelette peptidique. Les valeurs de déplacement chimique des noyaux ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N du squelette peptidique et des chaînes latérales ont été déposées dans la banque de données BMRB (http://www.bmrb.wisc.edu) sous la référence 6786. Les résidus n'ayant pas pu être attribués ne sont pas uniformément répartis dans la séquence. Il s'agit des résidus Asn_{19}, Cys_{51}, Phe_{52}, Trp_{53}, Asn_{79}, Gln_{122}, Met_{124}, Gly_{127}, Asn_{128}, Asp_{129}, His_{130}, Arg_{135}, Ser_{136}, Arg_{155}, Phe_{156}, Met_{160}, Thr_{170}, Cys_{198}, Gly_{199}, Ile_{200} et Gly_{201} (*Figure II-22*). Compte tenu de la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution (en supposant que la structure de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ soit proche), les résidus Asn_{19}, Gln_{122}, Arg_{135}, Ser_{136}, Met_{160} et Thr_{170} sont localisés dans des zones peu structurées (telles que les boucles), ce qui pourrait leur conférer une dynamique lente expliquant l'absence de signal observable pour ces résidus. Le résidu Asn_{79} se situe entre deux prolines ce qui rend virtuellement impossible son attribution par les techniques tridimensionnelles hétéronucléaires. La formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} pourrait entraîner des perturbations dynamiques locales, voire un échange conformationnel intermédiaire, expliquant que les résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Trp_{53}, Cys_{198}, Gly_{199}, Ile_{200} et Gly_{201} n'aient pu être attribués. Les résidus Met_{124}, Gly_{127}, Asn_{128}, Asp_{129}, His_{130} appartiennent au feuillet *β'-β''* surplombant la cystéine catalytique (Cys_{51}) dans la forme réduite de $MsrA^{E.coli}$. Il se pourrait que la formation du pont disulfure entraîne une perte de conformation de cette

partie de la protéine ce qui expliquerait que ces résidus n'aient pas pu être attribués. Cette hypothèse est confirmée par l'observation des largeurs des raies de résonance importantes pour les résidus bordant ce segment, ce qui est l'expression la plus manifeste d'une augmentation de la vitesse de relaxation transversale (R_2) due à une contribution d'échange importante (R_2^{ech}). Enfin, les résidus Arg_{155} et Phe_{156} appartiennent à l'hélice α4, dont les deux derniers tours d'hélice étaient déjà faiblement stabilisés dans la forme réduite. Il semble que la formation du pont disulfure provoque ici une déstabilisation plus importante encore, ce qui pourrait expliquer pourquoi les résidus Arg_{155} et Phe_{156} n'aient pas pu être attribués.

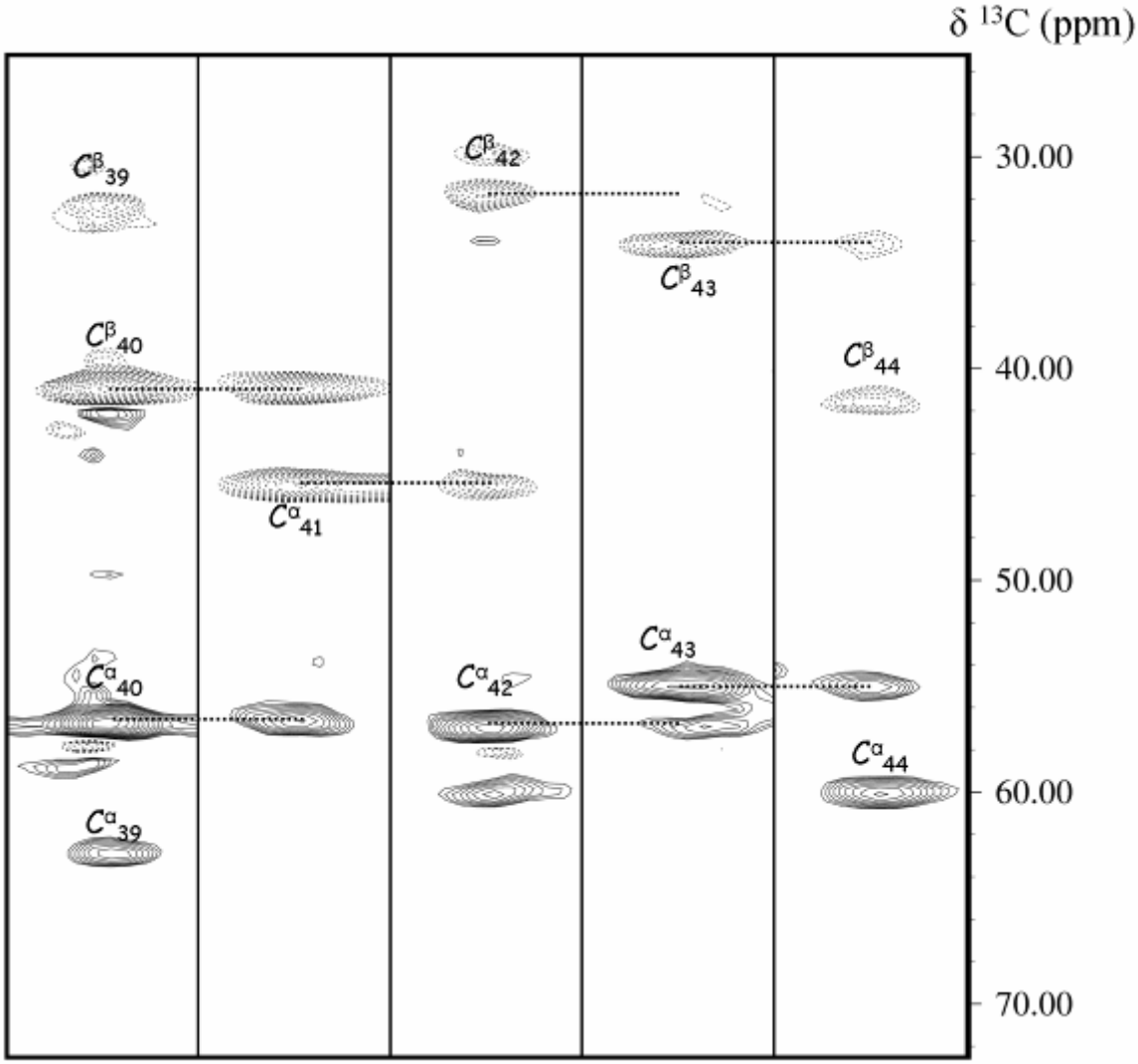


Figure II-21. : ***Bandes issues du spectre CBCANH de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$, correspondant à la séquence $D_{40}GMEI_{44}$.*** *Les corrélations positives (signaux en traits pleins) correspondent aux C^{α} et les corrélations négatives (signaux en pointillés) aux C^{β} et C^{α} des glycines.*

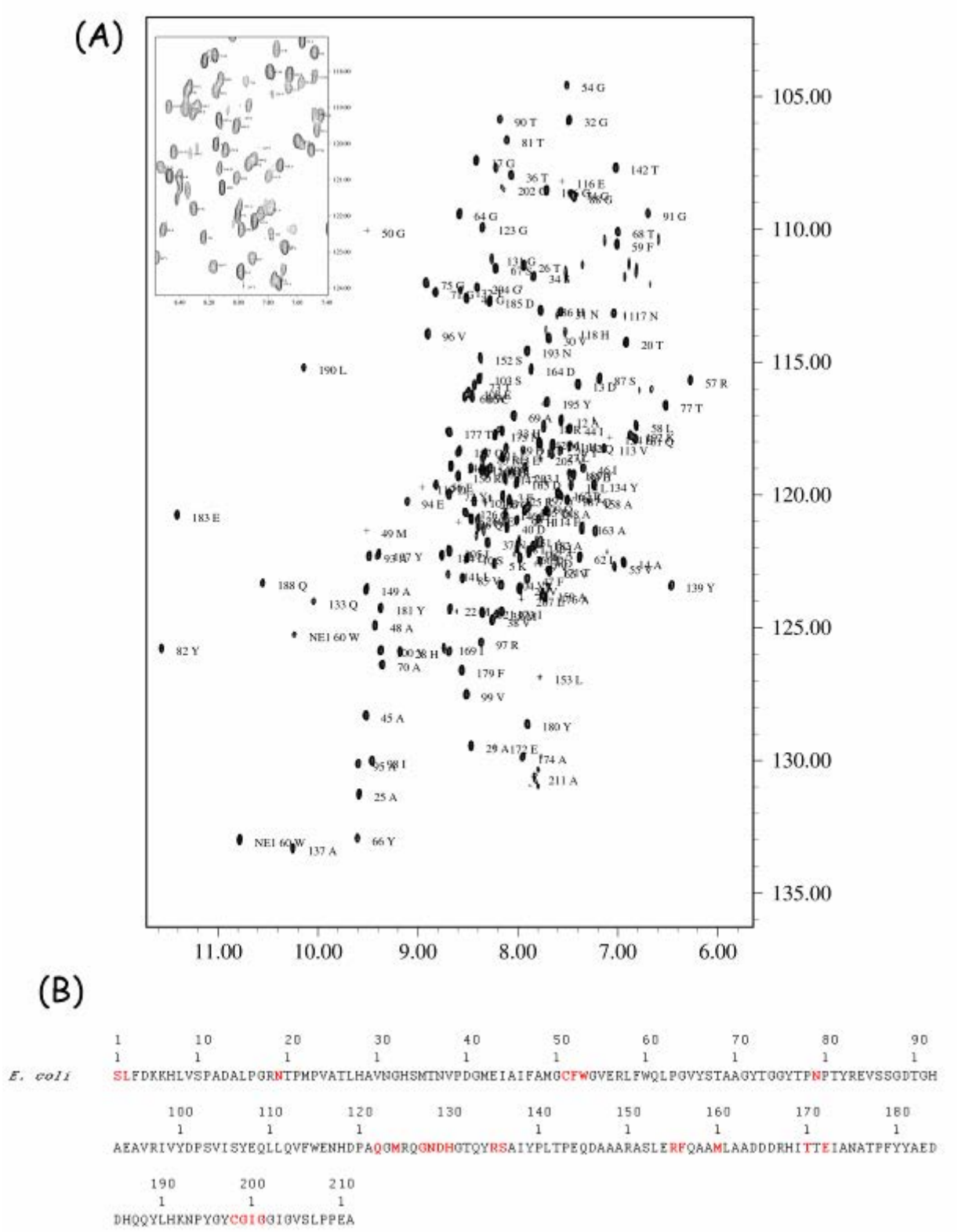


Figure II-22. : (A) Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC attribué à 88 % de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ à 600 Mhz, 298 K, pH 7,1. (B) Séquence primaire de la MsrA d'<u>Escherichia coli</u> mutée C86S, C206S ; les résidus non attribués sont représentés en rouge.

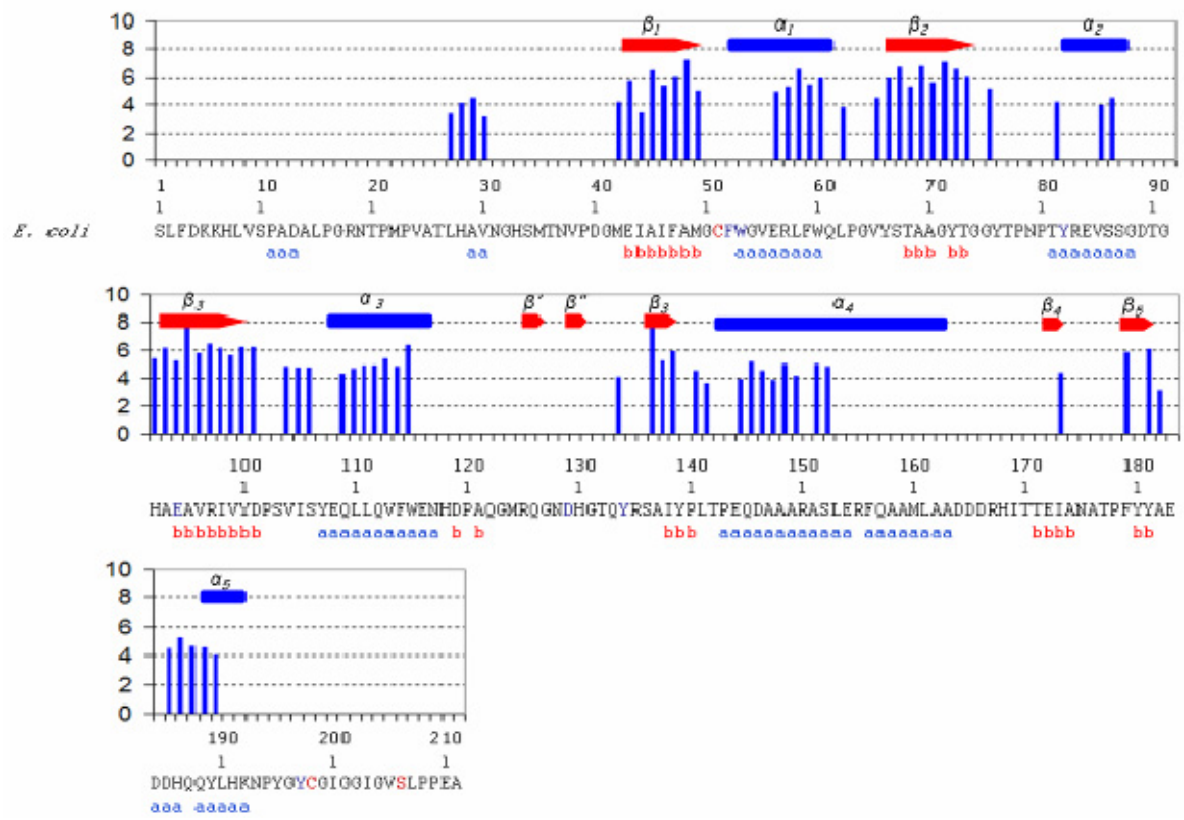


Figure II-23. : Prédiction des angles φ et ψ (TALOS) et facteurs de protection des groupes amides. *Les valeurs de Log(Fp) sont représentées sous forme d'histogramme ; les éléments de structure secondaire représentés en rouge et bleu sont ceux de la structure en solution de* $MsrA^{E.coli}_{Red}$*, les prédictions du logiciel TALOS sont indiquées sous la séquence par un* ***b*** *bleu (pour des valeurs de φ ,ψ correspondant à un brin β) et par un* ***a*** *rouge pour des valeurs de φ, ψ correspondant à une hélice α).*

L'examen des valeurs de facteur de protection, déterminées grâce aux expériences d'échanges H_2O/D_2O, et des angles de torsion φ et ψ prédits grâce au logiciel TALOS, donne une première approximation des éléments de structures secondaires de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution (*Figure II-23*). Ces éléments de structures secondaires putatifs sont très proches de ceux de la forme réduite. En effet, il est possible d'identifier les 5 brins β du feuillet β principal ainsi que les 5 hélices α. Cette observation tendrait à confirmer que les conformations globales des deux formes sont similaires et que les changements conformationnels engendrés par la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} sont localisés et concernent principalement les boucles et dans une moindre part, les éléments de structure secondaire.

La connaissance des valeurs de déplacement chimique de la plupart des noyaux de la protéine a permis d'exploiter les expériences ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC et d'aboutir ainsi à la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$.

II-3.3 Détermination de la structure tridimensionnelle en solution

II-3.3.1 Attribution des spectres NOESY et calcul de la structure

L'exploitation manuelle des spectres tridimensionnels ^{1}H-^{15}N NOESY HSQC et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC, ainsi qu'un spectre ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC particulier, réalisé dans le but d'observer les noyaux aromatiques, a permis de définir un premier ensemble d'environ 1700 contraintes non ambiguës, définissant les éléments de structure secondaire, incluant les 258 contraintes d'angles dièdres dérivant des prédictions réalisées grâce au logiciel TALOS et les liaisons hydrogène stabilisant les éléments de structure secondaire évidents. Ce premier ensemble a permis de définir la topologie globale de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution et d'attribuer ainsi plus facilement les corrélations nOe ambiguës et de définir les hétéroatomes accepteurs de protons possédant une valeur de facteur de protection importante. Cette méthode a permis d'aboutir à un ensemble final de 2807 contraintes de distances et de 258 contraintes d'angles dièdres (Tableau II-6). De plus, toutes les liaisons peptidiques ont été maintenues planes et en configuration *trans* (ω = 180 °), puisque qu'aucune corrélation nOe indiquant une configuration *cis* n'a été observée. Cet ensemble de contraintes a été utilisé pour le calcul de 500 structures grâce au protocole de recuit simulé du logiciel DYANA. Les 20 structures possédant les valeurs les plus faibles de fonction cible (toutes inférieures à 1) ont été sélectionnées pour former l'ensemble final des conformations représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution.

Tableau II-6 : Ensemble des contraintes utilisées pour déterminer la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution

Contrainte	Nombre
Distances interprotoniques	
Total	2807
liaisons hydrogène[a]	130
intrarésiduelles	1668
séquentielles	654
longues distances	355
Angles dièdres	258
Φ	128
Ψ	130

[a]Une liaison hydrogène est définie par deux contraintes de distance. Ainsi, 65 liaisons hydrogène conduisent à 130 contraintes de distance.

II-3.3.2 Statistiques structurales

L'examen de l'ensemble final des 20 structures tridimensionnelles (*Figure II-24*) indique que le cœur de l'enzyme est bien structuré (résidus 12 à 121 et 133 à 194) puisqu'il montre une valeur de rmsd par rapport aux coordonnées moyennes de 0,86 ± 0,15 Å pour le squelette peptidique et de 1,62 ± 0,19 Å pour l'ensemble des hétéroatomes.

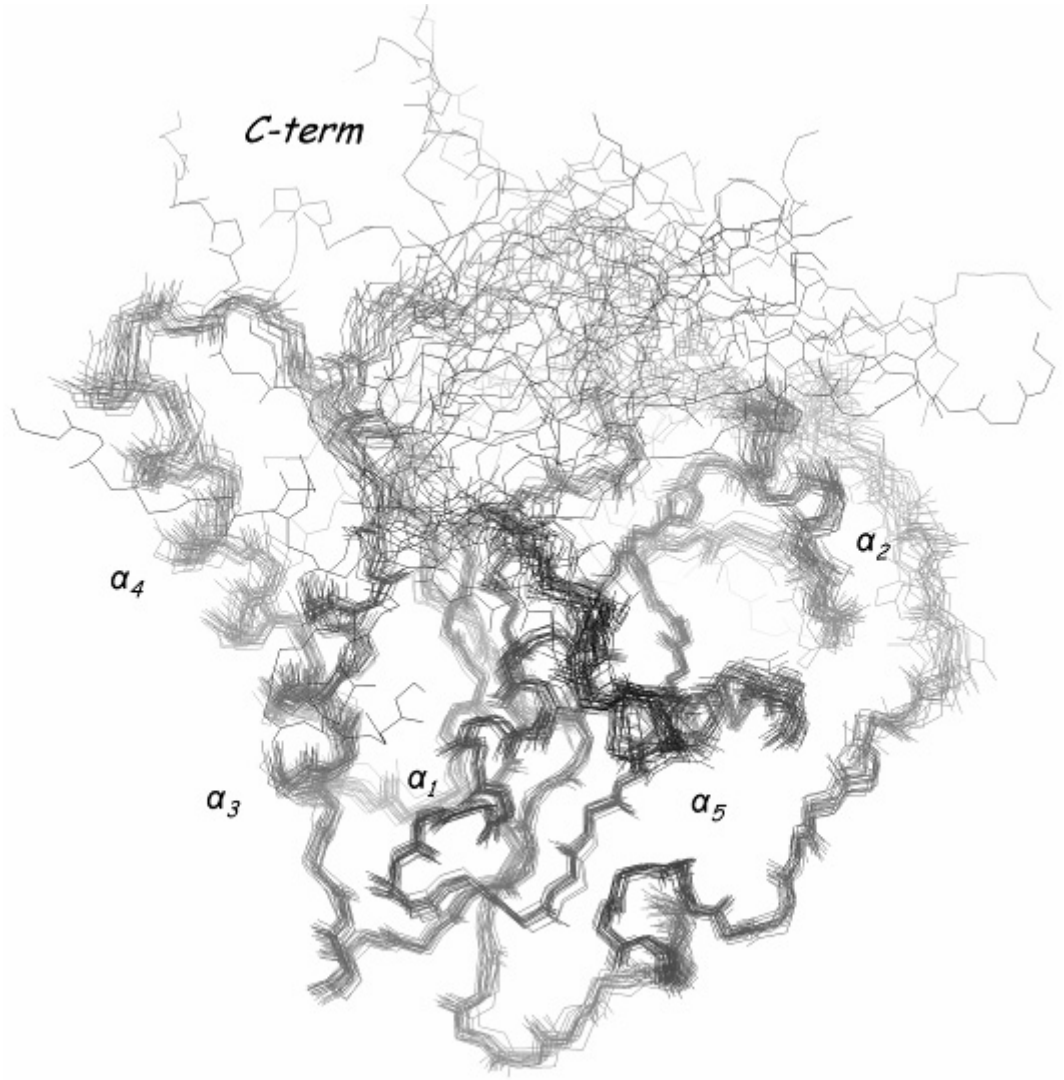


Figure II-24. : Superposition du squelette peptidique (résidus 12 à 121 et 133 à 194) des 20 structures de l'ensemble final des conformations représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution.

Les extrémités N- et C-terminales, ainsi que le segment Gln_{122}-Thr_{132}, sont moins bien définis, comme le confirment les données dynamiques (*cf.* ci après). De plus, la distribution des valeurs de rmsd selon la séquence n'est pas homogène ce qui indique le degré de

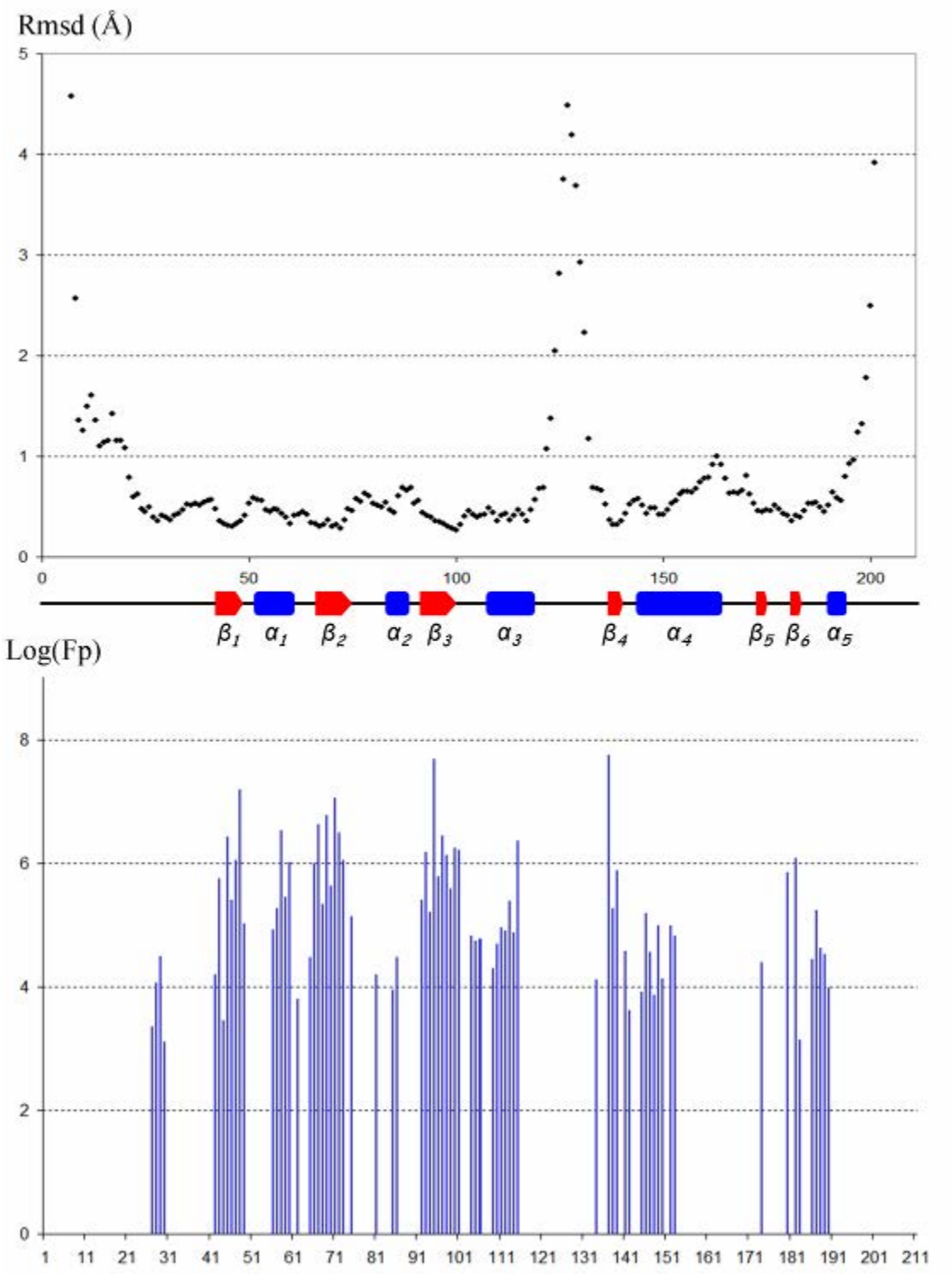


Figure II-25. : Eléments de structures secondaires, rmsd et facteur de protection

flexibilité de certaines régions telles que les boucles entre les éléments de structures secondaires (*Figure II-25*).

L'ensemble des structures tridimensionnelles est en accord avec les contraintes expérimentales : en effet, les violations de contraintes de distance ne dépassent pas 0,2 Å et les violations d'angles dièdres sont inférieures à 5 degrés (Tableau II-7). Enfin, toutes les

valeurs d'angles dièdres du squelette peptidique (mis à part dans le cas des glycines) se trouvent dans les régions autorisées du diagramme de Ramachandran. L'ensemble des structures tridimensionnelles représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution est donc d'une excellente qualité et d'une bonne définition.

Tableau II-7 : Statistiques structurales de l'ensemble final des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution

Violation	Occurrence par conformère
Violations de distance	
> 0,0 Å	90 ± 11
> 0,1 Å	9 ± 3
> 0,2 Å	0
Violations d'angles dièdres	
> 0 deg.	31 ± 7
> 5 deg.	0
Diagramme de Ramachandran[a]	
Résidus dans les régions les plus favorables (%)	82,2
Résidus dans les régions supplémentaires autorisées (%)	17,4
Résidus dans les régions généreusement autorisées (%)	0,4
Résidus dans les régions interdites (%)	0

[a]Données déterminées grâce au logiciel PROCHECK NMR

II-3.3.3 Description de la conformation globale

La conformation globale de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ est une conformation « α/β roll », fortement similaire à la conformation globale de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ et qui consiste en un feuillet *β* constitué de 6 brins et entouré de 5 hélices α (*Figure II-26*).

L'examen des structures secondaires indique que seuls 38 % des résidus de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ sont impliqués dans des éléments de structure secondaire (*Figure II-25*). Le cœur de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ est constitué d'un feuillet *β* à 6 brins. Ces brins comprennent les résidus Glu_{43} à Ala_{48} (β_1), Tyr_{66} à Thr_{73} (β_2), Ala_{93} à Tyr_{100} (β_3), Ala_{137} à Tyr_{139} (β_4), Glu_{172} à Ile_{173} (β_5) et Tyr_{180} à Tyr_{181} (β_6) et présentent la succession d'arrangements parallèle (p) et antiparallèle (a) suivante : β_5(p)β_4(a)β_1(a)β_3(a)β_2(a)β_6. Ce feuillet *β* est entouré de 5 hélices *α*. La première hélice, α_1, s'étend des résidus Phe_{52} à Trp_{60} et comprend 2 tours d'hélice. La seconde hélice α_2 est aussi une hélice régulière qui s'étend des résidus Tyr_{82} à Ser_{87}. La troisième hélice α_3 s'étend des résidus Tyr_{107} à Asn_{117} et comprend 2 tours et demi d'hélice.

La quatrième hélice α_4 s'étend des résidus Pro_{143} à Ala_{162} avec 3 tours réguliers d'hélice des résidus Pro_{143} à Phe_{156}. Les tours suivants (Gln_{157} à Ala_{162}) sont faiblement stabilisés. En effet, malgré les valeurs d'angles de torsion φ, ψ et la mesure des effets nOe séquentiels définissant une hélice α, les résidus Gln_{157} à Ala_{162} montrent des valeurs de rmsd légèrement plus élevées que le reste de l'hélice et des valeurs de facteur de protection des groupes amides particulièrement faibles. La cinquième et dernière hélice s'étend des résidus Tyr_{189} à Lys_{192} et ne comprend qu'un unique tour d'hélice. Enfin, le segment Gln_{122} à Thr_{132}, qui se situe entre l'hélice α_3 et le brin β_3, semble particulièrement peu structuré compte tenu des valeurs de rmsd élevées pour ces résidus.

Le coeur de l'enzyme est flanqué des longues extrémités N- et C- terminales ne contenant que peu d'éléments de structure secondaire. L'extrémité N-terminale s'étend des résidus Ser_1 à Met_{42}, et ne possède qu'une boucle (des résidus Ser_{10} à Ala_{14}) comme unique élément de structure secondaire. Sa conformation n'est correctement définie qu'à partir du résidu Thr_{20} (comme le montrent les valeurs importantes de rmsd des résidus Ser_1 à Asn_{19}). Cette partie est maintenue au contact du cœur de l'enzyme par de nombreuses interactions

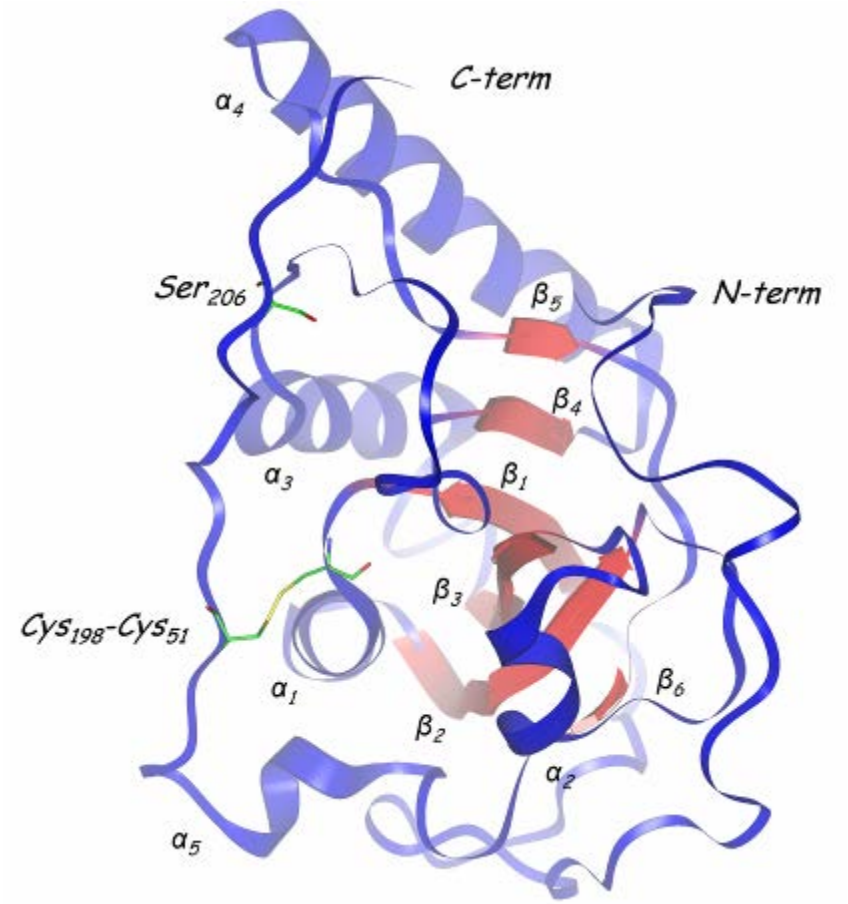


Figure II-26. : Structure la plus représentative de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution. *Les feuillets sont représentés en rouge, les hélices et les boucles en bleu.*

hydrophobes et une liaison hydrogène entre H^N_{28} et 0^{ε}_{188}.

L'extrémité C-terminale s'étend des résidus Gly_{199} à Ala_{211} et comprend la seconde cystéine de recyclage Cys_{206} (qui dans cette forme mutée est remplacée par une sérine). Elle ne présente aucun élément de structure secondaire et semble être particulièrement peu structurée comme le montrent les valeurs de rmsd très élevées des résidus Gly_{199} à Ala_{210}.

II-3.3.4 Description du site actif et de l'extrémité C-terminale

II-3.3.4.1 Site actif

Tableau II-8 : Description statistique du site actif de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$

Résidu	Rmsd squelette peptidique (Å)	Rmsd hétéroatomes (Å)	φ (deg.)	ψ (deg.)	χ^1 (deg.)
Cys_{51}	0,59	0,93	-71 ± 12	155 ± 48	-110 ± 67
Phe_{52}	0,57	1,61	-116 ± 40	-42 ± 15	65 ± 67
Trp_{53}	0,56	0,67	-70 ± 9	-42 ± 5	-84 ± 20
Tyr_{82}	0,50	1,04	-57 ± 4	-42 ± 6	164 ± 10
Tyr_{134}	0,68	1,63	-111 ± 14	119 ± 25	31 ± 43
Tyr_{197}	1,24	3,17	-65 ± 13	138 ± 16	-75 ± 100
Cys_{198}	1,32	1,64	-80 ± 30	-67 ± 96	-80 ± 30

Le site actif de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ est organisé autour du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Il présente un caractère hydrophobe important compte tenu du nombre élevé de résidus aromatiques trouvés autour de ce pont disulfure. En effet, dans l'environnement proche du résidu Cys_{51} se trouvent les résidus Phe_{52} et Trp_{53} et dans l'environnement un peu plus lointain se situent les résidus Tyr_{82}, Tyr_{134} et Tyr_{197} (*Figure II-28-A*). Les données statistiques disponibles pour ces résidus (Tableau II-8, les diagrammes de Ramachandran pour les résidus Tyr_{197} et Cys_{198} sont reportés en Annexe I) indiquent que les résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Trp_{53} et Tyr_{82} ont des positions bien définies (comme le montrent les faibles valeurs de rmsd et la faible variabilité des valeurs d'angles dièdres φ et ψ). Les résidus Tyr_{134}, Tyr_{197} et Cys_{198} ont des positions plus variables (comme le montrent les valeurs de rmsd plus importantes et une variabilité plus importante des valeurs des angles dièdres φ et ψ). Les chaînes latérales des résidus Trp_{53} et Tyr_{82} ont des conformations bien définies (comme l'indiquent les faibles valeurs de rmsd sur les hétéroatomes et la faible variabilité des valeurs d'angle dièdre χ^1), alors que les chaînes latérales des résidus Cys_{51}, Phe_{52}, Tyr_{134}, Tyr_{197} et Cys_{198} ont des

conformations plus variables (comme le montrent les valeurs de rmsd plus importantes sur les hétéroatomes et la variabilité des valeurs d'angle dièdre χ^1).

Ces observations indiquent que les résidus les plus impliqués dans la formation du pont disulfure (Cys_{51}, Phe_{52}, Tyr_{197} et Cys_{198}) possèdent une variabilité de position et/ou de conformation de leur chaîne latérale qui confère à cette zone une certaine flexibilité. De plus, le résidu Tyr_{134} est situé à proximité du segment Gln_{122}-Thr_{132}. Ce dernier, qui comprend le résidu Asp_{129} impliqué dans la reconnaissance du substrat chez la forme réduite de MsrA, se trouve ici être très peu structuré (*Figure II-27*) comme le montrent les valeurs de rmsd importantes pour ces résidus. Cette flexibilité semble se répercuter sur la conformation de la chaîne latérale du résidu Tyr_{134}.

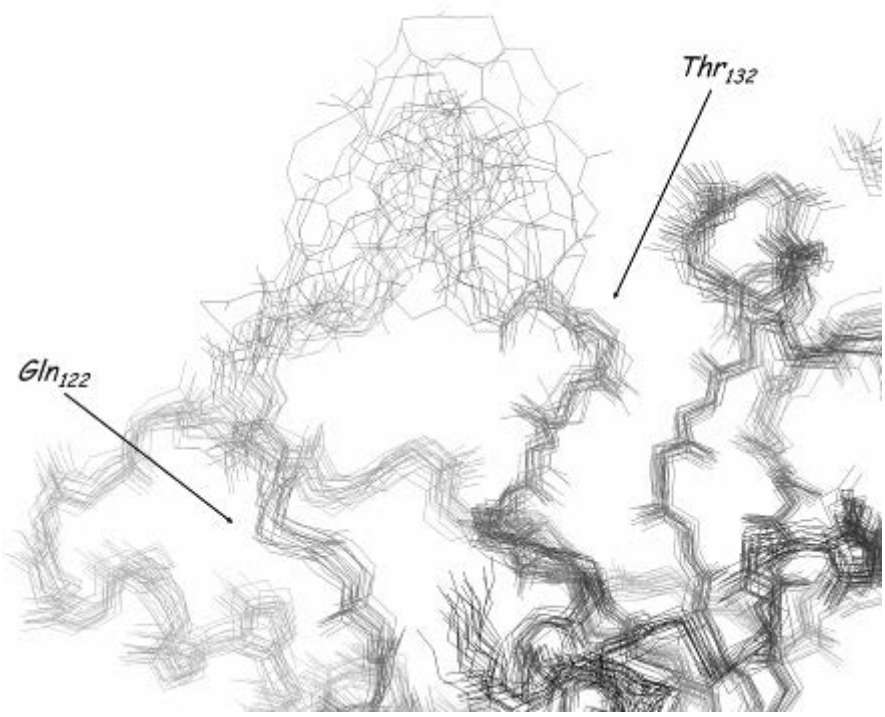


Figure II-27. : Conformations prises par le segment Gln_{122}-Thr_{132} dans l'ensemble des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution.

La présence de nombreux résidus aromatiques autour du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}, ainsi que la flexibilité du segment Gln_{122}-Thr_{132}, ont pour conséquence d'exposer, en surface de la protéine, une large zone à fort caractère hydrophobe (*Figure II-28-B*). Dans le cas des MsrA à une cystéine de recyclage, cette zone pourrait être spécifiquement reconnue par la thiorédoxine lors de l'étape de régénération de l'activité catalytique *via* la réduction du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}.

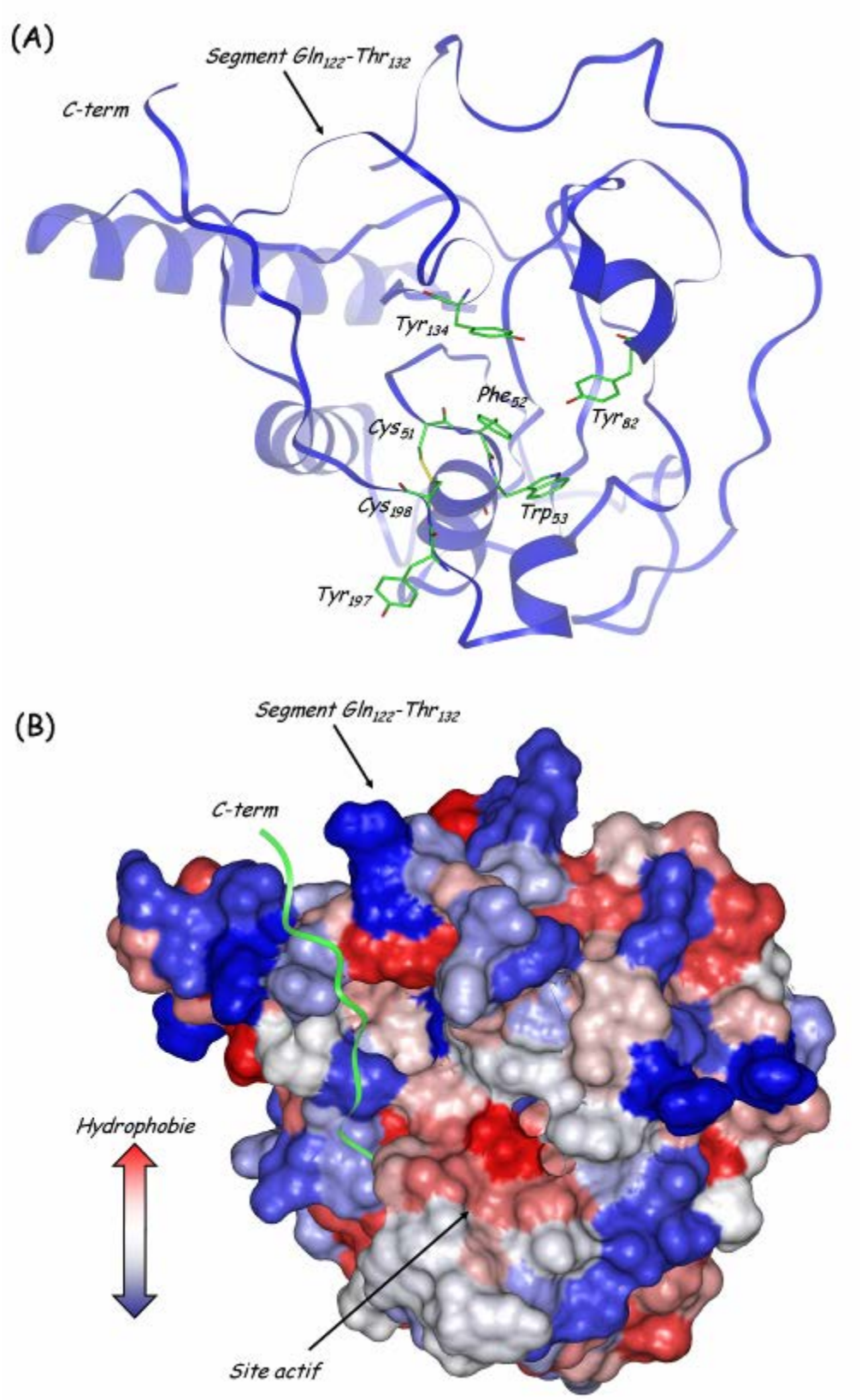


Figure II-28. : ***(A) Site actif de la conformation la plus représentative de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution. (B) Surface de Connolly de la conformation la plus représentative de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution.*** *La couleur de la surface dépend du degré d'hydrophobie des résidus en surface ; l'extrémité C-terminale (flexible) des résidus Gly_{199} à Ala_{211} est représentée par un ruban vert.*

II-3.3.4.2 Extrémité C-terminale

L'extrémité C-terminale de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ s'étend des résidus Gly_{199} à Ala_{210} et comprend la seconde cystéine de recyclage, la cystéine 206 (qui dans cette forme mutée est remplacée par une sérine). Comme le montrent l'examen de l'ensemble des 20 structures représentatives de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution ainsi que les valeurs de rmsd observées pour les résidus Gly_{199} à Ala_{211}, l'extrémité C-terminale est particulièrement peu structurée et est susceptible d'adopter une importante variété de conformations (*Figure II-29*). Toutefois, pour la grande majorité des 20 structures, la fin de l'extrémité C-terminale (résidu Ile_{203} à Ala_{211}) est en interaction avec la zone hydrophobe formée par le site actif, cette interaction étant favorisée par les résidus hydrophobes de l'extrémité C-terminale (Ile_{203}, Val_{205} et Leu_{207}).

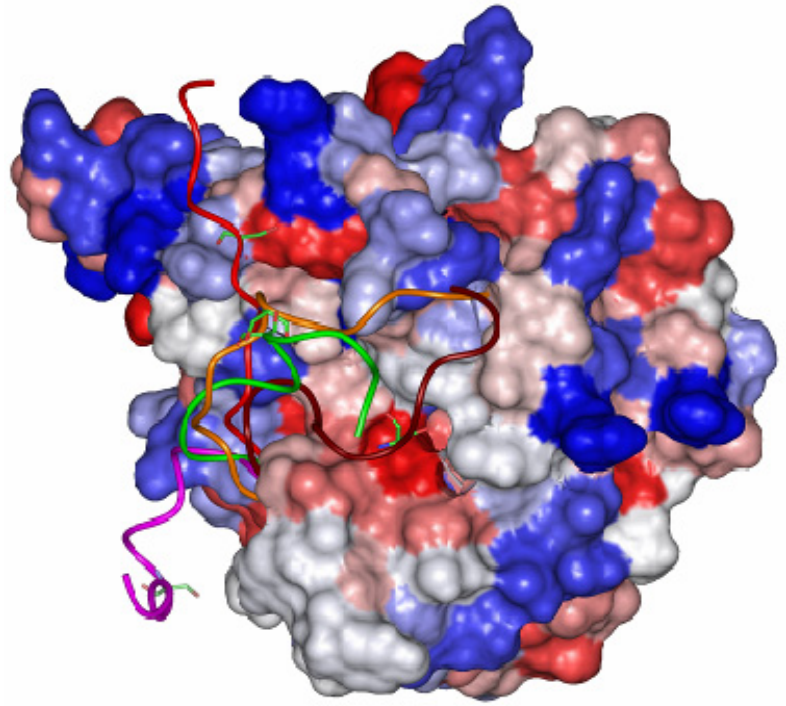


Figure II-29. : Conformations représentatives de l'extrémité C-terminale de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution. *Sont représentés différentes conformations de l'extrémité C-terminale ainsi que le résidu Ser_{206}.*

La flexibilité de l'extrémité C-terminale se répercute sur la distance entre les atomes C^{β}_{198} et C^{β}_{206}. En effet, la distance moyenne $dC^{\beta}_{198}\text{-}C^{\beta}_{206}$ est de 15,5 ± 6,2 Å avec une distance minimale de 9,76 Å. Cette distance est *a priori* trop importante pour permettre la formation du pont disulfure $Cys_{198}\text{-}Cys_{206}$ qui intervient pourtant nécessairement à ce stade du processus catalytique. Cependant, seul un très faible nombre de corrélations nOe séquentielles a été observé pour ce segment de l'enzyme et aucune corrélation à longue distance. Ceci indique clairement que l'extrémité C-terminale n'adopte aucune conformation particulière comme le montre l'ensemble des 20 structures représentatives de la conformation de

$MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$. Dans ce contexte, il est possible que les conformations de l'extrémité C-terminale observées dans l'ensemble de 20 structures ne soient pas suffisamment représentatives de toutes les conformations pouvant être adoptées par ce segment en solution, ce qui peut avoir pour origine un défaut du logiciel de modélisation utilisé (DYANA) à reproduire les propriétés structurales de l'extrémité C-terminale. Ainsi, même si l'ensemble de ces 20 structures n'est pas suffisamment représentatif de la conformation de l'extrémité C-terminale, il est raisonnable de penser que cette dernière est suffisamment flexible pour permettre le rapprochement des cystéines 198 et 206 et rendre possible la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}.

II-3.3.5 Comparaison des structures tridimensionnelles en solution de la forme réduite et de la forme oxydée Cys_{51}-Cys_{198}

La comparaison des structures des formes réduite et oxydée (Cys_{51}-Cys_{198}) en solution pourrait permettre d'observer les déterminants structuraux permettant la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. La superposition du squelette peptidique de la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ avec celle de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution conduit à une valeur de rmsd de 1,83 Å pour les résidus 14 à 122 et 132 à 195 (*Figure II-30-A*). Exception faite du segment Gln_{122}-Thr_{132} et de l'extrémité C-terminale, les deux conformations sont semblables, la formation du pont disulfure ne provoque donc pas de changement conformationnel important en ce qui concerne les éléments de structures secondaires.

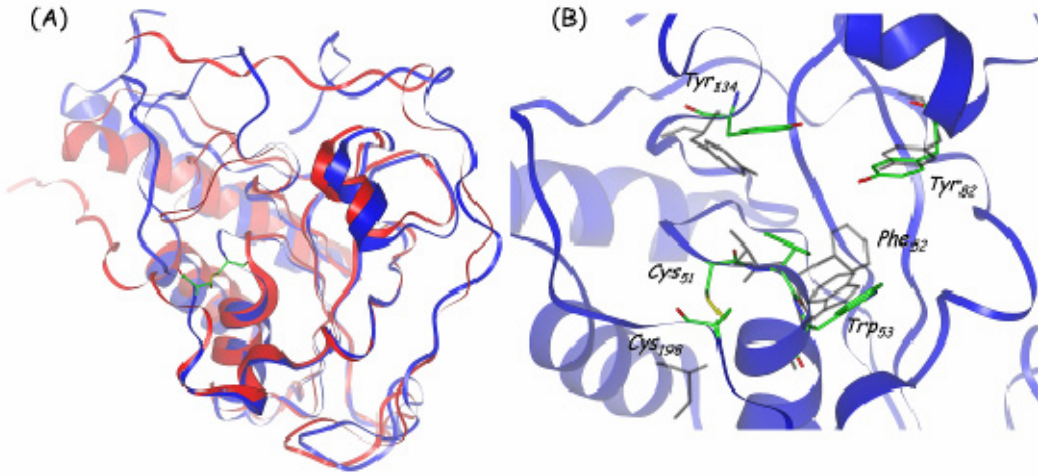


Figure II-30. : (A) Superposition du squelette peptidique de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution (ruban bleu) et de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution (ruban rouge), qui aboutit à un rsmd de 1,83 Å sur les résidus Ala_{14} à Gln_{122} et Thr_{132} à Ala_{211}. (B) Comparaison du site actif de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution avec celui de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution. *le ruban bleu correspond au squelette peptidique de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$, les résidus de la forme oxydée sont représentés en vert, ceux de la forme réduite sont représentés en noir.*

Les sites actifs des deux formes sont relativement similaires (*Figure-II-30-B*). En effet, les résidus Trp_{53} et Tyr_{82} ont des positions et des conformations de leur chaîne latérale identiques (Tableau II-9). Les résidus Cys_{51} et Phe_{52} adoptent des positions et des conformations de leur chaîne latérale légèrement différentes mais les valeurs des angles dièdres φ, ψ et χ^1 se révèlent très variables pour la forme oxydée Cys_{51}-Cys_{198}. Ces différences de position et de conformation sont manifestement générées par la formation du pont disulfure. Le résidu Tyr_{134} voit sa position et la conformation de sa chaîne latérale très perturbées par la formation du pont disulfure. Cette perturbation est certainement liée à la perte de structure du segment Gln_{122}-Thr_{132}. En effet, dans la structure de $MsrA^{E.coli}_{Red}$, le segment Gln_{122}-Thr_{132} comprend un petit feuillet à deux brins β (*β'* et *β''*). Dans la structure de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$, ce segment s'avère être très peu structuré, ce qui a pour conséquence d'exposer la surface, à caractère hydrophobe, du site actif qui était lui-même recouvert par le feuillet *β'*-*β''* dans la structure de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure II-31*).

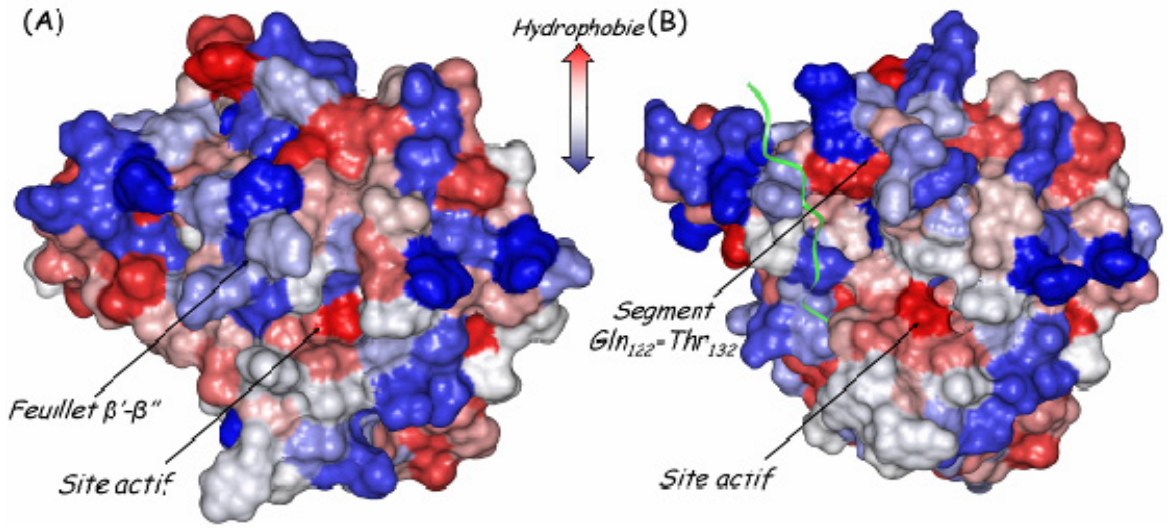


Figure II-31. : Comparaison des surfaces de Connolly de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (A) et $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution (B). *La couleur de la surface dépend du degré d'hydrophobie des résidus en surface ; l'extrémité C-terminale (résidus Gly_{199} à Ala_{211}) est représentée par un ruban vert.*

Tableau II-9 : Comparaison des valeurs des angles dièdres φ,ψ et χ^1 des résidus impliqués dans le site actif de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ et $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$.

Résidu	**Angle dièdre**	**$MsrA^{E.coli}_{Red}$ (RMN)**	**$MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ (RMN)**	**$MsrA^{E.coli}$ (R-X)**
Cys_{51}	φ	-41 ± 1	-71 ± 12	-44
	ψ	110 ± 1	155 ± 48	120
	χ^1	-150 ± 100	-110 ± 67	168
Phe_{52}	φ	-83 ± 3	-116 ± 40	-72
	ψ	-3 ± 5.1	-42 ± 15	-16
	χ^1	56 ± 11	65 ± 67	51
Trp_{53}	φ	-70 ± 3	-70 ± 9	-59
	ψ	-58 ± 4	-42 ± 5	-48
	χ^1	-72 ± 8	-84 ± 20	-57
Tyr_{82}	φ	-54 ± 5	-57 ± 4	-56
	ψ	-42 ± 7	-42 ± 6	-46
	χ^1	162 ± 3	164 ± 8	-160
Tyr_{134}	φ	-105 ± 10	-111 ± 14	-85
	ψ	43 ± 11	119 ± 25	113
	χ^1	-75 ± 6	31 ± 44	-61
Tyr_{195}	φ	-103 ± 5	-95 ± 3	
	ψ	12 ± 10	16 ± 14	
	χ^1	-31 ± 85	-48 ± 75	
Gly_{196}	φ	-68 ± 10	-106 ± 19	
	ψ	-161 ± 7	65 ± 43	
Tyr_{197}	φ	-81 ± 28	-65 ± 12	-
	ψ	124 ± 10	139 ± 16	
	χ^1	-114 ± 84	-75 ± 103	
Cys_{198}	φ	-129 ± 10	-80 ± 30	
	ψ	166 ± 96	-67 ± 96	
	χ^1	-62 ± 70	-79 ± 30	

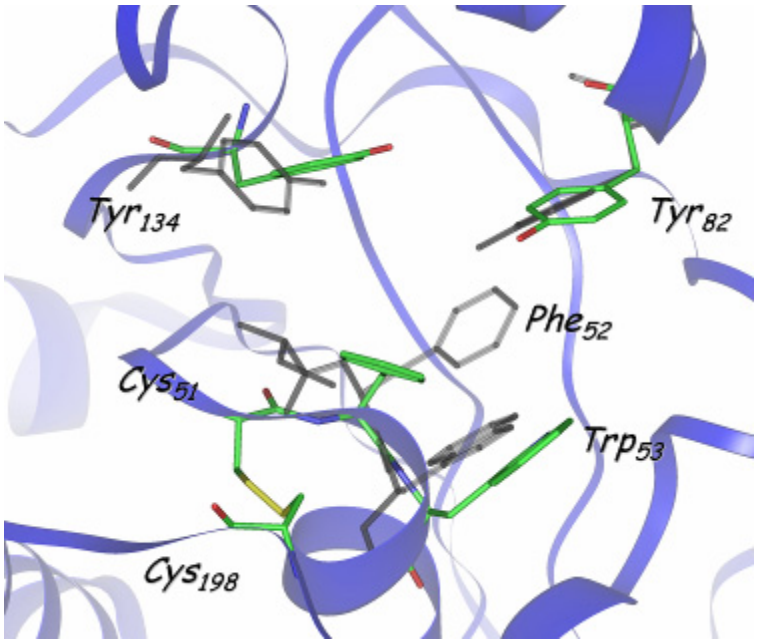


Figure II-32. : Comparaison du site actif de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution avec celui de MsrA$^{E.coli}$ à l'état solide. *le ruban bleu correspond au squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$; les résidus de la forme oxydée sont représentés en vert, ceux de la forme cristalline sont représentés en noir.*

Il est aussi intéressant de comparer le site actif de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ avec celui de la structure cristalline de MsrA$^{E.coli}$ (représentative de la structure du complexe enzyme/substrat). Les différences observées sont identiques aux différences remarquées entre MsrA$^{E.coli}_{Red}$ et MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ (*Figure II-32*). En effet, il existe peu de différences entre la structure en solution et la structure cristalline de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ (Tableau II-9).

L'extrémité C-terminale étant directement impliquée dans la formation du pont disulfure, la comparaison des conformations de cette extrémité dans les structures des formes réduite et oxydée en solution pourrait permettre d'appréhender les changements conformationnels nécessaires au rapprochement des cystéines 51 et 198 et à la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. La comparaison des deux structures indique que l'extrémité C-terminale n'adopte une conformation différente qu'à partir du résidu Gly_{196}. En effet, le résidu Tyr_{195} possède les mêmes valeurs pour les angles dièdres φ, ψ et χ^1 dans les deux structures (Tableau II-9). Ainsi, seule la conformation des résidus Gly_{196}, Tyr_{197}, Cys_{198} est modifiée par la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} (*Figure II-33*). Cette observation suggère que le rapprochement des cystéines Cys_{51} et Cys_{198} pourrait être possible grâce au changement de conformation du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}.

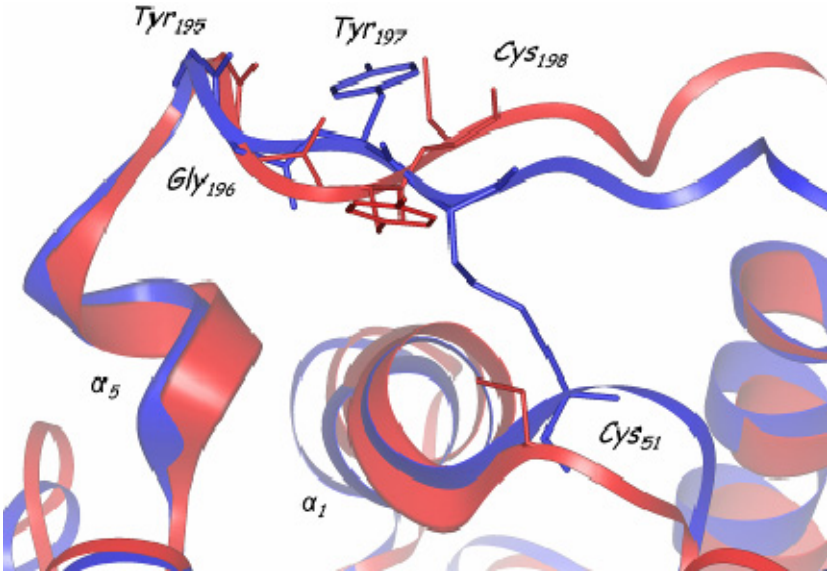


Figure II-33. : Comparaison des extrémités C-terminales de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution (représentée par un ruban et des résidus bleus) et MsrA$^{E.coli}_{Red}$ en solution (représentée par un ruban et des résidus rouges).

Ainsi, la comparaison des structures tridimensionnelles de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ et MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ indique que : (i) la formation du pont disulfure provoque un changement de conformation important des résidus Cys_{51} et Phe_{52} du site actif ainsi qu'une perte de structure du segment Gln_{122}-Thr_{132} qui recouvrait le site actif dans la forme réduite ; (ii) la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} semble possible grâce à un changement de conformation du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}. Il reste à comprendre à quelle étape du processus catalytique de MsrA ce changement conformationnel est susceptible de se produire.

II-3.4 Etude dynamique

L'examen de l'ensemble des 20 structures représentatives de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution suggère que, suite à la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} : (i) le segment Gln_{122}-Thr_{132} est faiblement structuré ; (ii) l'extrémité C-terminale (des résidus Gly_{199} à Ala_{211}) n'est pas structurée et pourrait donc être animée de mouvements importants. Ce dernier point pourrait expliquer le mécanisme de formation du second pont disulfure (Cys_{198}-Cys_{206}) bien que dans aucune des 20 structures, la distance dC^{β}_{198}-C^{β}_{206} ne soit suffisamment courte pour permettre la formation de ce pont disulfure. L'étude de la dynamique du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution, par le biais de la mesure des vitesses de relaxation transversale (R_2) et longitudinale (R_1) des noyaux ^{15}N, ainsi que de l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N, devrait permettre de caractériser ces mouvements putatifs, tant du point de vue de leur amplitude que de leur gamme de vitesse.

II-3.4.1 Vitesses de relaxation et paramètre nOe hétéronucléaire

La mise en œuvre d'expériences décrites par Farrow et coll. a permis de déterminer les vitesses de relaxation longitudinale (R_1) et transversale (R_2) des noyaux ^{15}N, ainsi que le paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (nOe), pour la plupart des groupes amides secondaires du squelette peptidique (*Figure II-34*). Suite aux recouvrements des certaines résonances, les valeurs de R_1, R_2 et nOe n'ont pas pu être mesurées pour certaines corrélations du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. Ces données sont brutes et nécessitent d'être interprétées selon un modèle de dynamique moléculaire pour en extraire les paramètres décrivant la mobilité interne de l'enzyme. Néanmoins, il est possible de faire plusieurs observations préliminaires.

En premier lieu, les valeurs moyennes des vitesses de relaxation sont R_1 = 1,1 s^{-1} et R_2 = 17,9 s^{-1}, le rapport R_2/R_1 moyen est donc de 16,1 ± 4,3. Ce rapport correspond à un temps de corrélation global τ_c de 12,5 ± 0,6 ns. Compte tenu de la masse moléculaire de $MsrA^{E.coli}$ de 23 kDa, le temps de corrélation global théorique est de 9,2 ns, à supposer que la protéine soit globulaire. Le temps plus important, calculé à partir du rapport R_2/R_1, indique que $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ n'a pas une forme globulaire et possède un volume hydrodynamique important, ce qui est en accord avec la structure tridimensionnelle en solution déterminée précédemment. Ce temps de corrélation important pourrait aussi indiquer une dimérisation de la protéine en solution, mais la mesure du coefficient de diffusion translationnelle de ces protéines révèle que ce n'est pas le cas (*cf.* § II-2.1.2). Toutefois, l'hypothèse d'une auto association de faible affinité n'est pas à exclure, la valeur du coefficient de diffusion translationnelle n'étant que très peu sensible à un équilibre monomère/dimère.

En second lieu, certains segments de la protéine présentent des valeurs remarquables de R_1, R_2 et nOe. C'est le cas de l'extrémité N-terminale où on observe des valeurs de R_1 importantes (de 1,69 à 1,12 s^{-1}) et des valeurs de nOe faibles (de 0,02 à 0,72) pour les résidus Phe_3 à Ala_{14}. Ces valeurs indiquent que l'extrémité N-terminale, jusqu'au résidu Ala_{14}, est peu structurée. L'extrémité C-terminale, des résidus Gly_{202} à Ala_{211}, qui comprend la seconde cystéine de recyclage Cys_{206} (qui est ici remplacée par une sérine), possède elle aussi des valeurs de R_1 élevées (de 1,22 à 2,59 s^{-1}) et des valeurs de nOe particulièrement faibles voire négatives (-0,10 à 0,44), ces observations révèlent que, pour l'extrémité C-terminale, les vecteurs NH sont animés d'une dynamique très importante (faibles valeurs de nOe) dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde. Compte tenu de toutes ces observations préliminaires, il est particulièrement intéressant d'interpréter ces données selon le modèle de dynamique interne de Lipari-Szabo.

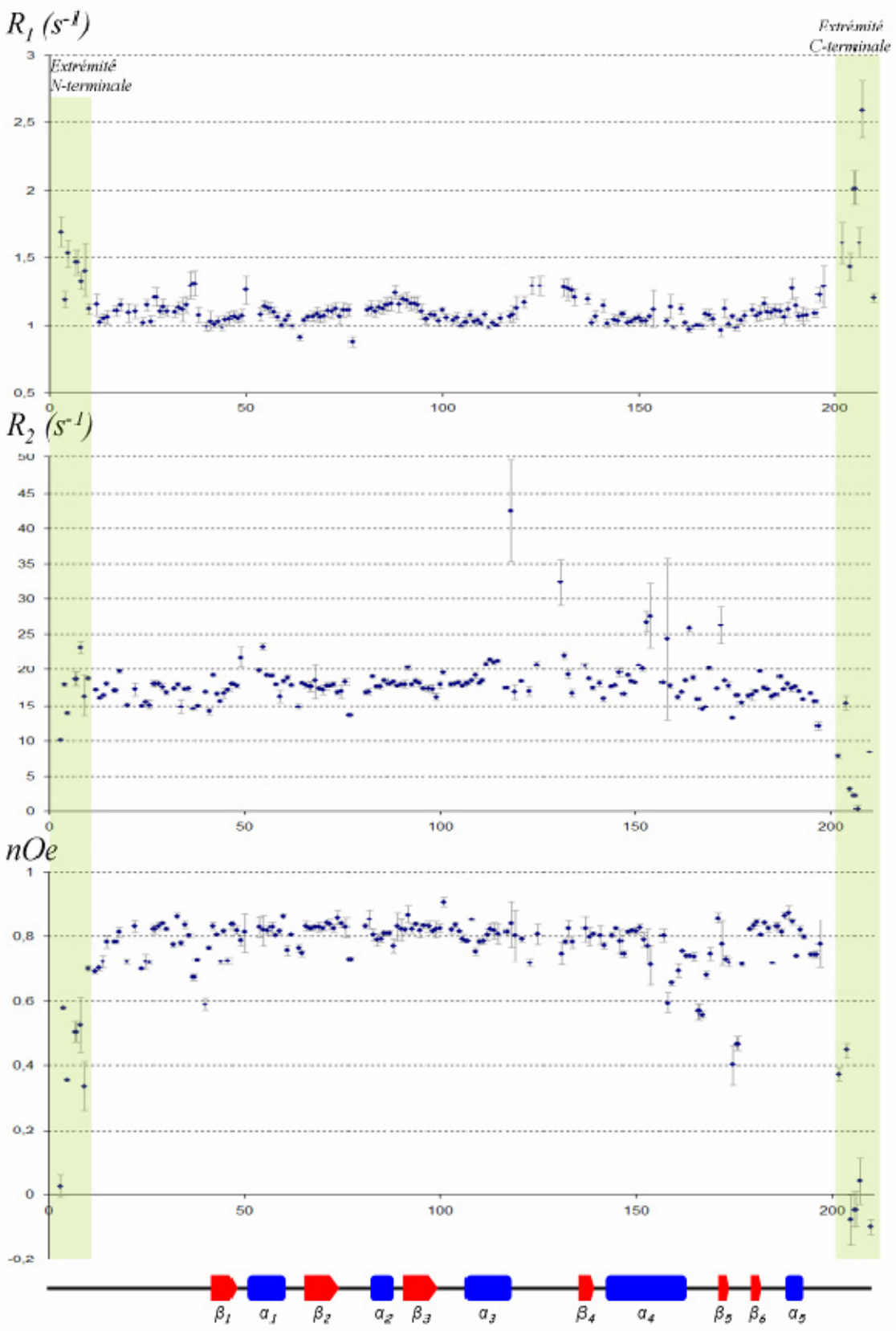


Figure II-34. : ***Distribution des vitesses de relaxation longitudinale (R_1), transversale (R_2) et de l'effet nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N (nOe) le long de la séquence peptidique de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$.*** *Les intervalles d'erreur sont représentés par des barres grises ; les zones d'intérêt sont mises en évidence par un fond vert.*

II-3.4.2 Mobilité interne

Les valeurs de R_1, R_2 et du paramètre nOe ont permis de déterminer la dynamique interne de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution selon le formalisme de Lipari-Szabo en utilisant un modèle de réorientation anisotrope. Les valeurs des rapports R_2/R_1 ont permis de déterminer les tenseurs de diffusion rotationnelle décrivant le modèle de réorientation globale de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution (Tableau II-10)

Tableau II-10 : Modèle de réorientation globale anisotrope de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution

α^a	β^a	γ^a	Dx	Dy	Dz	$\tau_c{}^b$	χ^2/N^c
-13 ± 20	41 ± 22	27 ± 20	$1{,}189.10^7 \pm 2{,}2.10^5\ s^{-1}$	$1{,}349.10^7 \pm 2{,}3.10^5\ s^{-1}$	$1{,}419.10^7 \pm 2{,}1.10^5\ s^{-1}$	12,63 ns	0,31

[a]*Angles polaires α, β et γ décrivant la position des tenseurs de diffusion, Dx Dy et Dz respectivement, dans le repère d'inertie moléculaire. Les intervalles d'erreur proviennent du protocole de Monte-Carlo utilisé pour extrapoler les valeurs expérimentales de R_1 et R_2.*

[b]*Temps de corrélation global anisotrope : $\tau_c = 1/(2Dz+2Dx+2Dy)$.*

[c]*N est le nombre de groupes amides utilisé pour déterminer le modèle de réorientation anisotrope de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution. Les groupes amides ont été choisis sur les critères d'une valeur de paramètre nOe supérieur à 0,8 et des valeurs de R_2/R_1 comprises dans l'intervalle défini par le rapport R_2/R_1 moyen, plus ou moins sa déviation standard. Ces critères réduisent l'analyse à des résidus qui ne sont pas soumis à de larges mouvements ou à des phénomènes d'échange.*

Ce modèle de réorientation globale montre des niveaux d'erreur importants. Toutefois, il a permis de calculer les valeurs de paramètre d'ordre (S^2) pour chaque vecteur NH et, le cas échéant, les valeurs de temps de corrélation local (τ_e) et de contribution d'échange à la vitesse de relaxation transversale (R_2^{ech}), bien que cette analyse reste hautement qualitative, compte tenu de la mauvaise qualité du modèle de réorientation (*Figure II-35*). Les paramètres S^2 et τ_e décrivent respectivement la restriction du mouvement et la vitesse de mouvement des vecteurs NH dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde, le terme R_2^{ech} étant associé à des mouvements (généralement des phénomènes d'échange) de l'ordre de la micro à la milliseconde.

L'examen des valeurs du paramètre d'ordre indique que l'ensemble de la protéine est relativement rigide (avec des valeurs de S^2 supérieures à 0,9), certaines boucles montrant des valeurs de S^2 un peu plus faibles, ce qui suggère une flexibilité modérée de ces segments situés entre les éléments de structures secondaires.

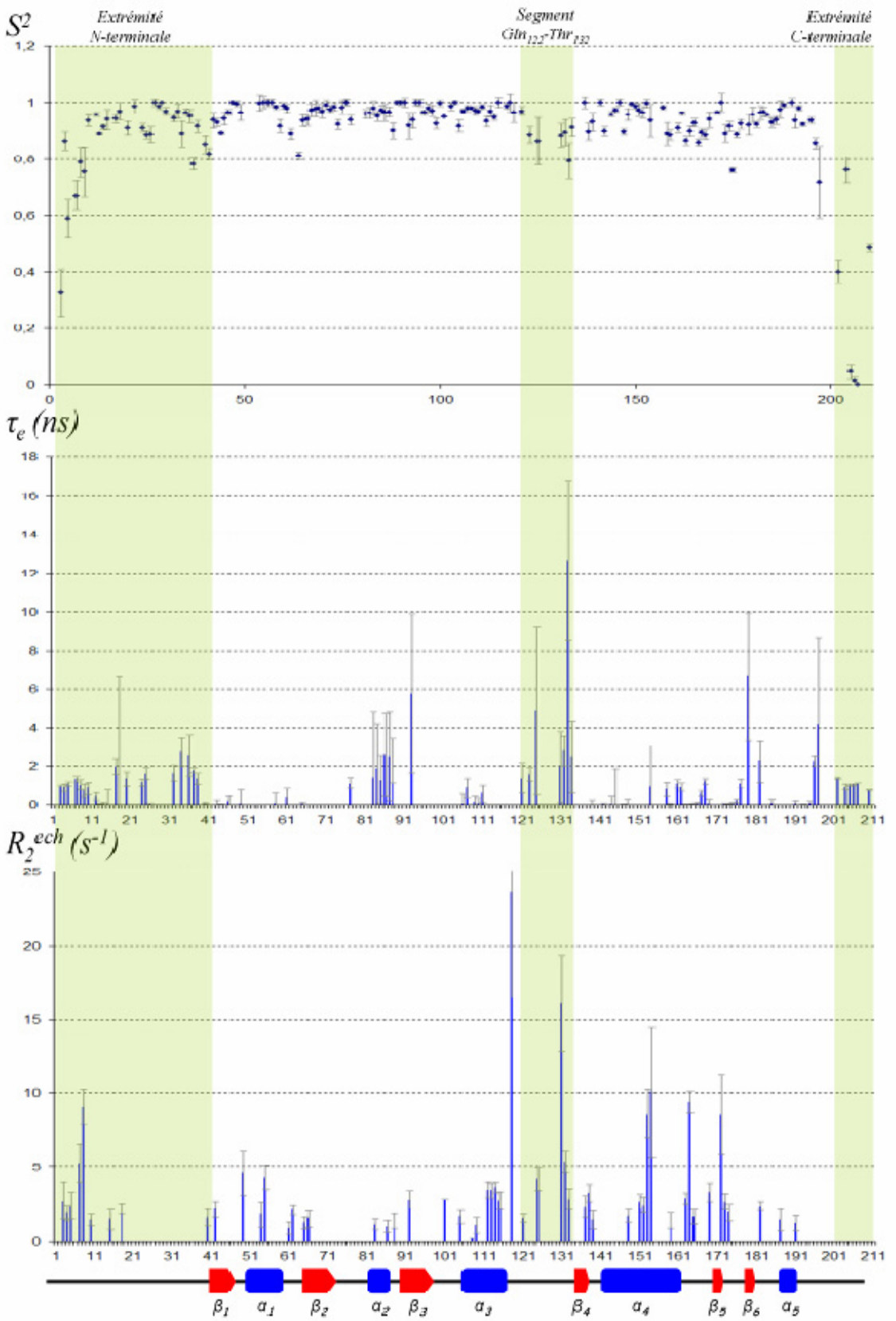


Figure II-35. : Valeurs de mobilité interne de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution. *Les valeurs de mobilité sont indiquées par un point bleu (pour les valeurs de S^2) ou une barre bleue (pour les valeurs de τ_e et R_2^{ech}) ; les intervalles d'erreur sont indiqués par des barres grises ; les zones d'intérêt sont mises en évidence par un fond vert.*

Les vecteurs NH des résidus de l'extrémité N-terminale possèdent des valeurs de S^2 particulièrement faibles (de 0,3 pour le résidu Phe_3 à 0,75 pour le résidu Val_9) associées à des valeurs de temps de corrélation local significatives (de l'ordre de 1 ns), ce qui semble indiquer que ce segment est animé d'une dynamique importante et est donc peu structuré. De plus, ces résidus possèdent un terme d'échange (de 1 à 10 s^{-1}), cette contribution d'échange étant certainement due à un échange conformationnel associé aux larges mouvements de ce segment. Le reste de l'extrémité N-terminale montre des valeurs de S^2 plus faibles que le reste de la protéine ainsi que des valeurs de temps de corrélation local plus importantes (de 2 à 5 ns) et ce, jusqu'au résidu Gly_{41}. Ainsi, l'ensemble de l'extrémité N-terminale (jusqu'au résidu Gly_{41}) présente une certaine flexibilité, le segment Ser_1 à Val_9 subissant les mouvements les plus importants. Cette observation est en accord avec les valeurs importantes de rmsd mesurées sur l'ensemble des 20 structures calculées de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ pour le segment Ser_1 à Gly_{41}.

Peu d'informations sont disponibles sur le segment Gln_{122}-Thr_{132}. Néanmoins, les vecteurs NH de ces résidus, dont les valeurs de mobilité interne sont connues, présentent des valeurs de S^2 plus faibles que le reste de la protéine (jusqu'à 0,79) associées à des valeurs de temps de corrélation local de l'ordre de 2 à 13 ns. Certains de ces vecteurs NH présentent aussi des contributions d'échange importantes (les valeurs les plus élevées étant 23,6 s^{-1} pour le résidu His_{118} et 16,4 s^{-1} pour le résidu Gly_{131}). Ces observations suggèrent que ce segment est animé d'une dynamique peu importante, dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde, mais est surtout soumis à des phénomènes d'échange importants, dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde.

Les vecteurs NH des résidus de l'extrémité C-terminale (des résidus Gly_{202} à Ala_{211}) possèdent des valeurs de S^2 beaucoup plus faibles que pour le reste de la protéine (de 0 à 0,76), ces faibles valeurs étant associées à des valeurs de temps de corrélation local de 1 à 2 ns. Ces observations indiquent que ce segment de l'extrémité C-terminale est animé d'une dynamique très importante dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde. Ces observations sont en bon accord avec les valeurs de rmsd importantes observées pour ces résidus et confirment l'hypothèse d'une extrémité C-terminale très peu structurée. Ces larges mouvements pourraient ainsi permettre de rapprocher suffisamment la cystéine 206 de la cystéine 198 pour autoriser la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}.

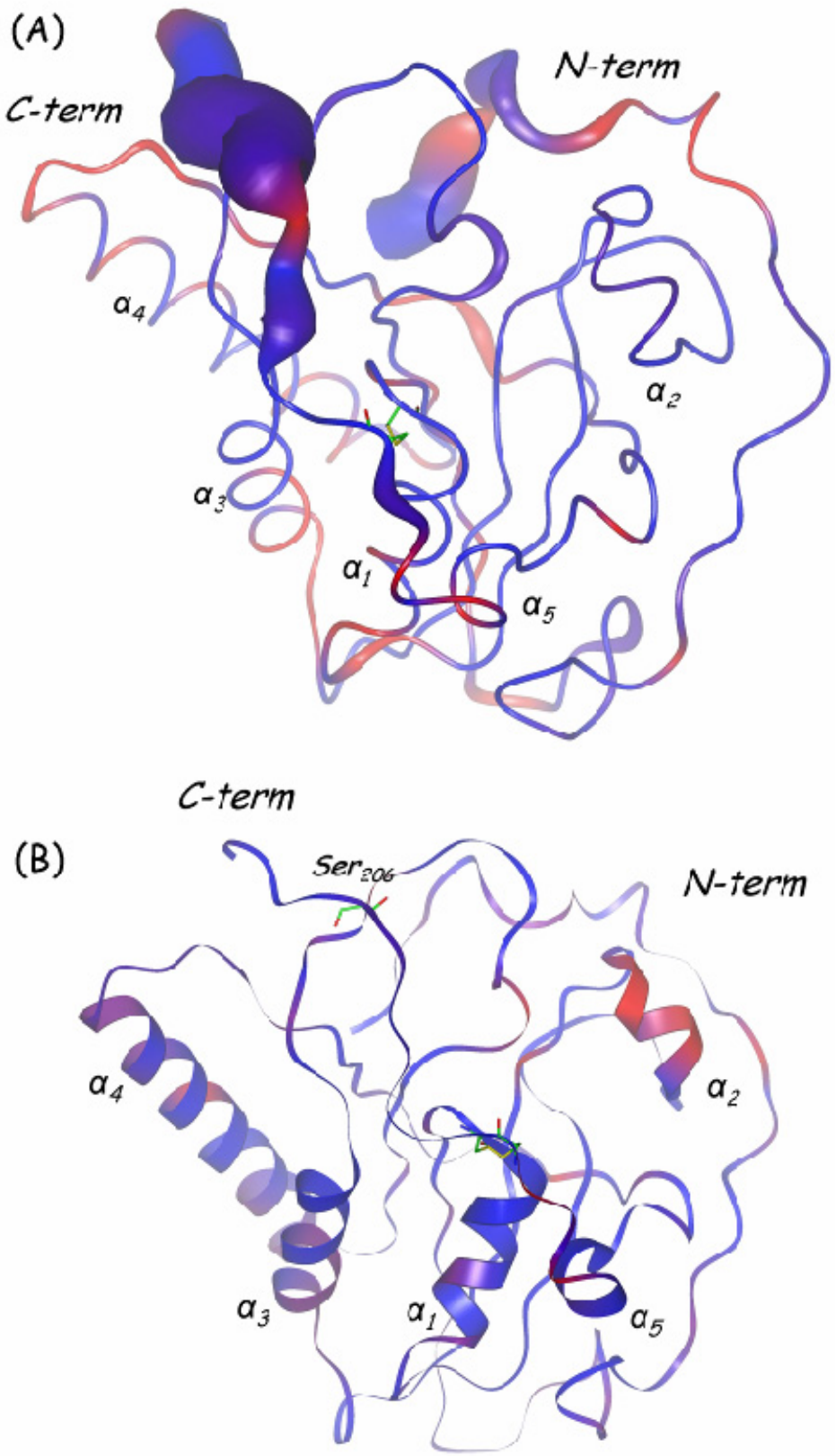


Figure II-36. : Mise en évidence de la mobilité interne sur la structure tridimensionnelle la plus représentative de la conformation de MsrA$^{E.coli}_{C51-C198}$ en solution. *(A) S^2 et τ_e : la taille du ruban représente l'amplitude des mouvements (plus la valeur de S^2 est faible, plus le ruban est épais) ; la couleur représente la vitesse des mouvements (l'intensité du rouge dépend de la valeur de τ_e). (B) R^2_{ech} : l'intensité de la couleur du ruban représente la valeur de R_2^{ech}.*

Enfin, de nombreux vecteurs NH possèdent des contributions d'échange non négligeables, la plupart étant situés à proximité spatiale de l'extrémité C-terminale ou du segment Gln_{122}-Thr_{132} (*Figure II-36*). Cette observation semble indiquer que les mouvements importants de l'extrémité C-terminale et du segment Gln_{122}-Thr_{132} perturbent une grande partie de la protéine. Ces perturbations, qui se manifestent sous la forme de contributions d'échange, peuvent expliquer pourquoi l'attribution séquentielle de $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ a nécessité la mise en œuvre de moyens plus importants (spectres effectués à 800 MHz) et fut plus délicate que celle de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$.

Ainsi, l'étude de la dynamique du squelette peptidique de $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ en solution a permis d'observer que : (i) l'extrémité C-terminale est animée d'une dynamique importante dans la gamme des temps de pico à la nanoseconde, dont les mouvements semblent être d'une amplitude suffisante pour permettre de rapprocher les cystéines 198 et cystéine 206 et ainsi de former le pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206} ; (ii) le segment Gln_{122}-Thr_{132} est peu structuré et est animé de mouvements lents, de l'ordre de la micro à la milliseconde ; (iii) l'ensemble de la protéine est perturbé par ces phénomènes dynamiques.

II-3.5 Relation structure fonction

Cette étude a permis de constater que les propriétés structurales et dynamiques de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ et $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ sont singulièrement différentes (*Figure II-37*),

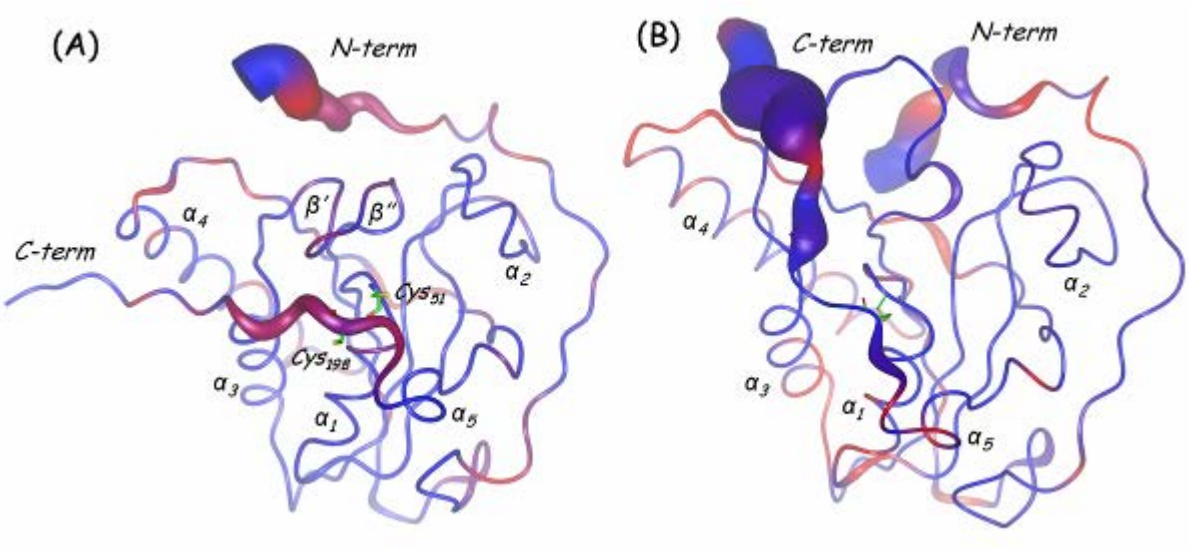


Figure II-37. : Comparaison des propriétés dynamiques (S^2 et τ_c) de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ (A) et $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ (B). *Les principales différences concernent l'extrémité C-terminale, le segment Tyr_{195}-Gly_{201} qui est relativement flexible chez $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ s'avère, du fait de la formation du pont Cys_{51}-Cys_{198}, moins flexible chez $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$; à l'inverse, le reste de l'extrémité C-terminale se révèle animée d'une dynamique beaucoup plus importante chez $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ que chez $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$.*

particulièrement en ce qui concerne l'extrémité C-terminale et le segment Gln_{122}-Thr_{132}. Il est intéressant de discuter comment la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} peut conduire à modifier ces propriétés et comment ces nouvelles propriétés sont en accord avec les fonctions de $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$.

L'examen de la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}$, indique la présence de nombreuses molécules d'eau situées à proximité du site actif (*Figure II-38*). L'une d'entre elles interagit avec le résidu Asp_{129} qui appartient au feuillet *β'-β''* recouvrant le site actif de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ en solution. Il est probable que ces molécules d'eau, en particulier cette dernière qui forme une liaison hydrogène avec le O^{δ} du résidu Asp_{129} et une autre avec le H^{N} du résidu Cys_{51}, stabilisent la conformation du segment Gln_{122}-Thr_{132}. Cette hypothèse, compte tenu du caractère labile des interactions impliquant une molécule d'eau, expliquerait la faible stabilité conformationnelle de ce segment dans la forme réduite $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$.

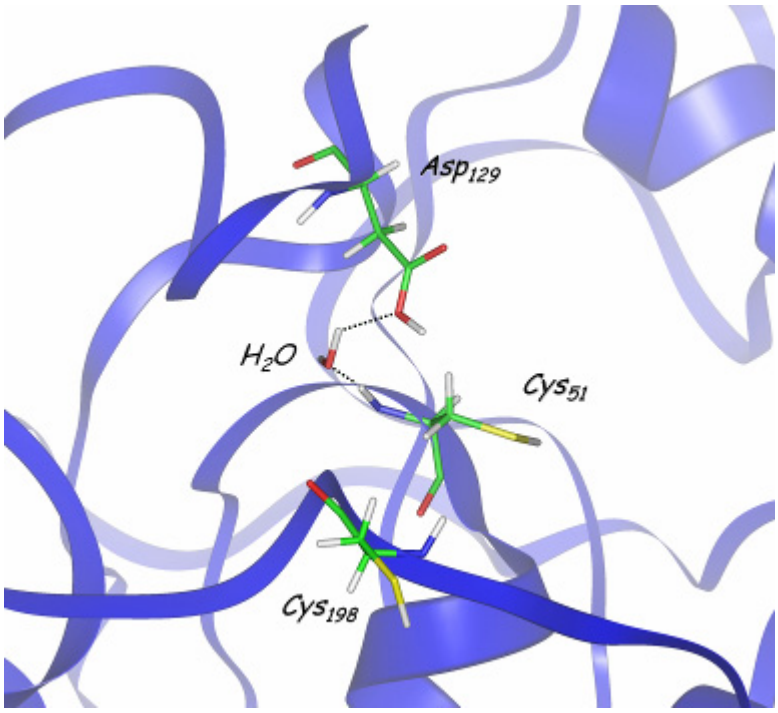


Figure II-38. : Site actif de la structure cristalline de $MsrA^{E.coli}{}_{Red.}$ *Le squelette peptidique est représenté en bleu ; les résidus Cys_{51}, Asp_{129} et Cys_{198} en vert ; la molécule d'eau en rouge et les liaisons hydrogène par des traits noirs pointillés.*

Dans le cadre de cette hypothèse, la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} chasserait les molécules d'eau situées dans le site actif et modifierait ainsi l'environnement du résidu Asp_{129}. Cette modification de l'environnement chimique du résidu Asp_{129} pourrait déstabiliser complètement le feuillet *β'-β''* qui s'avérait déjà faiblement stabilisé dans la forme réduite. La perte de structure du segment Gln_{122}-Thr_{132} conduit à l'exposition de la surface hydrophobe du site actif. Il est alors possible à l'extrémité C-terminale, qui possède

un fort caractère hydrophobe dû à la présence de nombreux résidus hydrophobes (Ile_{200}, Ile_{203}, Val_{205} et Leu_{207}), d'interagir avec cette large surface et d'adopter alors des mouvements d'une amplitude beaucoup plus importante que pour la forme réduite (où le segment Gln_{122}-Thr_{132} recouvre la surface hydrophobe formée par le site actif). Ces mouvements importants vont permettre le rapprochement des cystéines 198 et 206 et favoriser ainsi la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}. De plus, dans le cas des MsrA à une cystéine de recyclage (telle que $MsrA^{M.tub}$), le pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} est directement réduit par la thiorédoxine. La large surface hydrophobe exposée de $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$ pourrait permettre l'interaction avec la thiorédoxine. En effet, de nombreux auteurs ont proposés que le site actif de la thiorédoxine se caractérise, lui aussi, par une large surface hydrophobe (*Figure II-39*), surface qui joue un rôle important lors de l'interaction avec ses partenaires (Eklund *et coll.*, 1984 ; Himawan et Richardson, 1996). Ainsi, la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} pourrait modifier les propriétés structurales, dynamiques et fonctionnelles de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ *via* la déstabilisation du segment Gln_{122}-Thr_{132}.

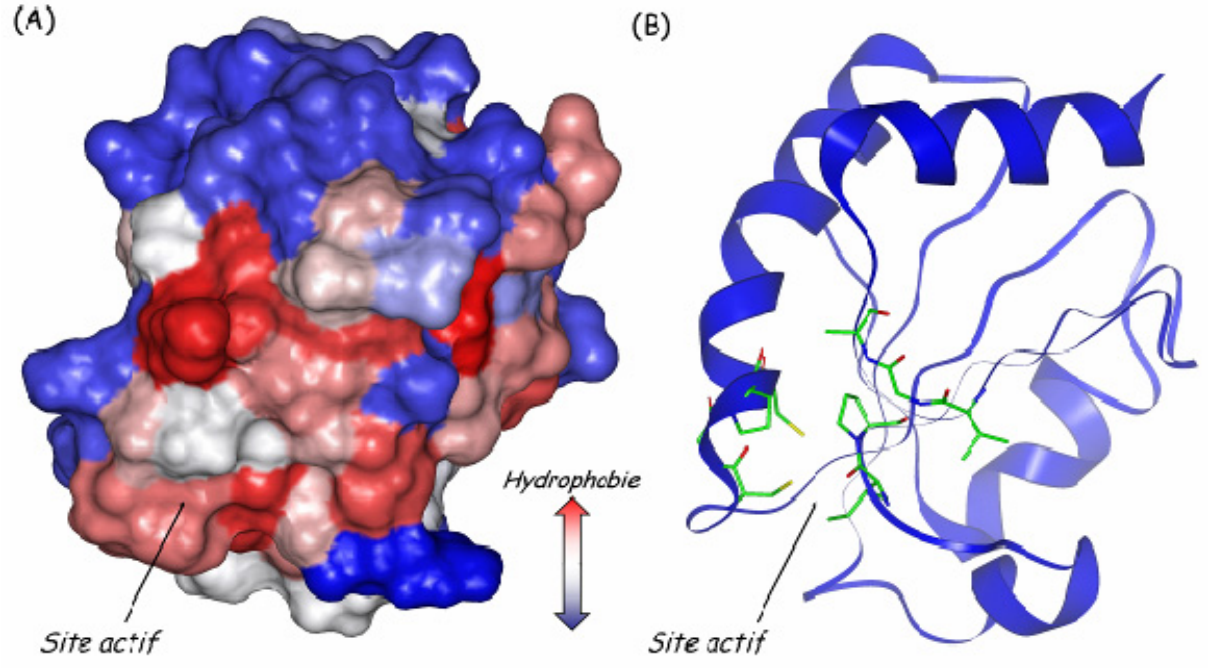


Figure II-39. : (A) Surface de Connolly de la thiorédoxine d'E. coli en solution (Dyson et coll., 1990, code PDB : 1XOB). *La couleur de la surface dépend du degré d'hydrophobie des résidus en surface* ***(B) Site actif de la thiorédoxine d'E. coli.*** *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu, les résidus formant la surface hydrophobe supposée être impliquée dans l'interaction avec les partenaires sont représentés en vert : ils font partie de 3 boucles, la boucle Cys_{32}-Gly_{33}-Pro_{34}-Cys_{35} qui comprend les deux cystéines catalytiques, et les boucles Ile_{75}-Pro_{76} et Val_{91}-Gly_{92}-Ala_{93}.*

II-3.6 Conclusion

Nous avons donc réalisé l'étude structurale et dynamique d'une protéine de 23 KDa grâce à un spectromètre à 600 MHz et en utilisant les classiques contraintes de distance dérivant de la mesure des effets nOe, et ce malgré les nombreux problèmes de recouvrement et la qualité médiocre du signal pour certaines parties de l'enzyme.

Ce travail a permis de déterminer la première structure d'une Msr (certes mutée) sous forme oxydée. La connaissance de la structure tridimensionnelle et de la dynamique en solution de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ a permis de mettre en évidence que les propriétés structurales mais surtout dynamiques de cette forme oxydée sont très différentes de celles de la forme réduite, bien que la conformation globale de l'enzyme ne soit pas affectée. En effet, la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} semble déstabiliser le segment Gln_{122}-Thr_{132}, découvrant ainsi la surface hydrophobe du site actif. D'où deux conséquences majeures : (i) l'amplitude des mouvements de l'extrémité C-terminale, comprenant la seconde cystéine de recyclage (Cys_{206}), s'en trouve augmentée. Cela devrait permettre le rapprochement des cystéines 198 et 206 et ainsi la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}, dernière étape avant la régénération de l'activité réductase pour les MsrA à deux cystéines de recyclage ; (ii) dans le cas des MsrA à une cystéine de recyclage, la surface du site actif, ainsi exposée, devrait permettre l'interaction (de type hydrophobe) avec la thiorédoxine lors de l'étape de régénération de l'activité catalytique. Ainsi, les propriétés structurales et dynamiques de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution sont en bon accord avec ses propriétés biochimiques.

Enfin, la connaissance de la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ suggère que la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} serait permise par un changement de conformation du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}. Il reste donc à déterminer lors de quelle étape du cycle catalytique ce changement conformationnel est susceptible de se produire.

II-4 Matériels et méthodes

II-4.1 Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques utilisés lors de cette étude (marqués ^{15}N, $^{15}N/^{13}C$ et $^{15}N/^{13}C/^{2}H$) ont tous été produits, purifiés et concentrés au MAEM (*cf.* annexe I). Les échantillons de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ ont été obtenus par l'oxydation de double mutant (C86S, C206S) en présence de 3 équivalents de MetSO, puis purifiés par gel filtration et finalement concentrés (*cf.* annexe I). La présence du pont disulfure a été vérifiée par un dosage des thiols libres au DTNB. Tous les échantillons ont été ramenés à un volume de 600 µL pour une concentration de 1 mM (95 % H_2O, 5 % D_2O) dans une solution à pH 7,1 (10 mM de KH_2PO_3), en présence d'azide de sodium (N_3Na) et de TSP-*d4* (Eurisotop) comme référence interne pour le proton. 50 mM de 1,5-dithiotréhytol-*d10* (DTT) ont été ajoutés aux échantillons réduits dans le but d'empêcher l'oxydation des groupes thiol libres. Enfin, les échantillons ont été dégazés et scellés sous azote.

II-4.2 Spectroscopie

Tous les spectres ont été enregistrés à 298 K grâce à un spectromètre Bruker DRX 600 MHz équipé d'une sonde TXI avec gradients trois axes. Les spectres ont été traités avec le logiciel XWINNMR (Bruker) et analysés avec XEASY (Bartels *et coll.*, 1995). Le TSP-*d4* a été utilisé comme référence interne pour le proton (^{1}H), les références pour le carbone (^{13}C) et l'azote (^{15}N) ont été obtenues de manière indirecte (Wishart *et coll.*, 1995).

II-4.3 Mesure de la diffusion translationnelle

Les expériences DOSY ont été réalisées comme suit : l'intensité du gradient z a été calibrée sur un échantillon de D_2O, la séquence utilisée est une séquence LED (longitudinal eddy current delay), les durées des impulsions δ (2 ms) et Δ (200 ms) ont été optimisées pour

obtenir 5 % de signal résiduel avec une intensité de gradient maximale. Chaque expérience a été réalisée avec 2048 points d'acquisition en ^{1}H, les impulsions de gradient ont été incrémentées sur 16 points, de 2 à 95 % d'intensité de gradient selon une rampe linéaire. Après transformée de Fourier et correction de ligne de base, la dimension de diffusion a été traitée avec le module spécifique du logiciel XWINNMR (Bruker).

II-4.4 Attribution séquentielle

L'attribution séquentielle du squelette peptidique a été réalisée grâce aux expériences ^{1}H-^{15}N HSQC, HNCA/HN(CO)CA (Brutscher *et coll.*, 1995 ; Ikura *et coll.*, 1990), HNCO/HN(CA)CO (Clubb *et coll.*, 1992 ; Ikura *et coll.*, 1990), CBCANH, CBCA(CO)NH (Grzesiek et Bax, 1992a ; Grzesiek et Bax, 1992b ; Grzesiek et Bax, 1993) (Tableau II-11). Les raies de résonance des noyaux des chaînes latérales ont été attribuées grâce aux expériences CC(CO)NH (Lin et Wagner, 1999), HCCH-TOCSY (Bax *et coll.*, 1990a ; Bax *et coll.*, 1990b ; Kay *et coll.*, 1990) et HNHA (Vuister et Bax, 1993). Les valeurs de déplacement chimique des noyaux ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N du squelette peptidique et des chaînes latérales ont été déposées dans la banque de données BMRB (http://www.bmrb.wisc.edu) sous la référence 6090 pour MsrA$^{E.coli}_{\text{Red}}$ et 6786 pour MsrA$^{E.coli}_{\text{C51-C198}}$.

Tableau II-11 : Expériences utilisées lors des étapes d'attribution séquentielle

	Acquisition (pts)/largeur spectrale (ppm)						
Expérience	TD1/ω_1 (^{1}H)	TD2/ω_2	TD3/ω_3	ns	Echantillon	Durée (h)	d1(s)
^{1}H-^{15}N HSQC	2048/17	192/35(^{15}N)		64	^{15}N	4	1
HNCA	2048/17	92/35(^{15}N)	64/40(^{13}C)	32	^{13}C, ^{15}N	64	1
HN(CO)CA	2048/17	92/35(^{15}N)	64/40(^{13}C)	32	^{13}C, ^{15}N	64	1
HNCO	2048/17	64/35(^{15}N)	64/30(^{13}C)	40	^{13}C, ^{15}N	50	1
HNCO[a]	2048/17	56/35(^{15}N)	64/30(^{13}C)	24	^{2}H, ^{13}C, ^{15}N	40	1
HN(CA)CO	2048/17	64/35(^{15}N)	64/30(^{13}C)	40	^{13}C, ^{15}N	50	1
CBCANH	2048/17	64/35(^{15}N)	64/66(^{13}C)	48	^{13}C, ^{15}N	65	1
HNCACB[a]	2048/17	48/35(^{15}N)	98/80(^{13}C)	24	^{2}H, ^{13}C, ^{15}N	48	1
CBCA(CO)NH	2048/17	64/35(^{15}N)	64/66(^{13}C)	48	^{13}C, ^{15}N	65	1
CC(CO)NH	2048/17	64/35(^{15}N)	64/70(^{13}C)	80	^{13}C, ^{15}N	109	1
HCCH-TOCSY	2048/17	70/70(^{13}C)	128/17(^{1}H)	32	^{13}C, ^{15}N	91	1
HNHA	2048/17	80/17(^{1}H)	60/35(^{15}N)	32	^{15}N	50	1

[a]Spectres réalisés sur l'échantillon de MsrA$^{E.coli}_{\text{C51-C198}}$ marqué ^{2}H/^{13}C/^{15}N, sur un spectromètre Bruker DRX 800 MHz équipé d'une sonde cryogénique grâce au service de RMN à très haut champ de l'ICSN, Gif sur Yvette.

II-4.5 Etude structurale

II-4.5.1 Contraintes de distance

Les contraintes de distance découlent de l'exploitation des spectres ^{1}H-^{15}N et ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC réalisés avec un temps de mélange de 75 et 150 ms. Une expérience ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC particulière a été effectuée avec une fréquence pour la porteuse ^{13}C de 150 ppm (fréquence moyenne des ^{13}C aromatiques) et un temps de mélange de 70 ms dans le but de réaliser l'attribution des noyaux aromatiques (Tableau II-12). Les corrélations nOe sont mesurées et classées manuellement selon leurs intensités en forte, moyenne, faible, très faible et converties en contraintes de distance avec des limites supérieures respectives de 2,5-3,5-5,5 et 6,5 Å. Les contraintes de distance impliquant des pseudoatomes ont été systématiquement surestimées.

Tableau II-12 : Expériences utilisées lors des études structurales

	Acquisition (pts)/largeur spectrale (ppm)						
Expérience	TD1/ω_1 (^{1}H)	TD2/ω_2	TD3/ω_3	ns	Ech.	Durée	d1(s)
^{1}H-^{15}N HSQC[a]	2048/17	104/35(^{15}N)		16	^{15}N	30*30min	1
^{1}H-^{15}N NOESY HSQC	2048/17	64/35(^{15}N)	128/17(^{1}H)	24	^{15}N	68 h	1
^{1}H-^{15}N/^{13}C NOESY HSQC	2048/17	80/35(^{15}N)	128/17(^{1}H)	32	^{13}C, ^{15}N	100 h	1
^{1}H-^{13}C NOESY HSQC[b]	2048/17	76/35(^{13}C)	128/17(^{1}H)	24	^{13}C, ^{15}N	100 h	2

a : Expériences d'échange réalisées dans le but de déterminer les valeurs de facteurs de protection des groupes amides de la protéine (*cf.* § 5.1.4.3).

b : ^{1}H-^{13}C NOESY HSQC réalisée avec une fréquence de porteuse ^{13}C de 150 ppm, dans le but d'attribuer les noyaux aromatiques.

II-4.5.2 Contraintes angulaires

Les contraintes angulaires des angles dièdres φ et ψ découlent des prédictions, réalisées grâce au logiciel TALOS (Cornilescu *et coll.*, 1999), effectuées à partir des déplacements chimiques des noyaux $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, $^{13}C^{\alpha}$, $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C^{\beta}$, $^{13}C'$. Seuls les angles dièdres ayant leurs 10 prédictions en accord ont été contraints à la valeur moyenne prédite par TALOS (avec un intervalle de tolérance correspondant à la déviation standard, déterminée par TALOS, et un minimum de 10 deg.). Toutes les liaisons peptidiques ont été maintenues planes et en configuration *trans*.

II-4.5.3 Expériences d'échange

Les vitesses d'échange a été mesurée en solubilisant un échantillon lyophilisé, marqué ^{15}N, dans D_2O et en réalisant des expériences ^{1}H-^{15}N HSQC successives d'une durée de 30 minutes durant 15 h. La mesure de l'intensité du signal de chaque groupe amide en fonction du temps permet de déterminer la constante cinétique d'échange k_m grâce à la relation :

$$I_t = I_0 . \exp(-k_m t) \qquad \textit{Eq. II-2}$$

où I_0 est l'intensité du signal au temps 0.

Ces valeurs sont ensuite normalisées, grâce aux valeurs théoriques dans une pelote statistique, pour aboutir aux facteurs de protection (Bai *et coll.*, 1993). Les protons amides, ayant une valeur non nulle de facteur de protection, sont considérés comme engagés dans une liaison hydrogène. Les liaisons hydrogène sont traitées comme deux contraintes de distance, avec une limite supérieure de 2,4 Å entre l'hydrogène et l'hétéroatome accepteur et 3,5 Å entre les hétéroatomes donneur et accepteur.

II-4.5.4 Modélisation moléculaire

L'ensemble de structures a été déterminé à l'aide du logiciel DYANA (Güntert *et coll.*, 1997). Les contraintes angulaires et de distance ont permis de générer 500 structures grâce au protocole de recuit simulé de DYANA. Les 20 structures possédant les valeurs de fonction cible les plus basses ont été sélectionnées pour constituer l'ensemble final des structures représentatives.

II-4.6 Etude dynamique

II-4.6.1 Mesure des vitesses de relaxation

Les mesures des vitesses de relaxation, R_1 et R_2, des noyaux ^{15}N on été effectuées sur un échantillon marqué ^{15}N, grâce aux expériences décrites par Farrow et coll. (Farrow *et coll.*, 1994). Les paramètres de ces expériences sont détaillés dans le tableau II-13 ; les délais utilisés sont résumés dans le tableau II-14.

Tableau II-13 : Expériences utilisées lors des études dynamiques

Expérience	TD1/ω_1 (^{1}H)	TD2/ω_2	ns	Echantillon	Durée	d1(s)
R_1	2048/17	160/35(^{15}N)	32	^{15}N	6 h	5
R_2	2048/17	160/35(^{15}N)	32	^{15}N	6 h	5
nOe	2048/17	256/35(^{15}N)	32	^{15}N	12 h	8

La mesure de l'intensité du signal de chaque groupe amide en fonction du temps a permis de déterminer les vitesses de relaxation grâce à la relation :

$$I(t) = I_0.\exp(-Rt) \qquad \textit{Eq. II-3}$$

où I_0 est l'intensité du signal au temps 0 et R la vitesse de relaxation mise en jeu dans l'expérience. Les vitesses de relaxation longitudinale et transversale ainsi que les intervalles d'erreurs ont été calculés à partir de ces données grâce au programme RELAXFIT (Fushman *et coll.*, 1997).

Tableau II-14 : Délais utilisés lors de la mesure des vitesses de relaxation des noyaux ^{15}N

R_1 (s)	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
R_2 (ms)	16	32	48	56	96	128	160	200

II-4.6.2 Mesure du paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N

La mesure du paramètre nOe ^{1}H-^{15}N a nécessité deux expériences de mesure des effets nOe hétéronucléaires. Dans l'une, le proton subit une saturation ; dans l'autre, on effectue une saturation, hors résonance, pour compenser d'éventuels effets d'échauffement. En pratique, ces expériences sont réalisées lors d'une même expérience en alternant un interférogramme irradié « on resonance » et un interférogramme irradié « off resonance » pour s'affranchir d'éventuelles dérives du champ. Le paramètre nOe ^{1}H-^{15}N a été calculé en appliquant l'équation :

$$nOe = \frac{I}{I_0} \qquad \textit{Eq. II-4}$$

où I et I_0 représentent respectivement l'intensité des pics de corrélation avec et sans saturation préalable sur le proton. L'expérience a été réalisée trois fois, ce qui permet de calculer une valeur moyenne du paramètre nOe ainsi que l'intervalle d'erreur.

II-4.6.3 Calcul de la mobilité interne

Les modèles de réorientation globale anisotrope ont été déterminés grâce au logiciel TENSOR2 (Dosset *et coll.*, 2000), en utilisant les groupes amides ayant une valeur de paramètre nOe supérieur à 0,8 et des valeurs de R_2/R_1 comprises dans l'intervalle défini par le rapport R_2/R_1 moyen plus ou moins sa déviation standard. Ces critères réduisent l'analyse à des résidus qui ne sont pas soumis à de larges mouvements ou à des phénomènes d'échange.

Une fois le modèle de réorientation globale calculé, les valeurs de mobilité interne ont été déterminées avec le logiciel TENSOR2.

Références Bibliographiques

Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins **17***, 75-86.

Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules, *J Biomol NMR **6***, 1-10.

Bax, A., Clore, G. M., Driscoll, P. C., Gronenborn, A. M., Ikura, M., Kay, L. E. (1990a) Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of 13C-labeled proteins, *J Magn Reson **87***, 620-627.

Bax, A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. (1990b) 1H---1H correlation via isotropic mixing of 13C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning 1H and 13C spectra of 13C-enriched proteins, *J Magn Reson **88***, 425-431.

Beraud, S., Bersch, B., Brutscher, B., Gans, P., Barras, F., Blackledge, M. (2002) Direct structure determination using residual dipolar couplings: reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution, *J Am Chem Soc **124***, 13709-15.

Beraud, S., Chambost, J. P., Bersch, B., Gans, P., Barras, F., Marion, D. (2001) Backbone H(N), N, Calpha, C' and Cbeta assignment of the 25 kDa peptide methionine sulfoxide reductase from Erwinia chrysanthemi, *J Biomol NMR **20***, 97-8.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res **28***, 235-42.

Bodenhausen, G., Ruben, D. J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett. **69***, 185.

Brutscher, B., Cordier, F., Simorre, J.-P., Caffrey, M., Marion, D. (1995), *J Biomol NMR **5***, 202-206.

Clubb, R. T., Thanabal, V., Wagner, G. (1992) A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue 1HN, 15N, and 13C' chemical shifts in 15N---13C-labelled proteins, *J Magn Reson **97***, 213-217.

Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J Biomol NMR **13***, 289-302.

Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M., Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data, *J Biomol NMR **16***, 23-8.

Dyson, H. J., Gippert, G. P., Case, D. A., Holmgren, A., Wright, P. E. (1990) Three-dimensional solution structure of the reduced form of Escherichia coli thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry **29***, 4129-36.

Eklund, H., Cambillau, C., Sjoberg, B. M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J. O., Branden, C. I. (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins, *Embo J **3***, 1443-9.

Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by 15N NMR relaxation, *Biochemistry **33***, 5984-6003.

Fushman, D., Cahill, S., Cowburn, D. (1997) The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: analysis of 15N relaxation with monomer/dimer equilibration, *J Mol Biol **266***, 173-94.

Grzesiek, S., Bax, A. (1992a) Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR, *J Am Chem Soc **114***, 6291-6293.

Grzesiek, S., Bax, A. (1992b) An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins, *J Magn Reson **99***, 201-207.

Grzesiek, S., Bax, A. (1993), *J Biomol NMR **3***, 185-204.

Güntert, P., Mumenthaler, C., Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, *J Mol Biol **273***, 283-298.

Himawan, J. S., Richardson, C. C. (1996) Amino acid residues critical for the interaction between bacteriophage T7 DNA polymerase and Escherichia coli thioredoxin, *J Biol Chem **271***, 19999-20008.

Ikura, M., Kay, L. E., Bax, A. (1990) A novel approach for sequential assignment of 1H, 13C, and 15N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin, *Biochemistry **29***, 4659-67.

Kay, L. E., Ikura, M., Bax, A. (1990) Proton-Proton Correlation via Carbon-Carbon Couplings: A Three-Dimensional NMR Approach for the Assignment of Aliphatic Resonances in Proteins Labeled with Carbon- 13, *J Am Chem Soc **112***, 888-889.

Laskowski, R. A., Rullmannn, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J Biomol NMR **8***, 477-86.

Lin, Y., Wagner, G. (1999) Efficient side-chain and backbone assignment in large proteins: application to tGCN5, *J Biomol NMR **15***, 227-39.

Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., Aubry, A. (2000) Crystal structure of the Escherichia coli peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 A resolution, *Structure Fold Des **8***, 1167-78.

Vuister, G. W., Bax, A. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in 15N-enriched proteins, *J Am Chem Soc **115***, 7772-7777.

Williamson, R. A., Carr, M. D., Frenkiel, T. A., Feeney, J., Freedman, R. B. (1997) Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation, *Biochemistry* ***36***, 13882-9.

Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., Sykes, B. D. (1995) 1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR, *J Biomol NMR* ***6***, 135-40.

Chapitre III

Etude des intermédiaires du cycle catalytique de la MsrA d'Escherichia coli

Sommaire du chapitre III

III-1 INTRODUCTION 162

III-2 ETUDE DU COMPLEXE ENZYME/SUBSTRAT 164

III-2.1 LE MUTANT C51A 165

III-2.2 TITRAGE PAR LE SUBSTRAT 169

III-2.2.1 Titrage de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat doublement protégé 171

III-2.2.2 Cartographie de déplacement chimique 176

III-2.3 CONCLUSION 180

III-3 ETUDE DE L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 181

III-3.1 LE TRIPLE MUTANT C86S, C198S, C206S DE $MSRA^{E.COLI}$ 181

III-3.2 L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 185

III-3.2.1 Cartographie de déplacement chimique 185

III-3.2.2 Comportement cinétique de l'intermédiaire acide sulfénique 188

III-3.2.3 Etude Dynamique 189

III-3.3 CONCLUSION 192

III-4 MATERIEL ET METHODES 193

III-4.1 ETUDE DU COMPLEXE ENZYME/SUBSTRAT 193

III-4.2 ETUDE DE L'INTERMEDIAIRE ACIDE SULFENIQUE 194

III-1 Introduction

L'étude de la structure tridimensionnelle et de la dynamique en solution de la forme réduite et d'une forme oxydée de $MsrA^{E.coli}$ (Cys_{51}-Cys_{198}) n'a pas permis de mettre en évidence les mécanismes moléculaires permettant la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Toutefois, ces études ont montré, entre autres, que : (i) la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} semble permise par un changement de conformation du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198} de l'extrémité C-terminale de l'enzyme ; (ii) la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206} est permise par les larges mouvements de l'extrémité C-terminale de la forme oxydée $MsrA^{E.coli}{}_{C51\text{-}C198}$. Il reste donc à déterminer lors de quelle étape du cycle catalytique intervient le changement de conformation qui conduit à la formation du premier pont disulfure, et quelle est la force motrice qui le provoque. Ce changement conformationnel intervient nécessairement lors de l'une des étapes du mécanisme catalytique entre la forme réduite et la première forme oxydée (Cys_{51}-Cys_{198}). L'examen du mécanisme catalytique détaillé (*Figure III-1*) permet d'identifier deux étapes entre la forme réduite et la première forme oxydée, l'une d'elle conduisant nécessairement au changement conformationnel du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198}. Ces deux étapes sont : (i) la formation du complexe non covalent enzyme/substrat définie par la constante de dissociation du complexe (K_D), suivie de la formation réversible du complexe covalent (étape IA) avec la formation d'une liaison entre le soufre de la cystéine catalytique et le soufre de la MetSO ; (ii) la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, concomitante avec la libération du substrat réduit *via* le réarrangement du complexe covalent enzyme/substrat (étape IB). L'étape suivante est la formation du premier pont disulfure entre la cystéine 51 et la cystéine 198. Ces étapes sont rapides et ne peuvent être étudiées par RMN, elles relèvent de l'étude cinétique.

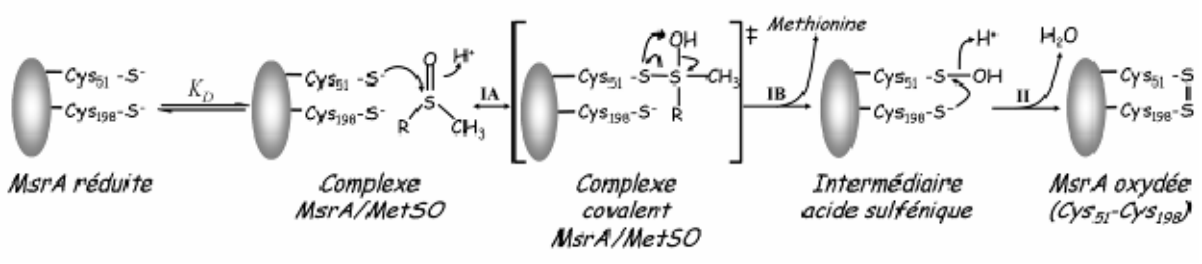


Figure III-1. : Mécanisme catalytique détaillé des MsrA.

Néanmoins, certains états transitoires entre ces étapes peuvent être isolés, tels que le complexe enzyme/substrat ou l'intermédiaire acide sulfénique. Il serait particulièrement pertinent de procéder à l'étude de ces intermédiaires par la mise en œuvre de différentes techniques de RMN.

III-2 Etude du complexe enzyme/substrat

Cette partie s'intéressera au premier état transitoire intervenant lors du mécanisme catalytique de MsrA, c'est-à-dire le complexe enzyme/substrat. Les trois structures cristallines connues sont toutes sous forme de complexe ou d'adduit avec des mimes du substrat. Elles sont ainsi représentatives du complexe non covalent enzyme/substrat (dans le cas de $MsrA^{M.tub}$ cristallisée sous forme de complexe avec une méthionine d'un monomère voisin de la maille cristalline) ou du complexe covalent enzyme/substrat (la cystéine 51 est sous forme d'adduit diméthyl arsenate dans le cas de $MsrA^{E.coli}$, tandis qu'une molécule de DTT est liée aux cystéines 51 et 198 dans le cas de $MsrA^{B.tau}$). Les sites actifs de ces trois structures cristallines sont en bon accord entre elles en terme de résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat, de position et de conformation de ces résidus, ceci laisse supposer que : (i) la formation de la liaison covalente entre le soufre de la cystéine 51 et celui de la fonction sulfoxyde du substrat n'entraîne pas de changement conformationnel important ; (ii) les deux complexes (covalent et non covalent) adoptent *a priori* la même conformation. De plus, dans aucune de ces trois structures, les distances entre les C^{β} des cystéines 51 et 198 ne sont compatibles avec la formation d'un pont disulfure, ce qui laisse supposer que le changement conformationnel du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198} n'intervient pas lors de la formation du complexe enzyme/substrat.

Néanmoins, il est possible que la conformation du complexe enzyme/substrat en solution soit différente de celle des structures cristallines. C'est pourquoi cette étude s'intéressera aux propriétés de ce complexe en solution, l'objectif étant de caractériser, d'un point de vue structural, qualitativement mais aussi quantitativement, la reconnaissance du substrat.

Pour ce faire, il est nécessaire d'isoler une forme stable du complexe enzyme/substrat. Le complexe covalent n'est pas accessible puisqu'il se réarrange spontanément pour libérer le

substrat réduit et conduire à l'intermédiaire acide sulfénique. Mais le complexe non covalent pourrait être isoler en utilisant un mutant inactif de $MsrA^{E.coli}$ (où la cystéine catalytique Cys_{51} est remplacée par un autre résidu).

Un protocole de titrage de l'enzyme par son substrat peut être envisagé pour cette étude. Celui-ci présenterait le double avantage de ne pas nécessiter l'attribution séquentielle du complexe/enzyme substrat à saturation (en effet, dans des conditions d'échange rapide entre la forme libre et la forme complexée au substrat de MsrA, le suivi du changement de déplacement chimique des raies de résonance est aisé) et devrait permettre de déterminer la constante de dissociation du complexe enzyme/substrat (K_D).

III-2.1 Le mutant C51A

Pour réaliser cette étude, il est nécessaire d'isoler une forme stable du complexe enzyme/substrat en utilisant un mutant inactif de $MsrA^{E.coli}$, incapable de former le complexe covalent. Un tel mutant a été obtenu en remplaçant la cystéine catalytique (Cys_{51}) par une alanine. En effet, le caractère particulièrement hydrophobe du site actif rend préférable l'utilisation d'un acide aminé de nature hydrophobe et non une sérine (résidu isostériquement plus proche de la cystéine, mais aussi plus hydrophile), qui risquerait de perturber de manière importante la conformation de la protéine. Ce mutant C51A a été préparé par mutagenèse dirigée et produit au MAEM (*cf.* annexe I).

Un échantillon marqué ^{15}N du mutant C51A réduit de $MsrA^{E.coli}$ ($MsrA^{E.coli}{}_{C51A}$) a été préparé (1mM, pH 7,1 10 mM de KH_2PO_3, 50 mM de DTT) dans le but d'observer les éventuelles perturbations générées par cette mutation. Ces influences ont été estimées par l'examen du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC qui a été aisément attribué par analogie avec celui de la protéine sauvage. La plupart des noyaux ont en effet des valeurs de déplacement chimique proches ; seule la résonance du résidu Ala_{51} n'a pu être attribuée.

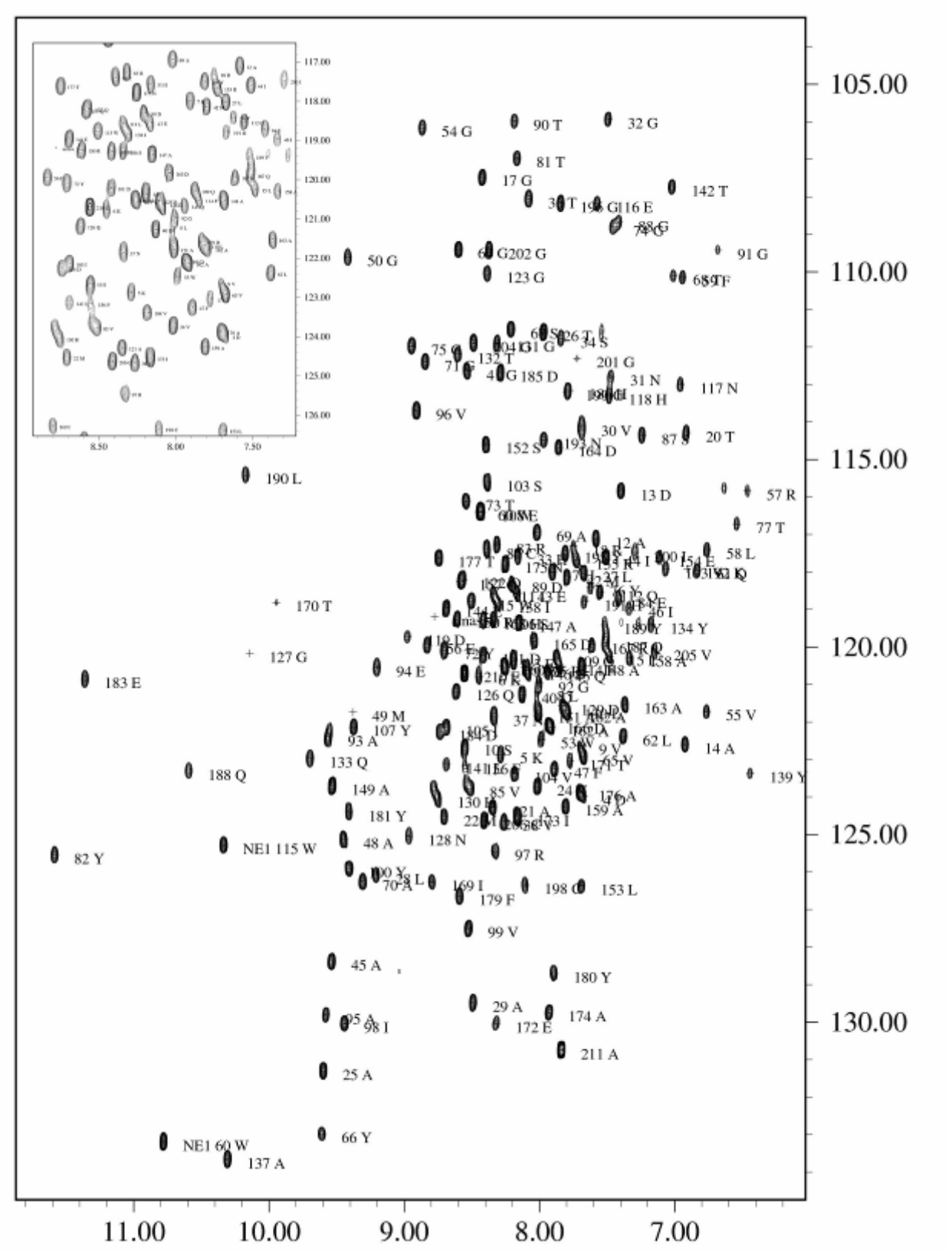


Figure III-2. : ***Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ réduite marquée ^{15}N, 1 mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1.***

Les perturbations d'environnement chimique générées par la mutation sont estimées en comparant les différences de déplacement chimique des groupes amides secondaires entre la protéine sauvage et la protéine mutée, par le biais de la valeur consensuelle $\Delta\delta$ (*cf.* équation II-1, chap. II). La valeur de $\Delta\delta$ pour chaque groupe amide secondaire du squelette peptidique est représentée Figure III-3-A, on estime qu'une valeur de $\Delta\delta$ supérieure à 0,1 ppm indique un changement représentatif de l'environnement chimique. Ainsi, on constate que la mutation C51A perturbe significativement les résidus Gly_{50}, Trp_{53} à Val_{55}, Arg_{57}, Val_{85}, Glu_{94}, Val_{96}, Arg_{125}, Gln_{133}, Tyr_{134}, Asp_{184}, Gln_{188} à Leu_{190}, Cys_{198} et Gly_{199}. La mise en évidence de ces perturbations significatives sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure III-3-B*) montre qu'elles sont toutes spatialement proches de l'alanine 51. Ainsi la mutation C51A perturbe légèrement ($\Delta\delta$ < 0,2 ppm pour la plupart) l'ensemble de l'environnement local de l'alanine 51, et ce jusqu'à l'extrémité C-terminale qui lui fait face (Cys_{198} et Gly_{199}). Seuls les résidus les plus proches de l'alanine 51 (Trp_{53} à Val_{55}) sont perturbés de manière plus importante ($\Delta\delta$ respectivement de 0,4, 0,54 et 0,23 ppm). Ces observations laissent supposer que la mutation C51A engendre des perturbations certes nombreuses, compte tenu de sa position au cœur de l'enzyme, mais mineures. Elles ne devraient influer que faiblement, d'un point de vue conformationnel, sur la reconnaissance du substrat par $MsrA^{E.coli}_{C51A}$.

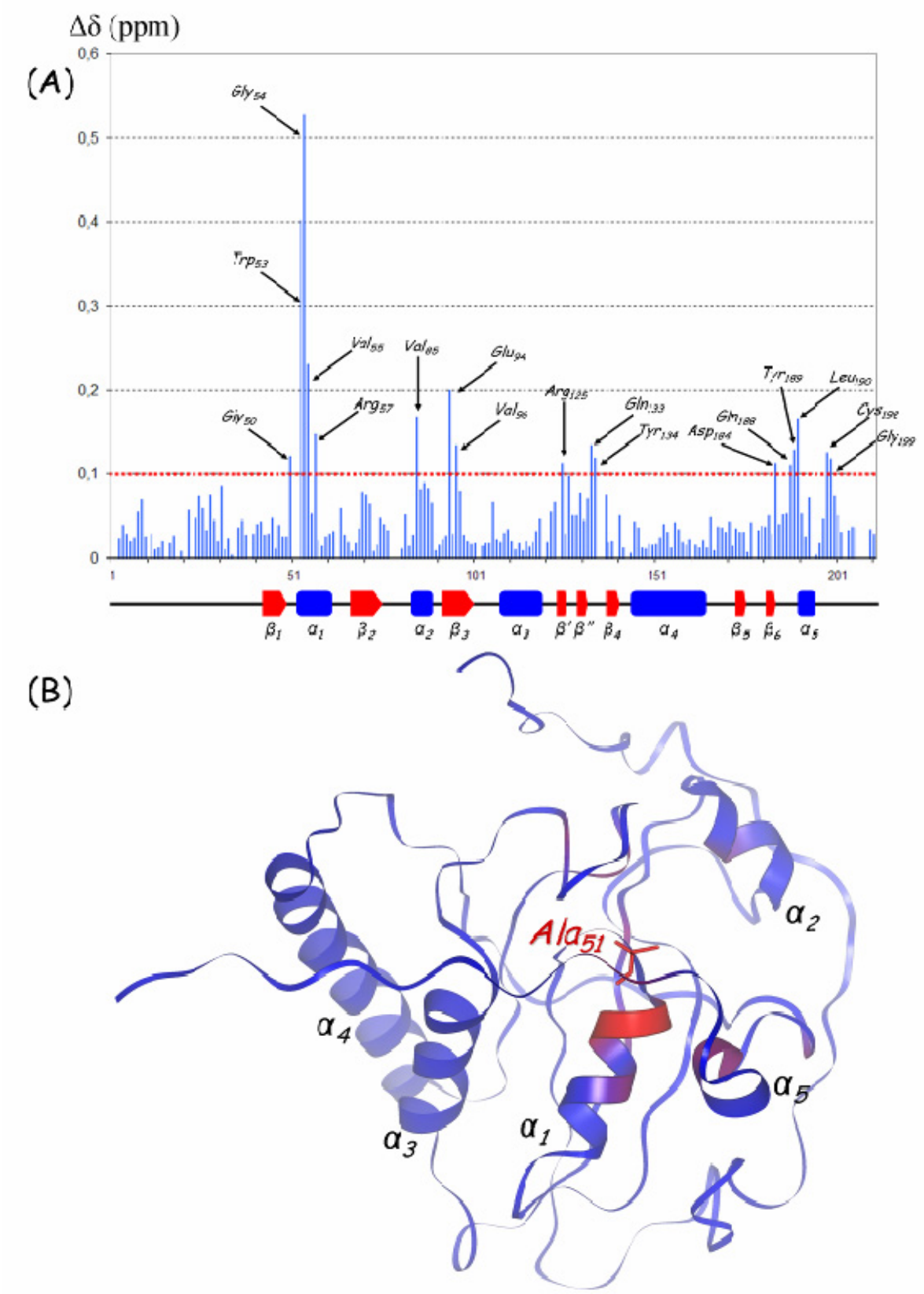


Figure III-3. : ***(A) Perturbations des déplacements chimiques des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la mutation C51A le long du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation sur la structure tridimensionnelle en solution de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ des perturbations des déplacements chimiques des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la mutation C51A.*** *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus perturbés de manière significative (Δδ > 0,1 ppm) ; est aussi indiquée la position du résidu Ala$_{51}$.*

III-2.2 Titrage par le substrat

Le protocole choisi pour cette étude est le titrage de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat. Ce protocole permet de suivre, par RMN, la formation du complexe enzyme/substrat, en réalisant une série de spectres avec une concentration croissante en substrat et une concentration constante en protéine. Dans le cas d'un système binaire 1:1, comme c'est le cas pour le complexe MsrA/MetSO, la formation du complexe est décrite par l'équation :

$$E + S \underset{}{\overset{K_D}{\rightleftharpoons}} ES \qquad \textit{Eq. III-1}$$

où E est l'enzyme, S le substrat et ES le complexe enzyme/substrat.

La constante de dissociation du complexe (K_D) décrit la concentration des différentes espèces à l'équilibre :

$$K_D = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad \textit{Eq. III-2}$$

Pour chaque espèce, la fréquence de résonance d'un noyau donné (de l'enzyme comme du substrat) va changer (d'autant plus si le noyau en question est directement impliqué dans la formation du complexe). S'il y a un échange rapide entre la forme libre et la forme complexée de MsrA (sur l'échelle de temps de la mesure RMN), le déplacement chimique observé pour ce noyau est alors la moyenne pondérée de ses deux déplacements chimiques, dans la forme libre et dans la forme complexée :

$$\delta_{obs} = X_E \delta_E + X_{ES} \delta_{ES} \qquad \textit{Eq. III-3}$$

avec δ_E et δ_{ES}, les déplacements chimiques respectifs d'un noyau donné dans l'enzyme libre et dans le complexe enzyme/substrat. X_E et X_{ES} sont les proportions relatives de l'enzyme libre et du complexe enzyme/substrat :

$$X_E = \frac{[E]}{[E]+[ES]} \text{ et } X_{ES} = \frac{[ES]}{[E]+[ES]} \qquad \textit{Eq. III-4}$$

Si le système est en excès de substrat par rapport à l'enzyme, l'expression du déplacement chimique observé devient alors (*cf.* annexe III) :

$$\delta_{obs} = \delta_E + \Delta\delta.\left(\frac{[S]_0}{K_D + [S]_0}\right) \qquad \textit{Eq. III-5}$$

avec $\Delta\delta = \delta_{ES} - \delta_E$ et $[S]_0$ la concentration totale en substrat ([S] + [ES]). Ainsi, le déplacement chimique observé ne dépend plus que de $\Delta\delta$, K_D et $[S]_0$. Ainsi, en réalisant un titrage de l'enzyme par le substrat, il est possible de mesurer un déplacement chimique observé sur une gamme de concentration de substrat, et ce pour un grand nombre de noyaux (en réalisant, par exemple, des spectres ^1H-^{15}N HSQC). $[S]_0$ et δ_E étant connus, il est possible

de tracer une courbe de titrage pour chaque résonance du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC et ainsi, d'extrapoler les valeurs de K_D et δ_{ES} pour chaque résonance du spectre (en effet, δ_{ES} n'est théoriquement pas mesurable puisque la saturation en substrat n'est atteignable qu'à une concentration infinie en substrat). La détermination des $\Delta\delta$ de chaque groupe amide de l'enzyme permet d'évaluer qualitativement les interactions entre l'enzyme et son substrat, c'est-à-dire de réaliser une cartographie de la zone d'interaction. L'extrapolation des valeurs de K_D permet d'évaluer quantitativement les interactions entre l'enzyme et son substrat. Ces informations permettent ainsi d'aboutir à une représentation assez complète du mode d'interaction de l'enzyme avec son substrat.

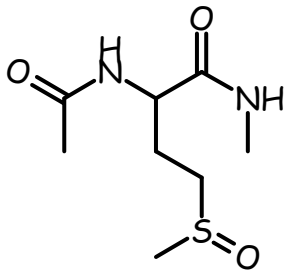


Figure III-4. : Formule développée du substrat doublement protégé Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe. *La méthionine sulfoxyde est ici protégée par un groupe acétyle sur son extrémité N-terminale et par un groupe méthylamine sur son extrémité C-terminale. La présence de ces groupements protecteurs, qui miment le squelette peptidique, génère une meilleure affinité de MsrA pour le substrat.*

MsrA montre une affinité particulièrement faible pour la MetSO libre. Pour rester dans une gamme de concentration en substrat raisonnable (inférieure à 1 M), nous avons choisi de réaliser le titrage avec un substrat protégé aux extrémités N et C-terminales : Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe (*Figure III-4*). La présence des groupes protecteurs, qui miment le squelette peptidique, est à l'origine d'une meilleure affinité de MsrA pour son substrat (il semblerait donc que le squelette peptidique du substrat intervienne d'une manière non négligeable dans l'interaction avec l'enzyme). La constante de dissociation du complexe enzyme/substrat est alors de l'ordre de 30 mM à pH 7 (Mathias Antoine, communication personnelle), ce qui suggère de réaliser une gamme de concentration en substrat de 0 à 250 mM. Le substrat est utilisé en mélange des deux énantiomères de la fonction sulfoxyde. Toutefois, MsrA reconnaît uniquement et spécifiquement l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde, l'énantiomère *R* n'est donc pas substrat (Moskovitz *et coll.*, 2000). De plus, il n'est pas non plus inhibiteur (Olry *et coll.*, 2002). La présence de l'énantiomère *R* de la fonction sulfoxyde ne devrait donc pas perturber la mesure de la constante de dissociation du complexe enzyme/substrat.

III-2.2.1 Titrage de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat doublement protégé

Une série de 10 spectres ^{1}H-^{15}N HSQC a été réalisée à une concentration constante en MsrA$^{E.coli}_{C51A}$ et une concentration croissante en substrat doublement protégé (mélange des deux diastéréoisomères : Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe) (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Gamme de concentration en substrat doublement protégé réalisée lors du titrage de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[*Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe*] (mM)	0	9	18	23	35	60	87	120	165	253
[MsrA$^{E.coli}_{C51A}$] (mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

L'examen des spectres ^{1}H-^{15}N HSQC révèle qu'une proportion importante des corrélations subit une variation de déplacement chimique en fonction de la concentration en substrat. Les autres corrélations ne montrent que de faibles changements de déplacement chimique, voire aucune modification (*Figure III-5-A et B*). Ces observations indiquent que : (i) les forme libre et complexée de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$ sont en échange rapide sur l'échelle de temps de la mesure RMN (dans le cas contraire, les spectres ^{1}H-^{15}N HSQC montreraient deux familles de résonances, une pour la forme libre et l'autre correspondant à la forme complexée de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$) ; (ii) tous les résidus de l'enzyme ne sont pas affectés de la même manière par l'interaction avec le substrat.

Le déplacement chimique (dans la dimension ^{1}H ou ^{15}N) d'un pic de corrélation du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC évolue, en fonction de la concentration en substrat, selon une courbe asymptotique croissante ou décroissante (*Figure III-5-C*). Il est ainsi possible d'utiliser l'équation III-5 pour chaque pic de corrélation du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC (grâce aux déplacements chimiques de ces corrélations dans la dimension du ^{1}H mais aussi dans la dimension de l'azote ^{15}N) pour extrapoler une valeur de K_D et de $\Delta\delta$ pour chaque noyau des groupes amides secondaires possédant une corrélation observable sur le spectre ^{1}H-^{15}N HSQC. Il en résulte deux valeurs de K_D et deux valeurs de $\Delta\delta$ pour chaque résidu de la protéine.

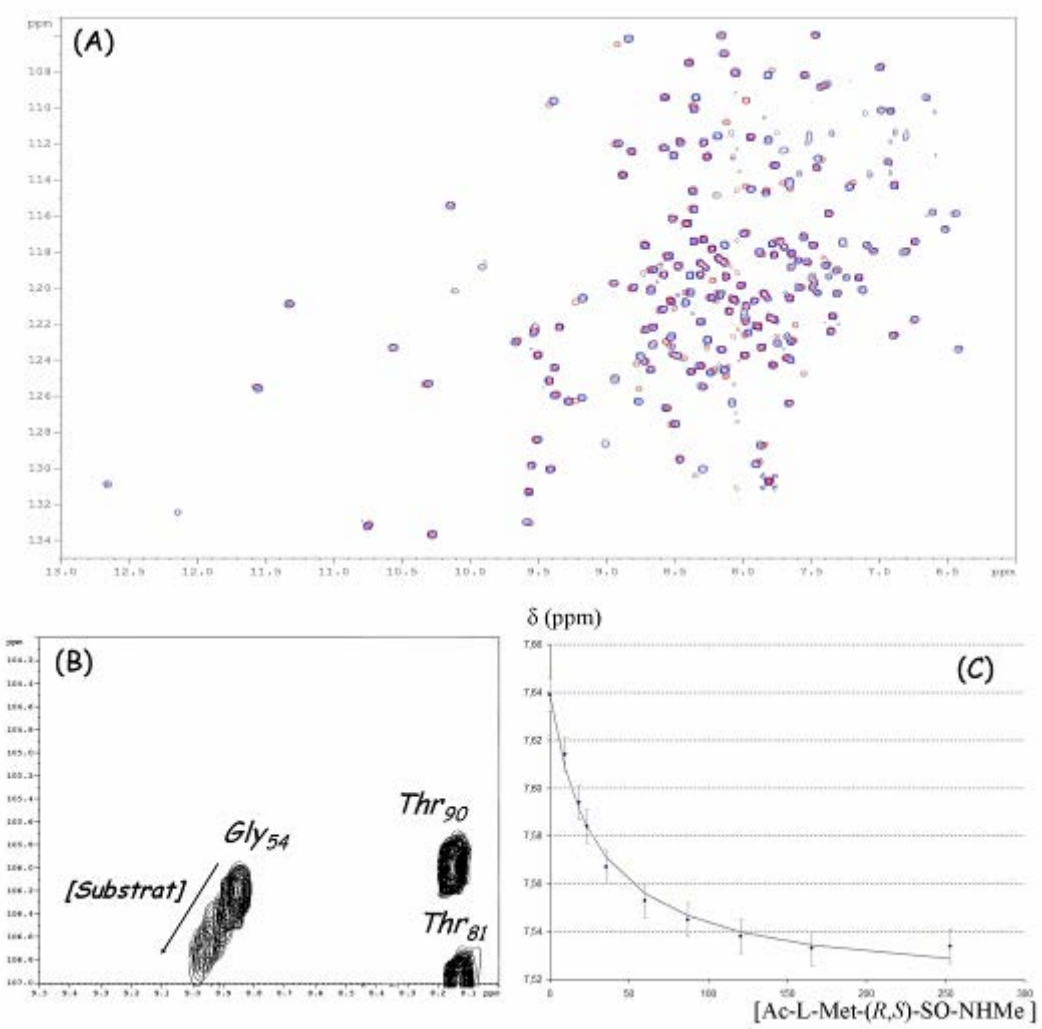


Figure III-5. : Suivi du titrage de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat doublement protégé Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe. *(A) superposition des spectres ^{1}H-^{15}N HSQC de MsrA$^{E.coli}_{C51A}$ en l'absence de substrat (résonances en bleu) et en présence de 253 mM de substrat (résonances en rouge) ; (B) Superposition d'une région spectrale de 10 spectres effectués lors du titrage ; (C) Variation du déplacement chimique du noyau ^{1}H du groupe amide du résidu Asp$_4$ en fonction de la concentration en substrat ; les points expérimentaux sont représentés en bleu ; les barres d'erreur en gris ainsi que la courbe théorique calculée grâce à l'équation III-5.*

Cependant, certaines corrélations ne sont pas exploitables. En effet, les déplacements chimiques des pics de corrélation subissant d'importants recouvrements avec d'autres pics de corrélation ne peuvent être mesurés qu'avec une précision médiocre. De plus, les noyaux possédant des différences de déplacement chimique de l'ordre de l'intervalle d'incertitude sur la mesure de ces valeurs (soit SW/TD, *cf.* matériels et méthodes) conduisent à des valeurs calculées de K_D et $\Delta\delta$ très peu précises. Ainsi, seules 25 % des corrélations du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC ont permis de calculer les valeurs de K_D et $\Delta\delta$. De plus, la plupart de ces valeurs ont été calculées grâce aux perturbations d'environnement chimique des noyaux ^{1}H. En effet, la précision des mesures des déplacements chimiques est plus importante dans la dimension du proton (acquisition directe avec 2048 points) que dans celle de l'azote ^{15}N (acquisition

indirecte avec seulement 128 points). L'ensemble des valeurs de K_D et de $\Delta\delta$ qui ont pu être calculées, ainsi que leur intervalle d'erreur, est reporté dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : Valeurs de K_D et $\Delta\delta$ ayant pu être calculées lors du titrage de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ par Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe.

Résidu	Noyau	K_D (mM)	$\Delta\delta$ (ppm)
4	^{1}H	29 ± 2	-0,12 ± 0,01
	^{15}N	29 ± 2	1,03 ± 0,02
6	^{1}H	16 ± 2	0,07 ± 0,01
7	^{1}H	14 ± 2	-0,03 ± 0,01
9	^{1}H	19 ± 1	-0,07 ± 0,01
10	^{1}H	17 ± 2	0,03 ± 0,01
	^{15}N	13 ± 1	0,36 ± 0,01
14	^{1}H	20 ± 3	-0,02 ± 0,01
15	^{1}H	309± 135	0,03 ± 0,01
17	^{1}H	48 ± 8	-0,01 ± 0,01
24	^{1}H	196 ± 45	-0,03 ± 0,01
25	^{15}N	29 ± 4	-0,08 ± 0,01
29	^{1}H	363 ± 109	-0,03 ± 0,01
30	^{1}H	100 ± 7	0,08 ± 0,01
31	^{1}H	108 ± 18	-0,09 ± 0,01
33	^{15}N	75 ± 3	1,58 ± 0,03
34	^{1}H	79 ± 4	-0,12 ± 0,01
	^{15}N	82 ± 7	-0,74 ± 0,02
36	^{15}N	137 ± 20	-0,27 ± 0,02
38	^{1}H	109 ± 8	-0,07 ± 0,01
44	^{1}H	53 ± 6	-0,03 ± 0,01
46	^{1}H	97 ± 17	-0,02 ± 0,01
50	^{1}H	80 ± 6	0,05 ± 0,01
	^{15}N	77 ± 5	0,51 ± 0,01
54	^{1}H	849 ± 217	0,46 ± 0,1
55	^{15}N	53 ± 5	0,22 ± 0,01
56	^{1}H	24 ± 3	0,03 ± 0,01
61	^{1}H	32 ± 5	-0,03 ± 0,01
66	^{1}H	50 ± 4	-0,04 ± 0,01
67	^{1}H	95 ± 5	-0,14 ± 0,01
	^{15}N	97 ± 6	-1,58 ± 0,04
68	^{1}H	129 ± 17	-0,05 ± 0,01

69	^{1}H	45 ± 4	-0,03 ± 0,01
71	^{15}N	17 ± 2	0,12 ± 0,01
72	^{15}N	29 ± 2	-0,25 ± 0,01
75	^{1}H	21 ± 13	0,02 ± 0,01
81	^{1}H	26 ± 3	-0,02 ± 0,01
82	^{15}N	25 ± 3	-0,10 ± 0,01
83	^{15}N	22 ± 5	-0,10 ± 0,01
84	^{1}H	13 ± 3	-0,02 ± 0,01
85	^{1}H	23 ± 1	-0,08 ± 0,01
	^{15}N	14 ± 2	0,21 ± 0,01
86	^{1}H	20 ± 4	-0,03 ± 0,01
87	^{1}H	32 ± 2	-0,04 ± 0,01
	^{15}N	43 ± 4	-0,30 ± 0,01
93	^{1}H	26 ± 4	-0,03 ± 0,01
94	^{1}H	24 ± 1	0,06 ± 0,01
	^{15}N	25 ± 2	0,31 ± 0,01
96	^{1}H	45 ± 6	-0,02 ± 0,01
98	^{1}H	35 ± 5	-0,02 ± 0,01
100	^{15}N	65 ± 7	-0,14 ± 0,01
121	^{1}H	21 ± 3	-0,03 ± 0,01
126	^{1}H	57 ± 5	0,03 ± 0,01
127	^{1}H	68 ± 10	-0,03 ± 0,01
133	^{1}H	59 ± 16	-0,04 ± 0,01
134	^{1}H	23 ± 4	-0,02 ± 0,01
139	^{1}H	29 ± 3	-0,02 ± 0,01
142	^{1}H	33 ± 5	-0,02 ± 0,01
147	^{1}H	53 ± 26	-0,01 ± 0,01
152	^{1}H	28 ± 5	-0,01 ± 0,01
153	^{1}H	30 ± 3	-0,02 ± 0,01
154	^{1}H	32 ± 6	-0,03 ± 0,01
158	^{1}H	20 ± 2	-0,03 ± 0,01
160	^{1}H	101 ± 13	-0,12 ± 0,01
167	^{1}H	24 ± 3	-0,03 ± 0,01
169	^{15}N	45 ± 1	-0,94 ± 0,01
170	^{1}H	84 ± 9	-0,04 ± 0,01
	^{15}N	72 ± 3	-0,53 ± 0,01
171	^{15}N	31 ± 3	-0,41 ± 0,01
172	^{1}H	33 ± 2	0,07 ± 0,01
	^{15}N	25 ± 3	0,47 ± 0,01

173	^{15}N	27 ± 2	0,46 ± 0,01
174	^{1}H	28 ± 3	-0,03 ± 0,01
	^{15}N	32 ± 2	-0,23 ± 0,01
179	^{1}H	39 ± 3	-0,03 ± 0,01
180	^{1}H	23 ± 3	-0,03 ± 0,01
181	^{1}H	30 ± 5	-0,02 ± 0,01
183	^{1}H	23 ± 2	-0,05 ± 0,01
193	^{1}H	301 ± 42	0,09 ± 0,01
195	^{1}H	215 ± 33	-0,10 ± 0,01
196	^{1}H	106 ± 10	-0,05 ± 0,01
197	^{1}H	68 ± 29	0,04 ± 0,01
	^{15}N	74 ± 23	0,29 ± 0,01
198	^{1}H	152 ± 18	-0,22 ± 0,01
	^{15}N	190 ± 11	2,38 ± 0,08
199	^{15}N	33 ± 21	-0,2 ± 0,03
200	^{1}H	47 ± 8	-0,04 ± 0,01
201	^{15}N	213 ± 28	0,43 ± 0,03
205	^{1}H	22 ± 6	-0,02 ± 0,01
206	^{1}H	923 ± 23	-0,02 ± 0,01

Ainsi, les variations d'environnement chimique des groupes amides du squelette peptidique de la protéine permettent d'évaluer l'importance (Δδ) et la dépendance vis-à-vis de la concentration en substrat (K_D) des perturbations générées par l'interaction avec le substrat. L'examen de l'ensemble des valeurs de K_D et Δδ indique clairement que les différents noyaux ne perçoivent pas la fixation du substrat de la même manière. Certains noyaux sont fortement perturbés par cette interaction (tels que le N^{H}_{33} avec une valeur de Δδ de 2,38 ppm), d'autres noyaux ne le sont que très légèrement (tels que le H^{N}_{152} avec une valeur de Δδ de -0,01 ppm). De plus, quelle que soit l'intensité de ces perturbations, leur dépendance vis-à-vis de la concentration en substrat n'est pas la même. Certains noyaux sont perturbés par des interactions « fortes » avec le substrat (tels que H^{N}_{84} avec un K_D calculé de 13 mM) alors que d'autres le sont par des interactions moins fortes (tels que H^{N}_{54} avec un K_D calculé de 849 mM). Une telle disparité dans les valeurs de K_D extrapolées n'est pas surprenante et est observée dans de nombreuses études similaires (Noguera *et coll.*, 2005). Il est alors communément admis de faire la moyenne des K_D calculées grâce aux noyaux montrant les différences de déplacement chimique les plus importantes, ce qui conduit ici à une valeur de K_D global de l'ordre de 110 mM. Les études biochimiques réalisées suggèrent une valeur de l'ordre de 30 mM (Mathias Antoine, communication personnelle). Or, la plupart des valeurs

de K_D qui ont pu être calculées sont de l'ordre de 30 mM. De plus, compte tenue de la concentration très élevée en substrat qui a dû être utilisée, certaines valeurs importantes de K_D qui sont observées (jusqu'à 800 mM) pourraient être dues à des interactions non spécifiques. Dès lors, la plupart des valeurs de K_D calculées se situent dans l'intervalle de 20 à 60 mM (pour un mélange des deux diastéréoisomères Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe). Ces dernières valeurs sont en bon accord avec les données biochimiques (Mathias Antoine, communication personnelle). MsrA est, en effet, faiblement affine pour son substrat. Enfin, il semble que la mutation C51A ne perturbe que peu la reconnaissance du substrat.

III-2.2.2 Cartographie de déplacement chimique

Les valeurs de Δδ, déterminées grâce au protocole de titrage de MsrA par le substrat doublement protégé, permettent de cartographier les zones d'interaction de l'enzyme avec son substrat. De la même manière que dans le cas d'une mutation, les perturbations d'environnement chimique générées par la fixation du substrat sont estimées grâce à la valeur consensuelle Δδ (*cf.* équation II-1, chap. II). Ici, les valeurs de $\Delta\delta^{1}$H et $\Delta\delta^{15}$N utilisées sont celles calculées par extrapolation de l'équation III-5. Les valeurs de Δδ (n'ayant pu être extrapolées) des corrélations subissant des recouvrements, ou lorsqu'il s'agit de différences de déplacement chimique trop faibles, sont celles mesurées grâce au spectre ^{1}H-^{15}N HSQC enregistré sur l'échantillon possédant la plus forte concentration en substrat (253 mM). Les valeurs de Δδ ainsi mesurées sont moins précises que les valeurs calculées. Néanmoins, il se trouve (*a posteriori*) que la plupart des résidus concernés ne participent que peu ou pas à l'interaction avec le substrat. La valeur de Δδ pour chaque groupe amide du squelette peptidique est représentée sur la Figure III-6-A. La fixation du substrat doublement protégé perturbe de manière significative les résidus Asp_4, Leu_8, Val_9, His_{28}, His_{33}, Ser_{34}, Gly_{50}, Gly_{54}, Ser_{67}, Val_{85}, Glu_{94}, Phe_{156}, Met_{160}, Ile_{169}, Thr_{170}, Glu_{172}, Asn_{193}, Tyr_{195}, Gly_{196}, Cys_{198}, Gly_{201}, Gly_{202}. La mise en évidence de ces perturbations significatives sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure III-6-B*) révèle que l'essentiel de ces perturbations est localisé autour du site actif (dans la région de l'alanine 51), mais concerne aussi des parties de l'enzyme plus éloignées du site de fixation putatif du substrat.

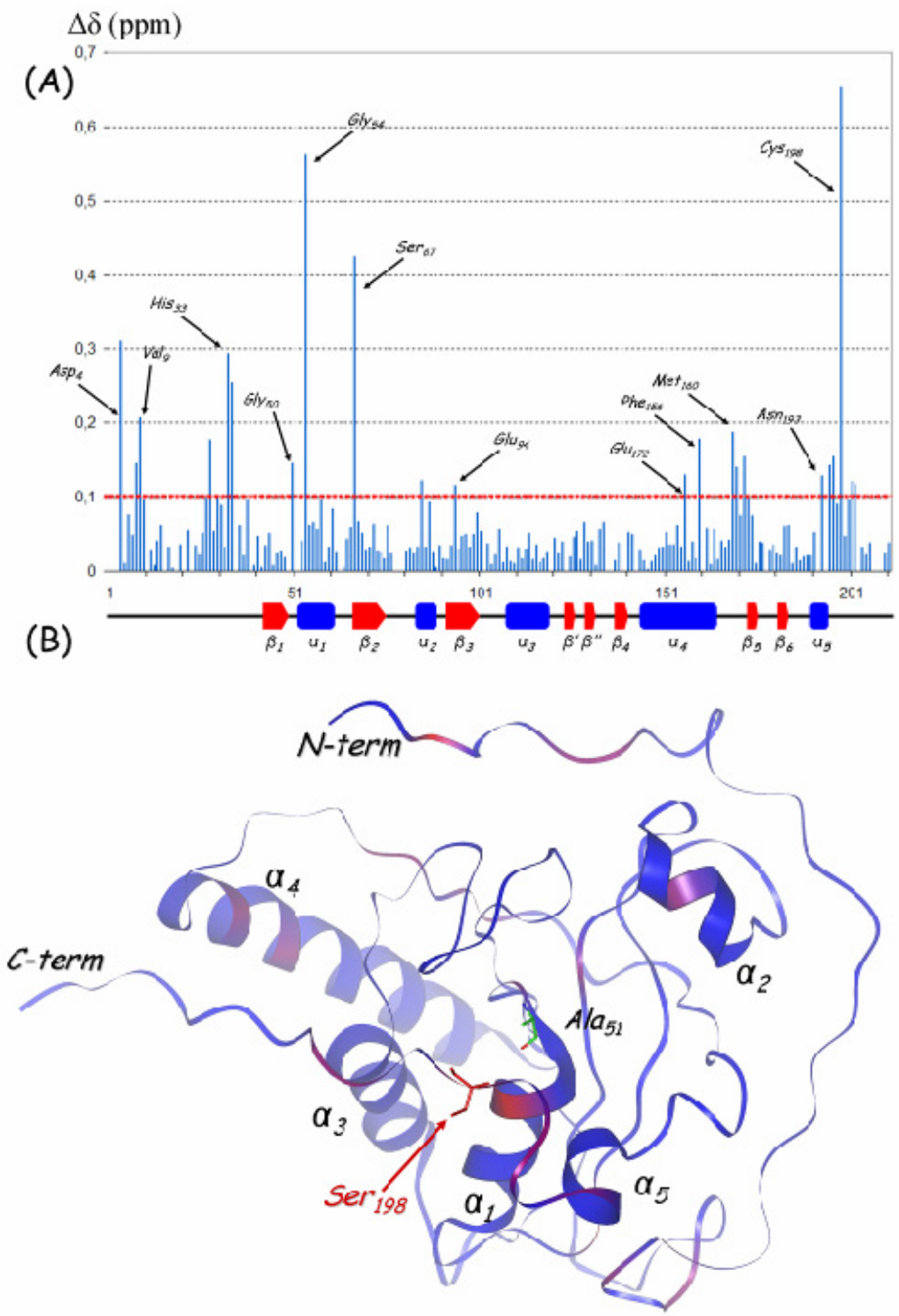


Figure III-6. : ***(A) Perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par l'interaction avec le substrat le long du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation sur la structure tridimensionnelle en solution de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ des perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par l'interaction avec le substrat.*** *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus perturbés de manière significative (Δδ > 0,1 ppm).*

En première analyse, ces résultats peuvent sembler inattendus. En effet, les structures cristallines des MsrA d'*E.coli*, *B. taurus* et *M. tuberculosis* étant toutes sous forme d'adduit

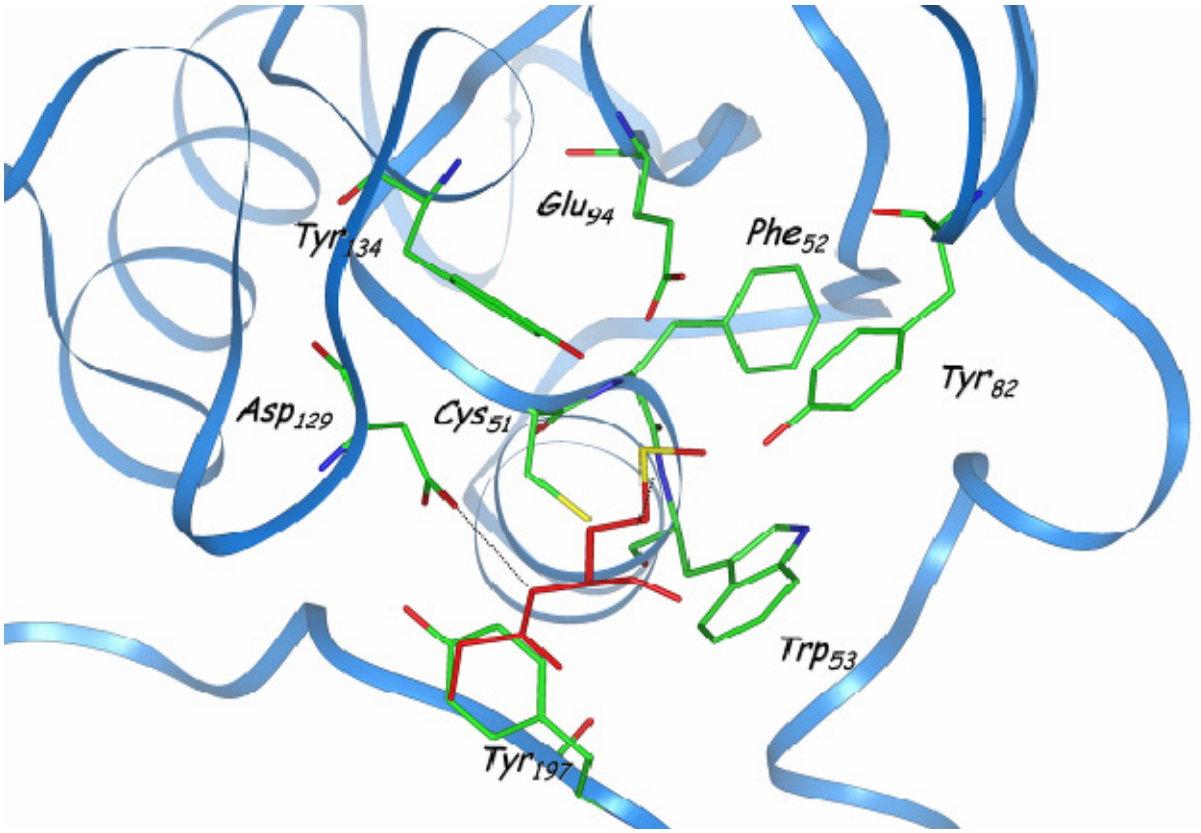


Figure III-7. : Conformation du site actif de la MsrA de <u>M. tuberculosis</u> déterminée par cristallographie (Taylor et coll., 2003). *Une méthionine d'un monomère voisin est présente dans le site actif (peptide représenté en rouge). Cette dernière pourrait mimer la position du substrat dans le site actif. Dans cette hypothèse, le groupe méthyle de la MetSO se situerait dans une poche hydrophobe formée par les résidus Phe_{52} et Trp_{53}. L'oxygène de la MetSO pourrait être stabilisé par trois liaisons hydrogène avec les hydroxyles des résidus Tyr_{134} et Tyr_{82} et l'atome H^{δ} du résidu Glu_{94}. Le H^{N} de la MetSO pourrait former une liaison hydrogène avec l'atome O^{δ} du résidu Asp_{129}, et la liaison peptidique qui précède le résidu de MetSO est stabilisée par une interaction hydrophobe avec le résidu Tyr_{197}*

ou de complexe, la structure supposée du complexe MsrA/MetSO est bien connue (*Figure III-7*). On pourrait alors s'attendre à ce que les résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat (Phe_{52}, Trp_{53}, Tyr_{82}, Glu_{94}, Asp_{129}, Tyr_{134} et Tyr_{197}) soient les plus perturbés par l'interaction avec ce dernier. Or, les résidus Trp_{53}, Tyr_{82}, Asp_{129}, Tyr_{134} et Tyr_{197} ne montrent que des valeurs de $\Delta\delta$ très faibles, seul le résidu Glu_{94} présentant une valeur de $\Delta\delta$ à peine représentative (0,115 ppm).

Cependant, compte tenu du protocole utilisé (titrage suivi grâce à des spectres ^{1}H-^{15}N HSQC), nous ne sommes en mesure d'observer que les perturbations générées dans l'environnement du squelette peptidique (plus précisément des groupes amides secondaires). Or, pour l'ensemble de ces résidus, seules les chaînes latérales sont impliquées dans la reconnaissance du substrat. Il est donc possible que les groupes amides de ces résidus ne soient que peu affectés par la fixation du substrat. En second lieu, les propriétés structurales et

dynamiques de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution décrites au chapitre II suggèrent que : (i) les résidus impliqués dans la reconnaissance spécifique de la fonction sulfoxyde adoptent des conformations rigides et bien définies. Ainsi, leur conformation, et à plus forte raison l'environnement chimique de leur groupe amide, n'en serait que peu affectée par la fixation du substrat ; (ii) les résidus impliqués dans la reconnaissance du squelette peptidique, en particulier l'extrémité C-terminale, sont eux plus flexibles, et changent de conformation lors de la fixation du substrat. Il est alors possible d'observer des perturbations d'environnement chimique plus importantes pour les groupes amides secondaires de ces résidus (comme c'est le cas pour le résidu Cys_{198}).

Dés lors, les perturbations observées lors de l'interaction avec le substrat sont alors en bon accord avec ces observations. En effet, les résidus Trp_{53}, Tyr_{82}, Glu_{94}, Tyr_{134}, qui sont impliqués dans la reconnaissance de la fonction sulfoxyde du substrat, ne voient pas l'environnement chimique de leur groupe amide perturbé. Le résidu Glu_{94}, qui ne possède pas la même conformation dans l'enzyme libre en solution que dans le complexe enzyme/substrat déterminé par cristallographie (*cf.* chap. II), voit son groupe amide légèrement perturbé (ce qui pourrait être dû au changement de conformation de sa chaîne latérale). Le segment Tyr_{195} à Cys_{198} (à l'exception du résidu Tyr_{197} qui interagit avec le substrat par l'intermédiaire de sa chaîne latérale) ainsi que les résidus Gly_{201} et Gly_{202} possèdent eux des valeurs de $\Delta\delta$ significatives, et en particulier le résidu Cys_{198} ($\Delta\delta$ = 0,65 ppm), ce qui suggère que ce segment de la protéine est fortement perturbé par la fixation du substrat, ce qui correspondrait à un changement de conformation. Cette observation étant en bon accord avec l'hypothèse d'une adaptabilité conformationnelle de ce segment. De plus, la modification des propriétés structurales de l'extrémité C-terminale, intervenant lors de la fixation du substrat, semble se répercuter sur l'extrémité de l'hélice α_4 (dont les résidus possèdent des valeurs de $\Delta\delta$ importantes) avec laquelle elle interagit, voire même sur l'extrémité N-terminale (résidus Asp_4 et Val_9).

Ainsi, l'examen des perturbations d'environnement chimique des groupes amides générées lors de la fixation du substrat, confirme les observations faites au chapitre II, c'est-à-dire une rigidité importante des résidus impliqués dans la reconnaissance de l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde, et une adaptabilité conformationnelle importante de l'extrémité C-terminale. Cette adaptabilité conformationnelle permet à l'enzyme de reconnaître une grande variété de substrat sulfoxyde.

III-2.3 Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude du complexe non covalent enzyme/substrat est en très bon accord avec les données biochimiques disponibles, ainsi qu'avec les propriétés structurales et dynamiques de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution. En effet, cette étude a montré que les résidus impliqués dans la reconnaissance de la fonction sulfoxyde sont peu perturbés par l'interaction avec le substrat (valeurs de $\Delta\delta$ faibles). Ces mêmes résidus adoptent des conformations bien définies dans la structure en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$, toutes ces observations vont dans le sens d'une reconnaissance spécifique de l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde du substrat. A l'inverse, les résidus impliqués dans l'interaction avec le squelette peptidique sont fortement perturbés (valeurs de $\Delta\delta$ faibles). Ces mêmes résidus, en particulier le segment Gly_{196}-Gly_{199} de l'extrémité C-terminale, adoptent des conformations variables. De plus, ils se sont révélés animés d'une dynamique importante dans la structure en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$. Ces observations vont dans le sens d'une reconnaissance relativement peu spécifique du squelette peptidique du substrat, et d'une adaptabilité conformationnelle de certains segments de l'enzyme leur conférant la capacité de s'adapter à de nombreux substrats sulfoxydes différents.

Enfin, les perturbations d'environnement chimique importantes observées au niveau de l'extrémité C-terminale lors de l'interaction avec le substrat (en particulier pour le résidu Cys_{198}) suggère qu'un changement de conformation de l'extrémité C-terminale, en particulier du segment Gly_{196}-Gly_{199}, intervient lors de la formation du complexe enzyme/substrat. Malheureusement, aucune information ne permet de déterminer l'importance de ce changement de conformation et s'il permet effectivement le rapprochement des cystéines 51 et 198. Cependant, cette étude est en bon accord avec les structures des complexes enzyme/substrat déterminées par cristallographie (en terme de résidus impliqués). De plus, la comparaison de la structure en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ avec les structures cristallines des complexes enzyme/substrat a permis d'observer des différences de conformation entre la forme native en solution et les complexes, en particulier en ce qui concerne la chaîne latérale du résidu Tyr_{197}. Ce changement de conformation lors de la fixation du substrat pourrait expliquer les fortes perturbations d'environnement chimique observées pour l'extrémité C-terminale. Ce qui laisse supposer que le rapprochement des cystéines 51 et 198 n'intervient pas à ce stade du cycle catalytique.

III-3 Etude de l'intermédiaire acide sulfénique

L'étude du complexe enzyme/substrat semble indiquer, entre autres, que les structures cristallines connues sont représentatives de la structure tridimensionnelle du complexe en solution. Cela implique que le rapprochement des cystéines 51 et 198 n'intervient pas à ce stade du cycle catalytique. C'est pourquoi nous nous intéresserons, dans cette partie, au second état transitoire intervenant lors du mécanisme catalytique de MsrA, c'est-à-dire l'intermédiaire acide sulfénique ($MsrA_{Sulf}$). En effet, le site actif de MsrA est particulièrement hydrophobe compte tenu du nombre important de résidus aromatiques qui le composent. La présence du groupe hydroxyle (particulièrement hydrophile) de l'acide sulfénique sur la cystéine 51, situé au cœur de cet environnement hydrophobe, pourrait engendre un réarrangement conformationnel conduisant au rapprochement des cystéines 51 et 198.

III-3.1 Le triple mutant C86S, C198S, C206S de $MsrA^{E.coli}$

Dans le but d'isoler l'intermédiaire acide sulfénique ($MsrA_{Sulf}$) il est nécessaire d'utiliser un mutant, incapable de former le premier pont disulfure (Cys_{51}-Cys_{198}). Un tel mutant a été réalisé et produit au MAEM en remplaçant, grâce à un protocole de mutagenèse dirigée, les cystéines 86, 198 et 206 par des sérines (*cf.* annexe I). La mutation C198S empêche la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}, ce qui permet d'isoler un intermédiaire sulfénique stable *via* l'oxydation de la cystéine 51 par la MetSO. Les mutations C86S, C206S empêchent la formation potentielle de ponts disulfure non natifs.

Un échantillon marqué ^{15}N de ce triple mutant C86S, C198S, C206S réduit de $MsrA^{E.coli}$ ($MsrA^{E.coli}{}_{TM}$) a été préparé (1mM, pH 7,1 10 mM de KH_2PO_3, 50 mM de DTT) dans le but d'observer les éventuelles perturbations générées par cette mutation. Ces dernières ont été estimées par l'examen du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC (*Figure III-8*). Ce spectre a été aisément attribué par analogie avec le spectre de la protéine sauvage. La plupart des noyaux

ayant des valeurs de déplacement chimique proches. Seule la résonance du résidu Ser_{198} n'a pu être attribuée.

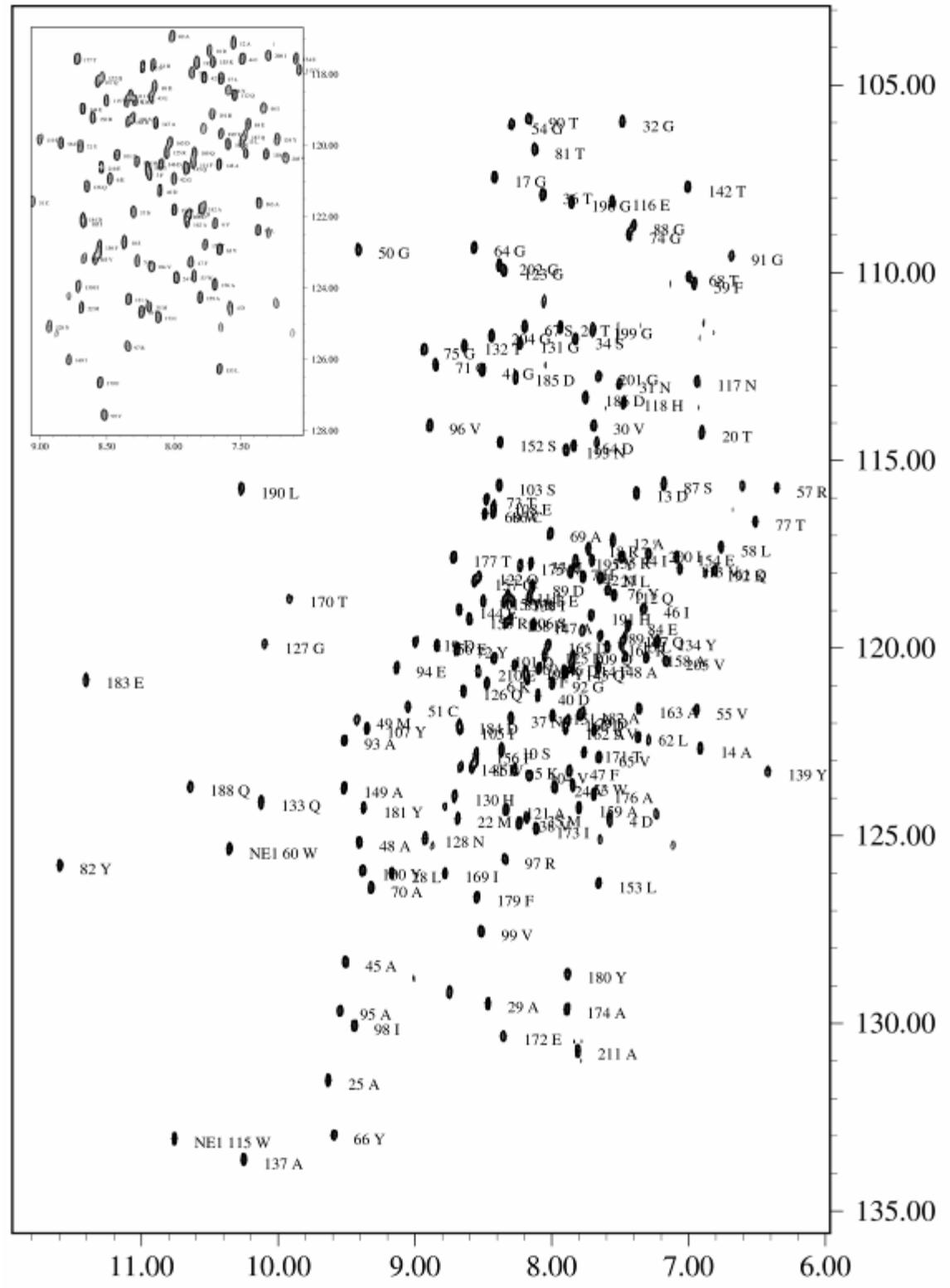


Figure III-8. : ***Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC du triple mutant C86S, C198S, C206S réduit ^{15}N, 1 mM, à 600 MHz, 298 K, pH 7,1.***

Les perturbations générées par les mutations C86S et C206S ont déjà été décrites au chapitre II. En ce qui concerne la mutation C198S, elles ont été estimées en comparant les valeurs de déplacement chimique des groupes amides entre le double mutant (C86S, C206S) et le triple mutant (C86S, C198S, C206S) *via* la valeur consensuelle $\Delta\delta$ (*cf.* équation II-1, chap. 2). La valeur de $\Delta\delta$ pour chaque groupe amide secondaire du squelette peptidique est représentée sur la Figure III-9-A. La mutation C198S perturbe de manière significative les résidus Phe_3 à Lys_5, Val_9, Ser_{10}, Glu_{94}, Glu_{172}, Gly_{199}, Glu_{201} et Gly_{202}. La mise en évidence de ces perturbations significatives sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ (*Figure III-9-B*) montre qu'elles sont toutes spatialement proches de la serine 198. Ainsi la mutation C198S affecte légèrement ($\Delta\delta$ < 0,3 ppm) l'ensemble de son environnement chimique local, et ce, jusqu'à l'extrémité N-terminale. Comme nous l'avons vu au chapitre II, la mutation C206S n'a aucune influence et la mutation C86S ne perturbe que légèrement ($\Delta\delta$ < 0,3 ppm) l'environnement chimique de l'ensemble de l'hélice α_2, et de manière un peu plus importante celui, du résidu Gln_{133} ($\Delta\delta$ = 0,48 ppm). Ainsi, les mutations C86S, C198S et C206S n'engendrent que des perturbations mineures et ne devraient influer que raisonnablement sur la structure tridimensionnelle de la protéine.

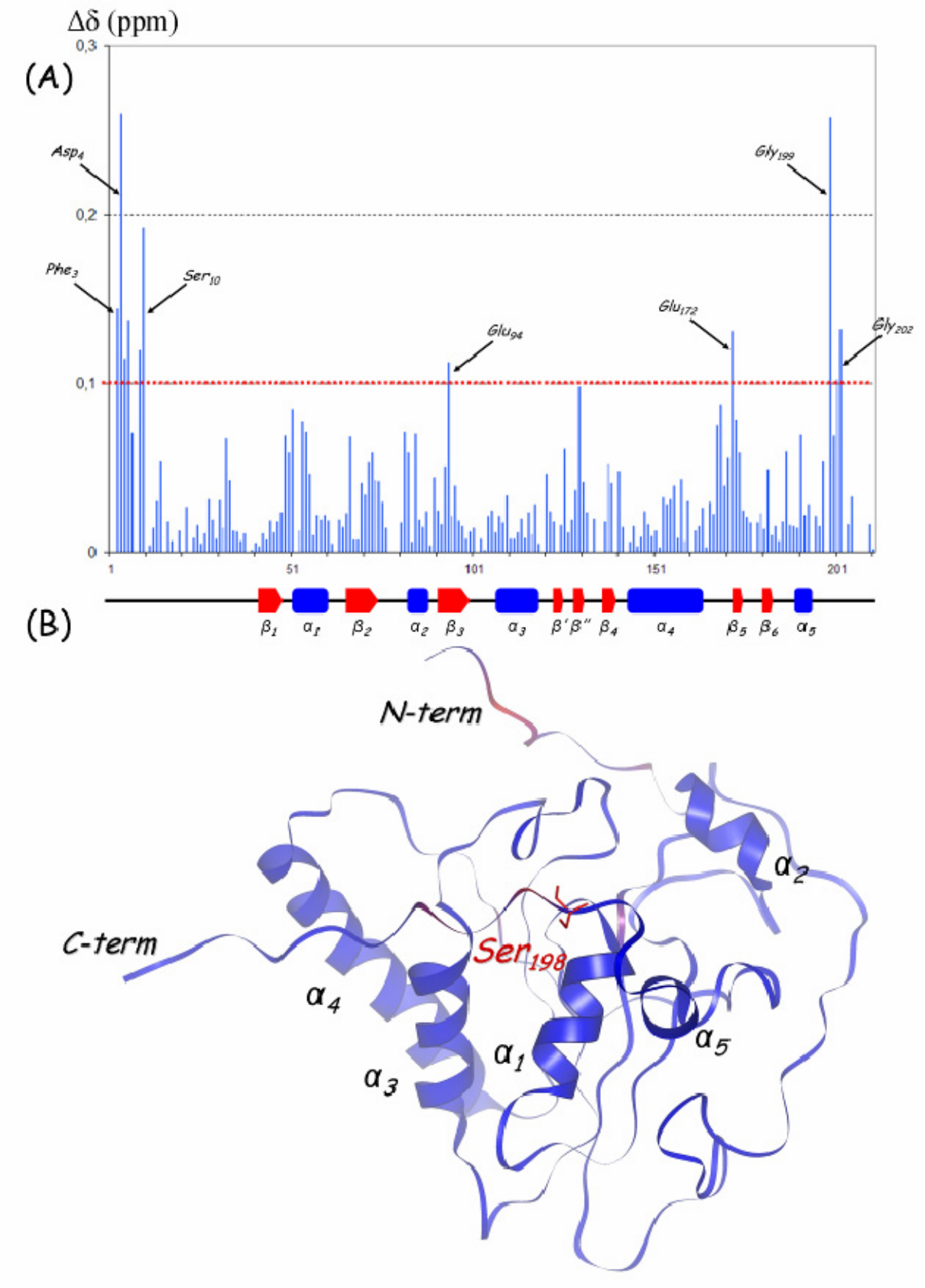


Figure III-9. : ***(A) Perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la mutation C198S le long du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation sur la structure tridimensionnelle en solution de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ des perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la mutation C198S.*** *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus perturbés de manière significative (Δδ > 0,1 ppm).*

III-3.2 L'intermédiaire acide sulfénique

III-3.2.1 Cartographie de déplacement chimique

Le triple mutant ne présentant pas de perturbation majeure, celui-ci a été oxydé, par 3 équivalents de substrat, pour former l'intermédiaire acide sulfénique sur la cystéine 51. La formation effective de l'acide sulfénique par cette méthode a été vérifiée, en parallèle, en réalisant un dosage au TNB^-. Le spectre ^1H-^{15}N HSQC (*Figure III-10*) de l'intermédiaire acide sulfénique ($MsrA_{Sulf}$) a été aisément attribué par analogie avec le spectre de $MsrA^{E.coli}_{TM}$, la plupart des noyaux ayant des valeurs de déplacement chimique proches.

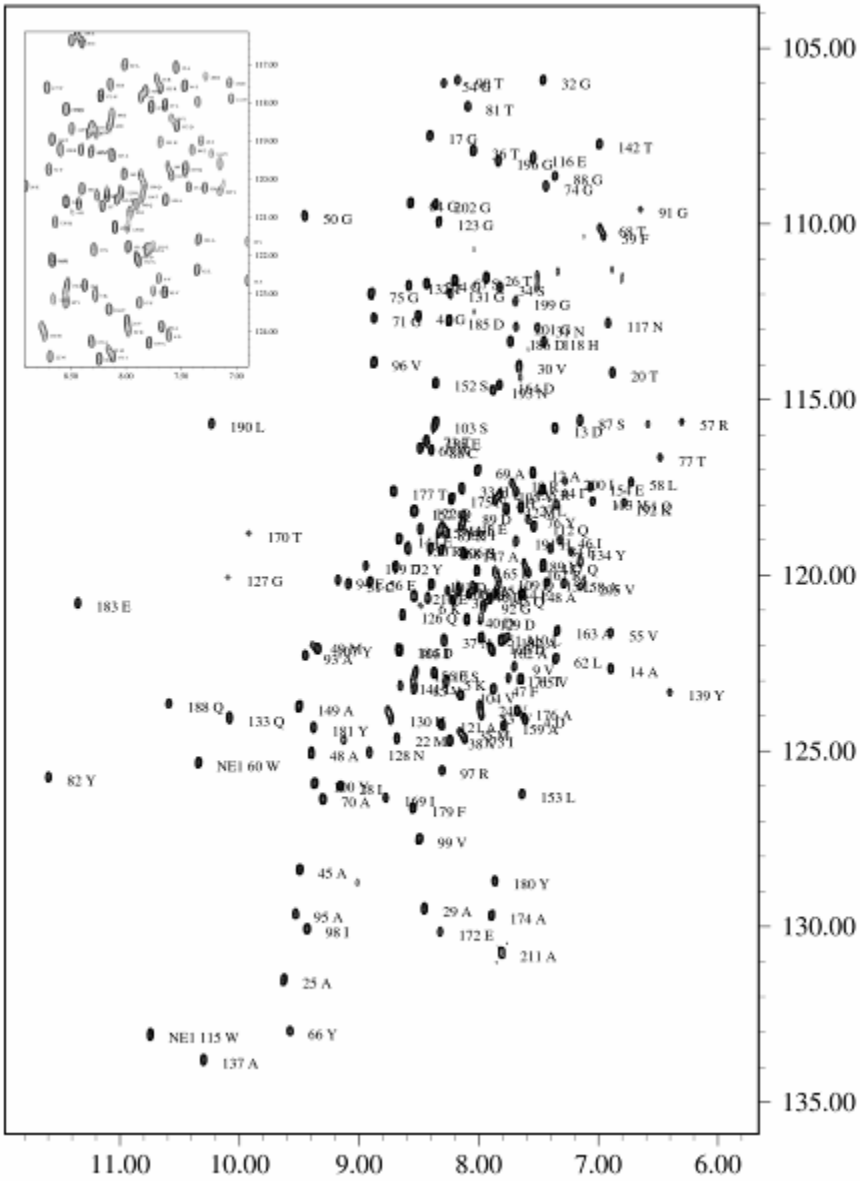


Figure III-10. : Spectre ^1H-^{15}N HSQC de $MsrA_{sulf}$ ^{15}N, 1 mM à 600 MHz, 298 K, pH 7,1.

Les perturbations engendrées par la formation de l'acide sulfénique ont été estimées en comparant les valeurs de déplacement chimique des groupes amides entre le triple mutant C86S, C198S, C206S réduit et l'intermédiaire acide sulfénique *via* la valeur consensuelle $\Delta\delta$ (*cf.* équation II-1, chap. 2). Les valeurs de $\Delta\delta$ pour chaque groupe amide secondaire du squelette peptidique sont représentées sur la Figure III-11-A. La formation de l'acide sulfénique perturbe de manière significative les résidus Asp_4, Leu_{15}, Gly_{50}, Cys_{51}, Trp_{53}, Glu_{56}, Glu_{94}, Asp_{129} et Gly_{199}. La mise en évidence de ces perturbations significatives sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (*Figure III-11-B*) montre qu'elles sont toutes spatialement proches de la cystéine 51, donc du groupement sulfénique. Ainsi, la formation de l'acide sulfénique n'altère que légèrement ($\Delta\delta < 0,3$ ppm) l'ensemble de son environnement chimique local, et ce, jusqu'à l'extrémité C-terminale. Contrairement à ce qui était attendu, ces observations laissent supposer que la formation de l'intermédiaire acide sulfénique n'engendre que des perturbations mineures et ne devrait entraîner qu'une modification limitée de la structure tridimensionnelle de la protéine, ce qui remet en cause l'hypothèse d'un réarrangement conformationel intervenant à ce stade du cycle catalytique.

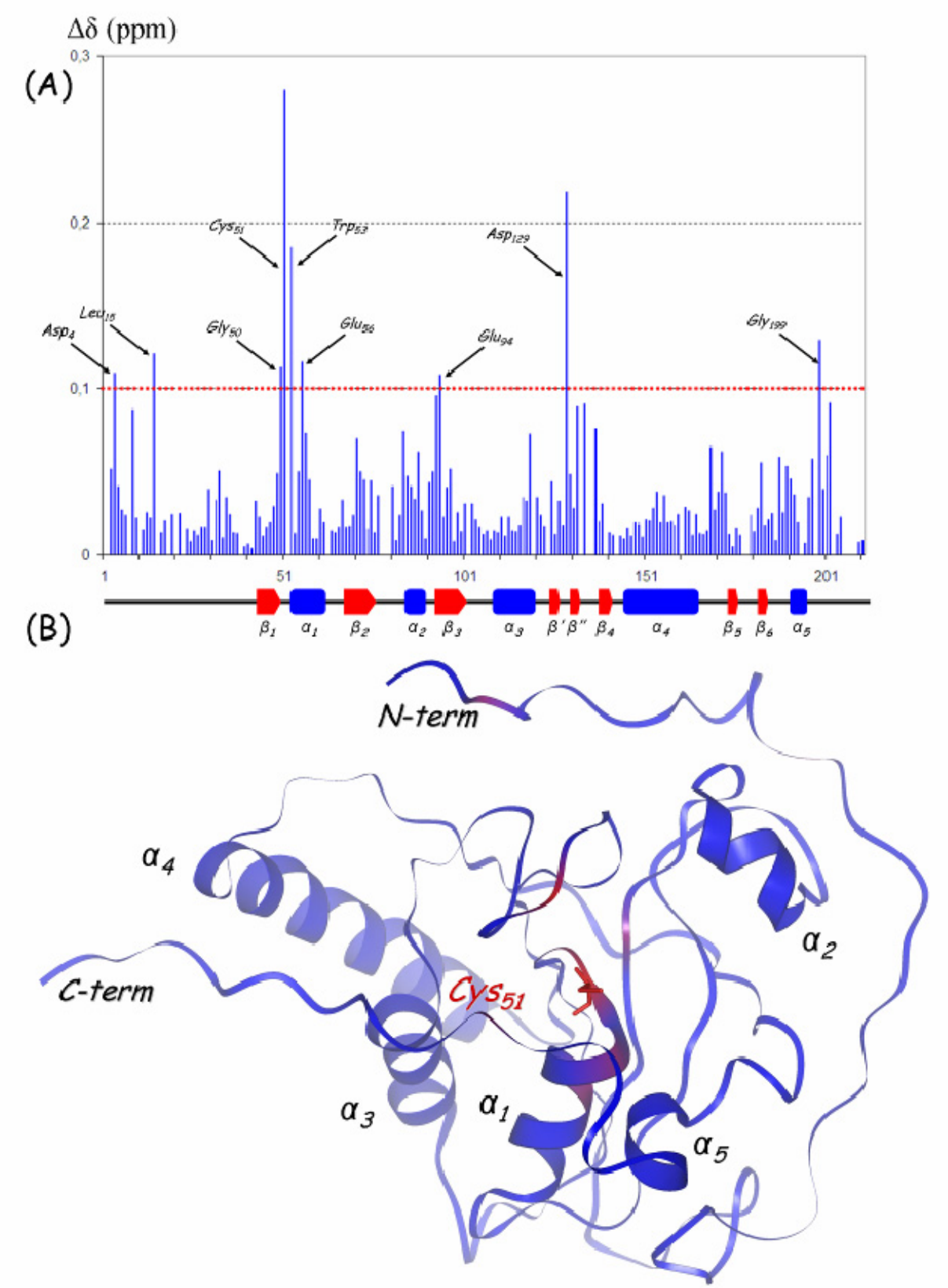


Figure III-11. : (A) Perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la formation de l'acide sulfénique le long du squelette peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation sur la structure tridimensionnelle en solution de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ des perturbations de déplacement chimique des groupes amides secondaires (Δδ) générées par la formation de l'acide sulfénique. *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus perturbés de manière significative (Δδ > 0,1 ppm).*

III-3.2.2 Comportement cinétique de l'intermédiaire acide sulfénique

Il s'avère que $MsrA_{Sulf}$ n'a pas un comportement stable dans le temps. En effet, d'autres spectres enregistrés à la suite du premier (lui-même réalisé quelques minutes après l'ajout de MetSO), permettent d'observer l'apparition d'une seconde espèce (*Figure III-12-A et B*). Après une durée de 24 h, cette dernière semble se stabiliser et le système parait être à l'équilibre.

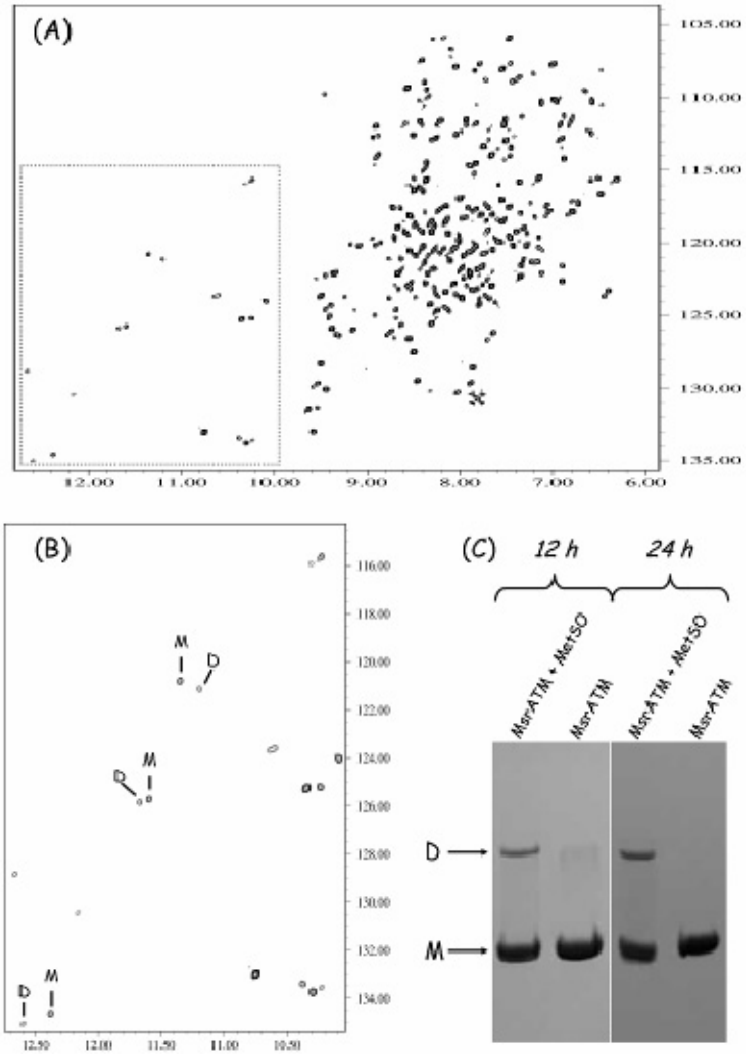
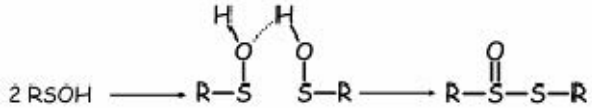


Figure III-12. : (A) Spectre ^{1}H-^{15}N HSQC de $MsrA_{sulf}$ ^{15}N, 24 h après l'ajout de MetSO, 1 mM à 600 MHz, 298 K, pH 7,1. (B) Etalement d'une zone du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC : *les résonances correspondant au monomère sont indiquées par un M ; les résonances correspondant au dimère sont indiquées par un D.* ***(C) Gels d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) :*** *le triple mutant $MsrA^{E.coli}_{TM}$ a été incubé 12 ou 24 h à 25 °C, en absence ou en présence de substrat ; la bande correspondant au dimère est indiquée par un D ; la bande correspondant au monomère est indiquée par un M.*

La dimérisation de l'acide sulfénique est largement décrite dans la littérature. En effet, les acides sulféniques se condensent aisément pour former un pont thiosulfinate par le biais de la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire (Davis *et coll.*, 1986 ; Claiborne *et coll.*, 1993) :



Eq. III-6

Il est donc envisageable que la nouvelle espèce, observée après 24 h soit un dimère de MsrA obtenu *via* la condensation des deux fonctions acides sulféniques de deux résidus Cys_{51}. Cette hypothèse a été vérifiée grâce à une électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) réalisée en parallèle (Figure *III-12-C*). En effet, après 12 ou 24h d'incubation à 25 °C en présence de substrat, le triple mutant C86S, C198S, C206S semble se dimériser. De plus, le dimère semble être une espèce pontée (puisque l'expérience est réalisée en condition dénaturante) et minoritaire (la tache correspondant au monomère reste la plus intense). Enfin, la formation d'une telle espèce a déjà été observée en spectrométrie de masse sur la MsrA de *Neisseria meningitidis* (Mathias Antoine, communication personnelle).

La dimérisation a été vérifiée sur l'échantillon de $MsrA_{Sulf}$ ^{15}N en réalisant un spectre DOSY. La mesure du cœfficient de diffusion translationnelle (*D*) grâce à l'expérience DOSY, conduit à une valeur de $7{,}83.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$ (la faible résolution du spectre DOSY ne permet pas d'observer indépendamment les valeurs des cœfficients de diffusion des deux espèces), alors que la même mesure réalisée sur un échantillon de $MsrA^{E.coli}_{TM}$ réduit donne une valeur de $9{,}31.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$. La diminution du coefficient de diffusion étant cohérente avec la formation d'un dimère, ces observations confirmeraient la présence d'une telle espèce dans l'échantillon de $MsrA_{Sulf}$ ^{15}N. Néanmoins, les deux familles de résonances apparaissant sur le spectre ^{1}H-^{15}N HSQC (l'une correspondant au monomère et l'autre au dimère) étant identifiables (*Figure III-12-B*), il reste possible d'effectuer quelques études complémentaires sur cet échantillon.

III-3.2.3 Etude Dynamique

L'étude préliminaire de l'intermédiaire acide sulfénique semble indiquer que la structure tridimensionnelle de $MsrA^{E.coli}$ n'est que légèrement perturbée (compte tenu des faibles modifications d'environnement chimique des groupes amides observées Figure III-11). Il est toutefois envisageable que les propriétés dynamiques de MsrA soient modifiées.

Nous avons entrepris l'étude dynamique de l'intermédiaire sulfénique. Malheureusement, étant donné la présence de dimère dans l'échantillon de $MsrA_{Sulf}$ ^{15}N,

seules les vitesses de relaxation longitudinales des noyaux ^{15}N (R_1) ont pu être mesurées avec une précision satisfaisante (*Figure III-13-B*), l'étude dynamique de $MsrA_{Sulf}$ en est donc compromise. Toutefois, il est intéressant de comparer les valeurs de R_1 mesurées pour l'intermédiaire acide sulfénique avec celles mesurées pour le triple mutant $MsrA^{E.coli}_{TM}$ réduit (*Figure III-13-B*).

Les perturbations des valeurs de vitesse de relaxation longitudinale des noyaux ^{15}N générées par la formation de l'acide sulfénique sont estimées en comparant les valeurs de R_1 de l'intermédiaire acide sulfénique ($MsrA_{Sulf}$) avec celles du triple mutant $MsrA^{E.coli}_{TM}$ réduit

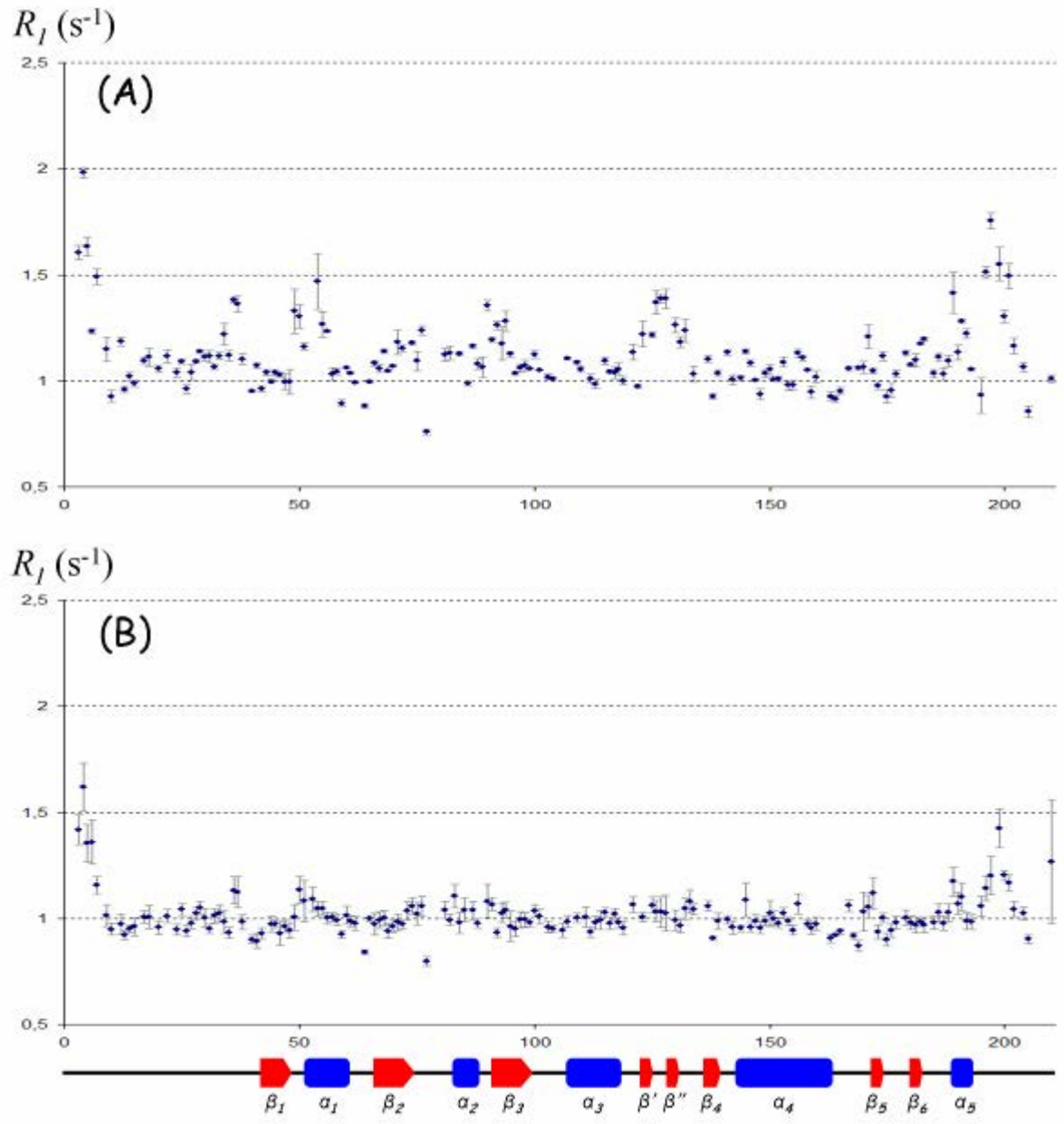


Figure III-13. : Distribution des vitesses de relaxation longitudinale (R_1) le long de la séquence peptidique de (A) $MsrA^{E.coli}_{Sulf}$ et (B) $MsrA^{E.coli}_{TM}$ réduit. *Les intervalles d'erreur sont représentés par des barres grises ; les éléments de structure secondaire sont ceux de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution.*

grâce à la valeur $\Delta R_1 = R_1(\mathrm{MsrA_{Sulf}}) - R_1(\mathrm{MsrA^{E.coli}_{TM}})$.

L'examen des ΔR_1 (*Figure III-14-A*) indique clairement que les valeurs de R_1 des noyaux ^{15}N de $\mathrm{MsrA_{Sulf}}$ sont globalement plus élevées que celles des noyaux ^{15}N de $\mathrm{MsrA^{E.coli}_{TM}}$ (ΔR_1 étant positif pour une large majorité des résidus). Cette observation suggère

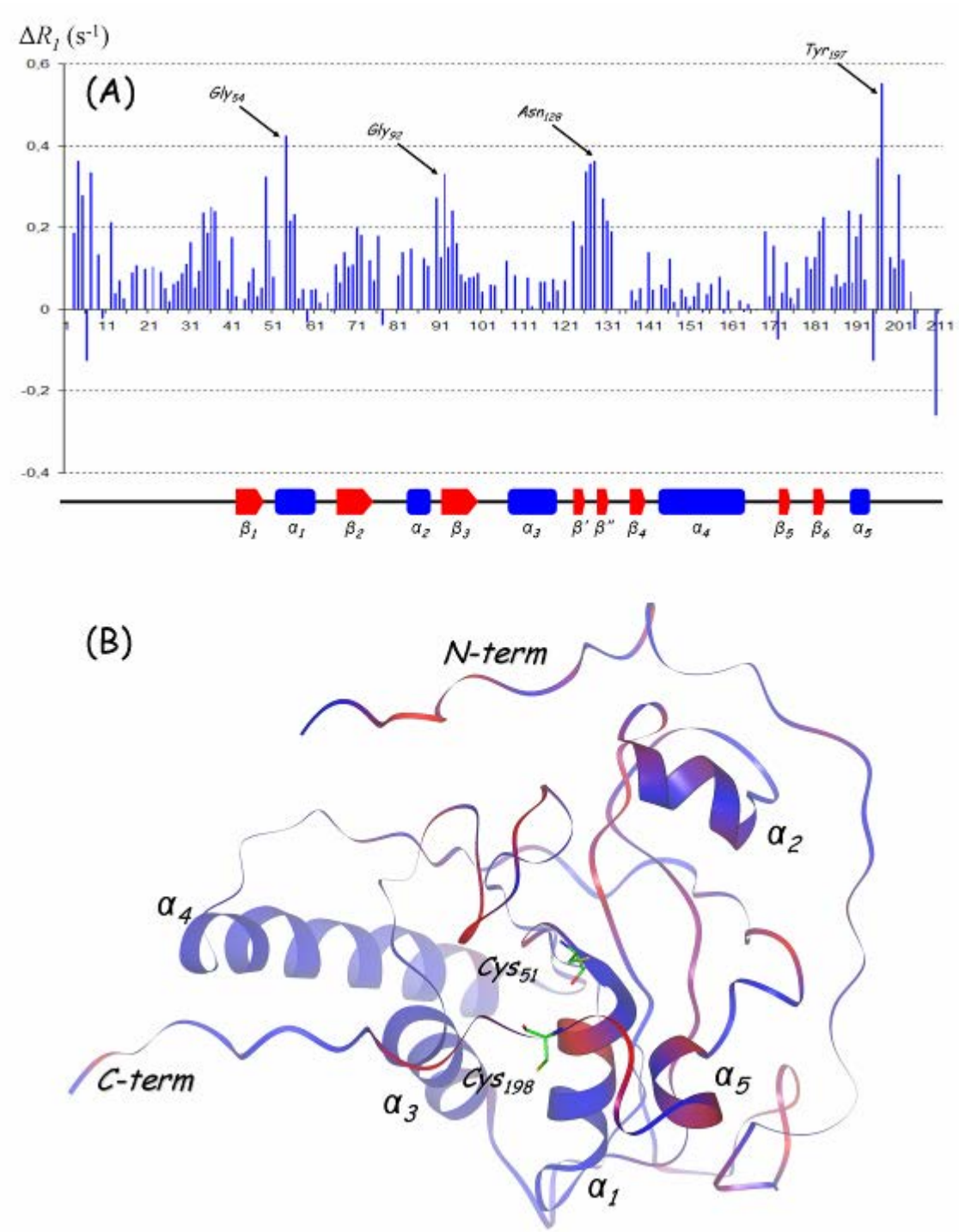


Figure III-14. :(A) Distribution des valeurs de ΔR_1 le long de la séquence peptidique de MsrA$^{E.coli}$. (B) Représentation sur la structure tridimensionnelle de MsrA$^{E.coli}_{Red}$ des valeurs de ΔR_1. *Le squelette peptidique est représenté par un ruban bleu ; les zones en rouge représentent les résidus ayant des valeurs ΔR_1 importantes.*

que la dynamique (dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde) de $MsrA_{Sulf}$ est globalement plus importante que celle de $MsrA^{E.coli}{}_{TM}$, bien que l'amplitude de cette dynamique ne soit pas connue (les valeurs du paramètre nOe hétéronucléaire ^{1}H-^{15}N n'ont pas pu être mesurées avec une précision satisfaisante). La formation de l'acide sulfénique semble ainsi modifier les propriétés dynamiques de $MsrA^{E.coli}$. La mise en évidence des valeurs de ΔR_1 sur la structure tridimensionnelle en solution de $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$ (*Figure III-14-B*), révèle que les modifications les plus importantes sont localisées dans l'environnement spatial proche du résidu Cys_{51}. Elles concernent des segments du site actif tels que Met_{49}-Gly_{54}, Thr_{90}-Glu_{94}, Gln_{126}-Gly_{131}, et tout particulièrement le segment Gly_{196}-Tyr_{197} (la valeur de R_1 pour le noyau ^{15}N du résidu Cys_{198} n'est malheureusement pas connue), qui est celui susceptible de changer de conformation pour permettre la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Ainsi, la formation de l'acide sulfénique sur la cystéine 51 semble modifier les propriétés dynamiques de l'ensemble du site actif, et en particulier celle du segment Gly_{196}-Tyr_{197}. Bien que cette étude soit incomplète (seules les valeurs de R_1 sont disponibles), cette modification des propriétés dynamiques de l'enzyme pourrait permettre le rapprochement des cystéines 51 et 198 et ainsi la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. Il est en effet possible que la présence d'un groupe hydroxyle (particulièrement polaire) dans un environnement hydrophobe (riche en résidus aromatiques), perturbe légèrement la conformation du site actif mais surtout modifie les propriétés dynamiques des résidus du site actif, en particulier celles du segment Gly_{196}-Tyr_{197}. Le résidu Tyr_{197}, qui possède la valeur de ΔR_1 la plus importante, pourrait être le moteur de ce changement de conformation et de propriétés dynamiques, en particulier grâce à sa chaîne latérale aromatique qui pourrait être perturbée par la formation de l'acide sulfénique.

III-3.3 Conclusion

L'étude de l'intermédiaire acide sulfénique est malheureusement incomplète. De plus, la présence du dimère dans l'échantillon incite à considérer avec prudence les résultats partiels que nous avons pu obtenir. Toutefois, il semblerait que la formation de l'intermédiaire acide sulfénique n'entraîne que des changements mineurs de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, mais modifie de manière plus importante ses propriétés dynamiques, en particulier celles du segment Gly_{196}-Tyr_{197}. Cette modification des propriétés dynamiques de l'enzyme pourrait induire un changement de conformation du segment Gly_{196}-Tyr_{197}-Cys_{198} (*via* une amplitude de mouvements plus importante que celle observée chez $MsrA^{E.coli}{}_{Red}$) et ainsi, la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}.

III-4 Matériel et Méthodes

Tous les spectres ont été enregistrés à 298 K avec un spectromètre Bruker DRX 600 MHz équipé d'une sonde TXI à gradients trois axes.

Les spectres ont été traités avec le logiciel XWINNMR (Bruker) et analysés avec XEASY (Bartels *et coll.*, 1995). Le TSP-*d4* a été utilisé comme référence interne pour le ^{1}H, la référence pour l'^{15}N a été obtenue de manière indirecte (Wishart *et coll.*, 1995).

III-4.1 Etude du complexe enzyme/substrat

Le mutant C51A, marqué ^{15}N, ainsi que le substrat doublement protégé ont été respectivement produit et synthétisé au MAEM (*cf.* annexe II et III).

Une série d'échantillons a été réalisée à une concentration constante en $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ et avec une concentration croissante (de 0 à 253 mM) en substrat doublement protégé : Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe (Tableau III-1). Chaque échantillon a été préparé pour un volume final de 600 µL (95 % H_2O, 5 % D_2O) à pH 7,1 (KH_2PO_3 10 mM) en présence d'azide de sodium (N_3Na) et de TSP-*d4* (Eurisotop) comme référence interne pour le proton. Chaque échantillon a été soigneusement dégazé et scellé sous azote. En effet, le mutant C51A comprend encore trois groupes thiols oxydables. Pour prévenir l'oxydation de ces groupes l'utilisation du DTT est inutile compte tenu de la présence d'un grand excès de MetSO, réductible lui-même par le DTT. Des précautions particulières ont dû être prises pour limiter la présence d'oxygène dissous dans les échantillons.

Un spectre ^{1}H-^{15}N HSQC a été enregistré pour chaque échantillon. (Tableau III-3) Après l'acquisition, un aliquot de chaque échantillon a été prélevé pour vérifier la concentration en substrat (*cf.* annexe III).

Tableau III-3 : Paramètres utilisés pour l'expérience ^{1}H-^{15}N HSQC lors du titrage de $MsrA^{E.coli}_{C51A}$ par le substrat doublement protégé

Expérience	TD1/ω_1 (^{1}H)	TD2/ω_2	ns	Echantillon	Durée	d1(s)
^{1}H-^{15}N HSQC	2048/16	128/35(^{15}N)	16	^{15}N	35 m.	1

Les valeurs de K_D et $\Delta\delta$ pour chaque résonance exploitable du spectre ^{1}H-^{15}N HSQC ont été extrapolées selon l'équation III-5 grâce à l'algorithme de minimisation non linéaire de Levenburg-Marquardt. Pour cela, l'intervalle d'erreur choisi pour les déplacements chimiques observés est défini par SW/TD (largeur spectrale en ppm/nombre de points d'acquisition) soit 0,007 ppm dans la dimension protonique et 0,21 ppm dans la dimension du ^{15}N.

III-4.2 Etude de l'intermédiaire acide sulfénique

Le mutant C86S, C198S, C206S, marqué ^{15}N, a été produit au MAEM (*cf.* annexe II). Deux échantillons ont été préparés à une concentration en enzyme de 1 mM pour un volume final de 600 µL (95 % H_2O, 5 % D_2O) à pH 7,1 (KH_2PO_3 10 mM) en présence d'azide (N_3Na) et de TSP-*d4* (Eurisotop) comme référence interne pour le proton, puis ont été soigneusement dégazés et scellés sous azote. 10 mM de DTT ont été ajoutés dans l'un (échantillon de triple mutant réduit), et 3 mM de substrat doublement protégé dans l'autre (échantillon $MsrA_{Sulf}$). La formation de l'acide sulfénique par ce protocole a été vérifiée en réalisant, en parallèle, un dosage au TNB^-. Les spectres ^{1}H-^{15}N HSQC ont été enregistrés avec les paramètres décrits précédemment.

Les essais de dimérisation ont été réalisés comme suit : 1 mM de triple mutant C86S, C198S, C206S a été incubé à 25 °C durant 12 ou 24 h en présence ou en absence de substrat doublement protégé. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel de polyacrylamide, puis soumis à une migration électrophorétique en condition dénaturante (SDS-PAGE). La protéine a été révélée par coloration au bleu de Coomassie R-250.

Les expériences DOSY, effectuées sur $MsrA^{E.coli}_{TM}$ et $MsrA_{Sulf}$, ont été réalisées comme suit : l'intensité du gradient z a été calibrée sur un échantillon de D_2O ; la séquence utilisée est une séquence LED (longitudinal eddy current delay) ; les durées des impulsions δ (2 ms) et Δ (200 ms) ont été optimisées pour obtenir 5 % de signal résiduel avec une intensité de gradient maximale. Chaque expérience a été réalisée avec 2048 points d'acquisition en ^{1}H, les impulsions de gradient étant incrémentées sur 16 points, de 2 à 95 % d'intensité de gradient selon une rampe linéaire. Après transformée de Fourier et correction de ligne de

base, la dimension de diffusion a été traitée avec le module spécifique du logiciel XWINNMR (Bruker).

Les mesures de R_1 des noyaux ^{15}N de $MsrA_{Sulf}$ et de $MsrA^{E.coli}{}_{TM}$ ont été effectuées comme décrit au chapitre II et grâce aux expériences décrites par Farrow et coll. (Farrow *et coll.*, 1994).

Références Bibliographiques

Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., Stadtman, E. R. (2000) Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity, *J Biol Chem* ***275***, 14167-72.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from Neisseria meningitidis, *J Biol Chem* ***277***, 12016-22.

Noguera, V., Walker, O., Rouhier, N., Jacquot, J. P., Krimm, I., Lancelin, J. M. (2005) NMR reveals a novel glutaredoxin-glutaredoxin interaction interface, *J Mol Biol* ***353***, 629-41.

Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., Hart, P. J. (2003) Structure of Mycobacterium tuberculosis methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine, *J Bacteriol* ***185***, 4119-26.

Davis, A. F., Jenkins, A. L., Billmers, L. R. (1986) Chemistry of Sulfenic Acids. Reason for the High Reactivity of Sulfenic Acids. Stabilization by Intramolecular Hydrogen Bonding and Electronegativity Effects, *J. Org. Chem.* ***51***, 1033-1040.

Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., Ross, R. P. (1993) Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation, *Faseb J* ***7***, 1483-90.

Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules, *J Biomol NMR* ***6***, 1-10.

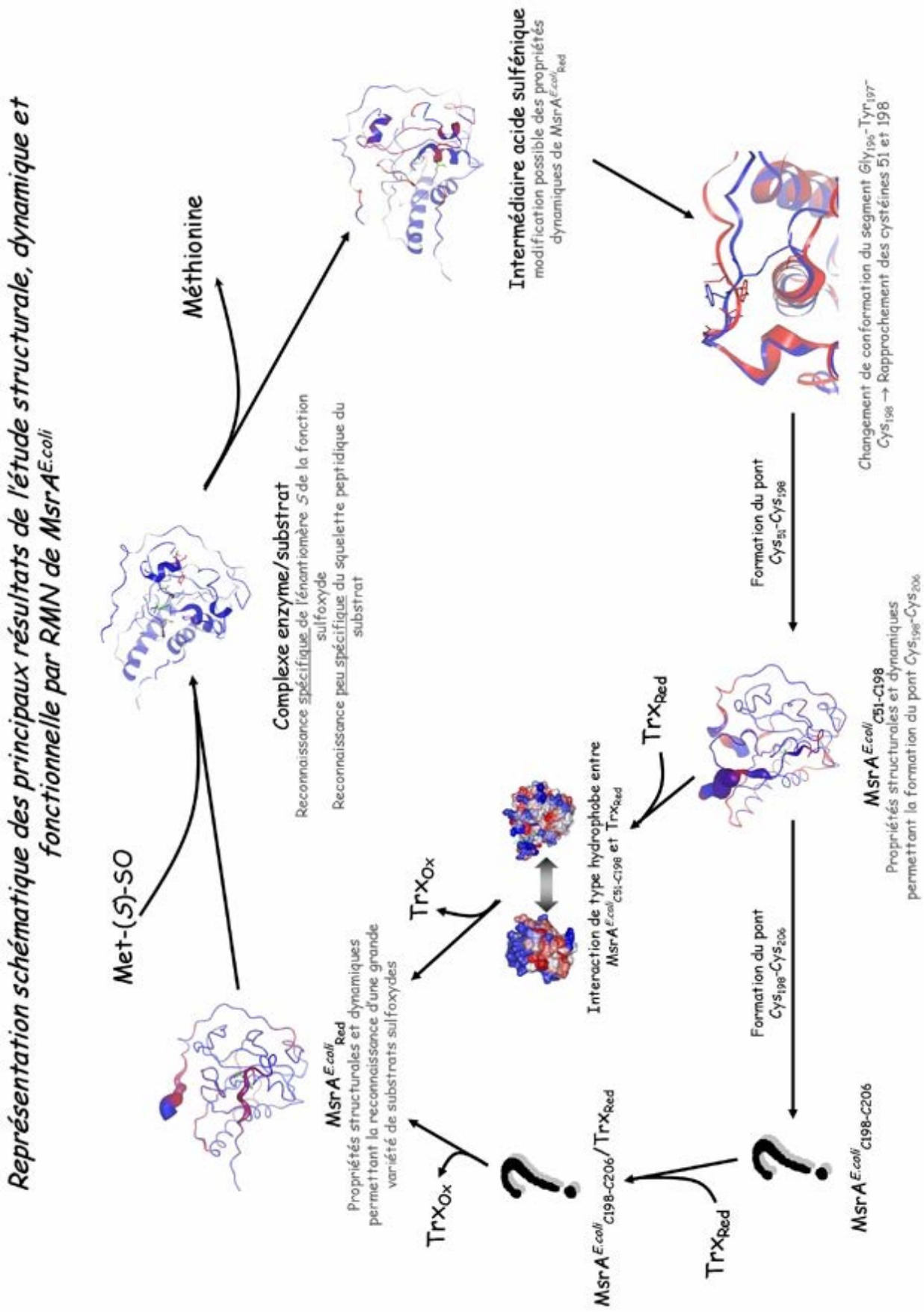
Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., Sykes, B. D. (1995) 1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR, *J Biomol NMR* ***6***, 135-40.

Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by 15N NMR relaxation, *Biochemistry* ***33***, 5984-6003.

Conclusion générale et perspectives

En mettant en œuvre un important panel d'outils parmi tous ceux que la RMN propose (expériences bidimensionnelles et tridimensionnelles hétéronucléaires, expériences d'échange, mesures des vitesses de relaxation, cartographies de déplacement chimique, protocoles de titrage, expérience DOSY), nous avons déterminé les structures tridimensionnelles en solution des deux formes, réduite et oxydée, de la MsrA d'*Escherichia coli* (une enzyme de 23 kDa) grâce à un spectromètre de 600 MHz et en utilisant la technique des contraintes de distance dérivant de la mesure des effets nOe. De plus, nous avons étudié la dynamique du squelette peptidique de ces deux formes, et enfin, réalisé l'étude de deux intermédiaires du cycle catalytique des Msr de classe A. Ce travail a ainsi conduit à une vision plus précise du cycle catalytique de cette classe d'enzyme (*cf.* Figure).

En effet, en réalisant l'étude structurale et dynamique de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ en solution, nous avons montré que la forme réduite de l'enzyme possède les propriétés structurales et dynamiques en accord avec sa fonction de reconnaissance du substrat. Les résidus hydrophobes du site actif, impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde, possèdent une conformation bien définie. A l'inverse, les résidus plus en surface (le feuillet *β'-β''* et le segment Tyr_{195}-Gly_{204} de l'extrémité C-terminale) et impliqués dans le reconnaissance du squelette peptidique du substrat, sont plus flexibles et animés d'une dynamique qui génère l'adaptabilité conformationnelle nécessaire à la reconnaissance d'une grande variété de substrats sulfoxydes. Des observations similaires ont été faîtes lors de l'étude du complexe non covalent enzyme/substrat que nous avons réalisée. En effet, Les résidus impliqués dans la reconnaissance de la fonction sulfoxyde ne sont que peu perturbés par la fixation du substrat, alors que les résidus impliqués dans la reconnaissance du squelette peptidique sont fortement perturbés par la fixation du substrat. Ces observations suggèrent une meilleure spécificité du site actif pour l'énantiomère *S* de la fonction sulfoxyde que pour le squelette peptidique du substrat.


Représentation schématique des principaux résultats de l'étude structurale, dynamique et fonctionnelle par RMN de MsrA E.coli
Met-(S)-SO
Méthionine
Complexe enzyme/substrat
Reconnaissance spécifique de l'énantiomère S de la fonction sulfoxyde
Reconnaissance peu spécifique du squelette peptidique du substrat
Intermédiaire acide sulfénique
modification possible des propriétés dynamiques de MsrA E.coli Red
MsrA E.coli Red
Propriétés structurales et dynamiques permettant la reconnaissance d'une grande variété de substrats sulfoxydes
TrxOx
TrxOx
Interaction de type hydrophobe entre MsrA E.coli C51-C198 et TrxRed
TrxRed
Formation du pont Cys51-Cys198
Changement de conformation du segment Gly196-Tyr197
Cys198 → Rapprochement des cystéines 51 et 198
MsrA E.coli C51-C198
Propriétés structurales et dynamiques permettant la formation du pont Cys198-Cys206
Formation du pont Cys198-Cys206
MsrA E.coli C198-C206/TrxRed
TrxRed
MsrA E.coli C198-C206

L'étude préliminaire de l'intermédiaire acide sulfénique, que nous avons réalisée, semblerait indiquer que la formation de la fonction sulfénique de la cystéine 51 (particulièrement polaire), au sein du site actif hydrophobe de MsrA, provoque un changement des propriétés dynamiques du segment Gly_{196}-Tyr_{197} de l'extrémité C-terminale. Cette perturbation des propriétés dynamiques pourrait permettre le rapprochement des cystéines 51 et 198 et favoriser ainsi la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198}. L'étude structurale et dynamique de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ en solution nous a permis d'observer que la formation du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} provoque la perte de conformation du feuillet *β'-β''*, ce qui a pour conséquence d'exposer, en surface, la zone hydrophobe du site actif. L'extrémité C-terminale est alors animée de très larges mouvements qui vont permettre le rapprochement des cystéines 198 et 206 et ainsi la formation du pont disulfure Cys_{198}-Cys_{206}. De plus, l'exposition du site actif au solvant devrait favoriser l'interaction avec la thiorédoxine lors de l'étape de régénération de l'activité réductase dans le cas des MsrA à une cystéine de recyclage.

Ainsi, l'ensemble des travaux que nous avons réalisés a permis de décrire les bases moléculaires permettant l'activité des Msr de classe A et d'aboutir à une vision globale plus précise du cycle catalytique de cette enzyme. D'un point de vue plus pratique, et à plus long terme, il est possible que ces connaissances permettent de concevoir des inhibiteurs spécifiques des Msr de classe A (tels que des analogues structuraux du substrat sulfoxyde) grâce à des méthodes de « drug design » et qui pourraient être utilisés comme antibiotiques, en particulier contre les bactéries du genre *Neisseria*.

Toutefois, de nombreux aspects de ces travaux mériteraient d'être approfondis. L'étude dynamique des formes réduite et oxydée (Cys_{198}-Cys_{206}) pourrait être plus précise en réalisant la mesure des vitesses de relaxation de noyaux ^{15}N à d'autres champs que 600 MHz (ce qui permettrait de mieux caractériser le mode de réorientation de ces protéines mais aussi d'affiner les valeurs de mobilité interne). Il pourrait aussi être intéressant de mieux caractériser les nombreux phénomènes d'échange observés chez MsrA, grâce à des expériences de mesure des vitesses de relaxation transversale (R_2) à différentes fréquences de train d'impulsion CPMG (ν_{CPMG}). Enfin, des travaux de dynamique moléculaire en présence de solvant pourraient permettre de mieux caractériser les propriétés dynamiques de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ et $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ observées expérimentalement.

L'étude préliminaire de la formation de l'intermédiaire acide sulfénique suggère que le rapprochement des cystéines 51 et 198 interviendrait à ce stade du cycle catalytique de MsrA, grâce à une modification des propriétés dynamiques de l'enzyme. Malheureusement, seules

les valeurs de vitesse de relaxation longitudinale (R_1) ont pu être mesurées avec une précision satisfaisante, cela à cause des problèmes de recouvrement occasionnés par la présence du dimère thiosulfinate. Il serait judicieux de compléter l'étude dynamique de l'intermédiaire sulfénique en déterminant les conditions de concentration et de pH (la condensation de la fonction sulfénique nécessite que celle-ci soit sous forme protonée) permettant de limiter, voire d'inhiber, la dimérisation de l'acide sulfénique.

La résolution de la structure en solution de $MsrA^{E.coli}_{C51\text{-}C198}$ a montré que la réduction du pont disulfure Cys_{51}-Cys_{198} par la thiorédoxine met en jeu une interaction de type hydrophobe entre les deux partenaires. Il serait intéressant de réaliser une étude plus précise de la régénération de l'activité réductase, en particulier des déterminants structuraux impliqués dans l'interaction $MsrA_{Ox}/Trx_{Red}$. Une telle étude nécessiterait la mise en œuvre de différentes techniques de RMN telles que les expériences de NOESY filtrées qui permettent de mesurer des contraintes de distance entre les deux partenaires, ou l'utilisation des constantes de couplage dipolaire résiduel (RDC) et de sondes paramagnétiques qui permettent de définir l'orientation des deux partenaires dans le complexe.

Enfin, dans le cas des MsrA à deux cystéines de recyclage, le pont disulfure qui est réduit par la thiorédoxine est le pont Cys_{198}-Cys_{206}. Il serait tout aussi pertinent de réaliser l'étude structurale de cette forme oxydée ($MsrA^{E.coli}_{C198\text{-}C206}$) et d'étudier ses interactions avec la thiorédoxine.

L'ensemble de ces travaux permettrait d'avoir une vision presque exhaustive du cycle catalytique des Msr de classe A, notamment en terme de déterminants structuraux et moléculaires.

Annexes

Sommaire des Annexes

A1 ANNEXE I : FIGURES COMPLEMENTAIRES 204

A2 ANNEXE II : OBTENTION D'ECHANTILLONS DE MSRA MARQUES 208

A2.1 INTRODUCTION 208

A2.2 MATERIEL BIOLOGIQUE ET MILIEUX DE CULTURE 210

A2.2.1 Souches bactériennes 210

A2.2.2 Vecteur plasmidique 210

A2.2.3 Milieux 211

A2.3 CLONAGE DU GENE SAUVAGE DE MSRA ET TRAVAUX DE MUTAGENESE DIRIGEE 211

A2.3.1 Amplification du gène sauvage de la MsrA d'Escherichia coli 211

A2.3.2 Insertion du gène dans un vecteur et production d'ADN plasmidique 212

A2.3.3 Mutagenèse dirigée 213

A2.4 PRODUCTION ET PURIFICATION DES ECHANTILLONS DE MSRA MARQUEES 214

A2.4.1 Production des protéines recombinantes 214

A2.4.2 Purification des protéines recombinantes 215

A2.4.3 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées 216

A3 ANNEXE III : PREPARATION DU SUBSTRAT SULFOXYDE PROTEGE 218

A4 ANNEXE IV : EXPRESSION DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION (K_D) ET DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES ESPECES ISSUES DU TITRAGE D'UNE ENZYME PAR SON SUBSTRAT 219

A5 ANNEXE V : ARTICLES 221

A5.1 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE B FROM *NEISSERIA MENINGITIDIS* 222

A5.2 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE REDUCED FORM OF THIOREDOXIN H1 FROM POPLAR, A CPPC ACTIVE SITE VARIANT 224

A5.3 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE REDUCED FORM OF METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE A FROM *ESCHERICHIA COLI* 226

A5.4 SOLUTION STRUCTURE OF A NATURAL CPPC ACTIVE SITE VARIANT, THE REDUCED FORM OF THIOREDOXIN H1 FROM POPLAR 228

A5.5 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF THE N-TERMINAL DOMAIN OF PILB FROM *NEISSERIA MENINGITIDES* 236

A5.6 ^{1}H, ^{13}C AND ^{15}N RESONANCE ASSIGNMENT OF AN OXIDIZED FORM (CYS51-CYS198) MSRA FROM *ESCHERICHIA COLI* 240

A1 Annexe I : Figures complémentaires

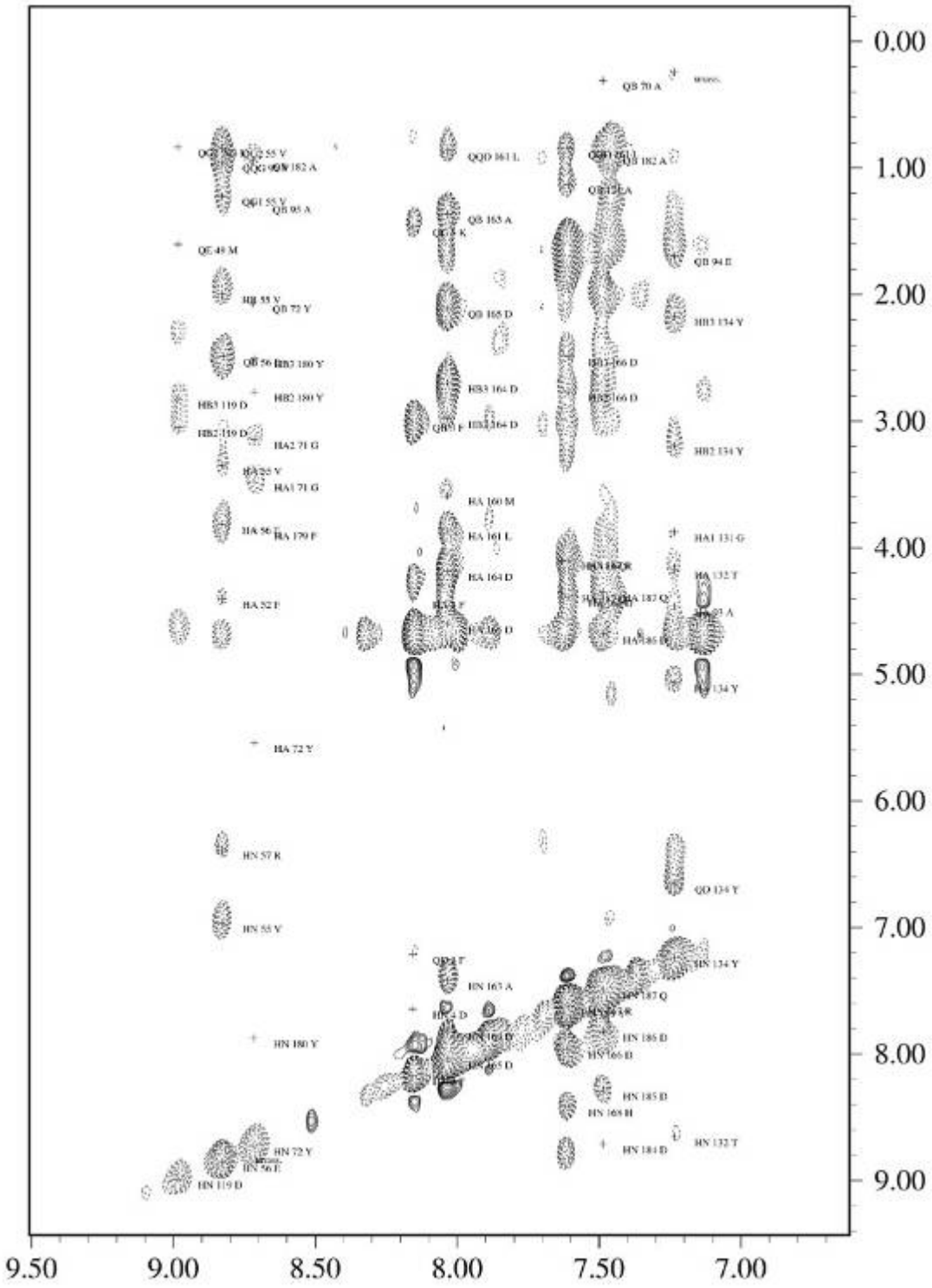


Figure An-1. : Plan ^{1}H-^{1}H issu de l'expérience NOESY HSQC ^{1}H-^{15}N, réalisée sur $MsrA^{E.coli}_{Red}$ à 600 MHz et 298 K.

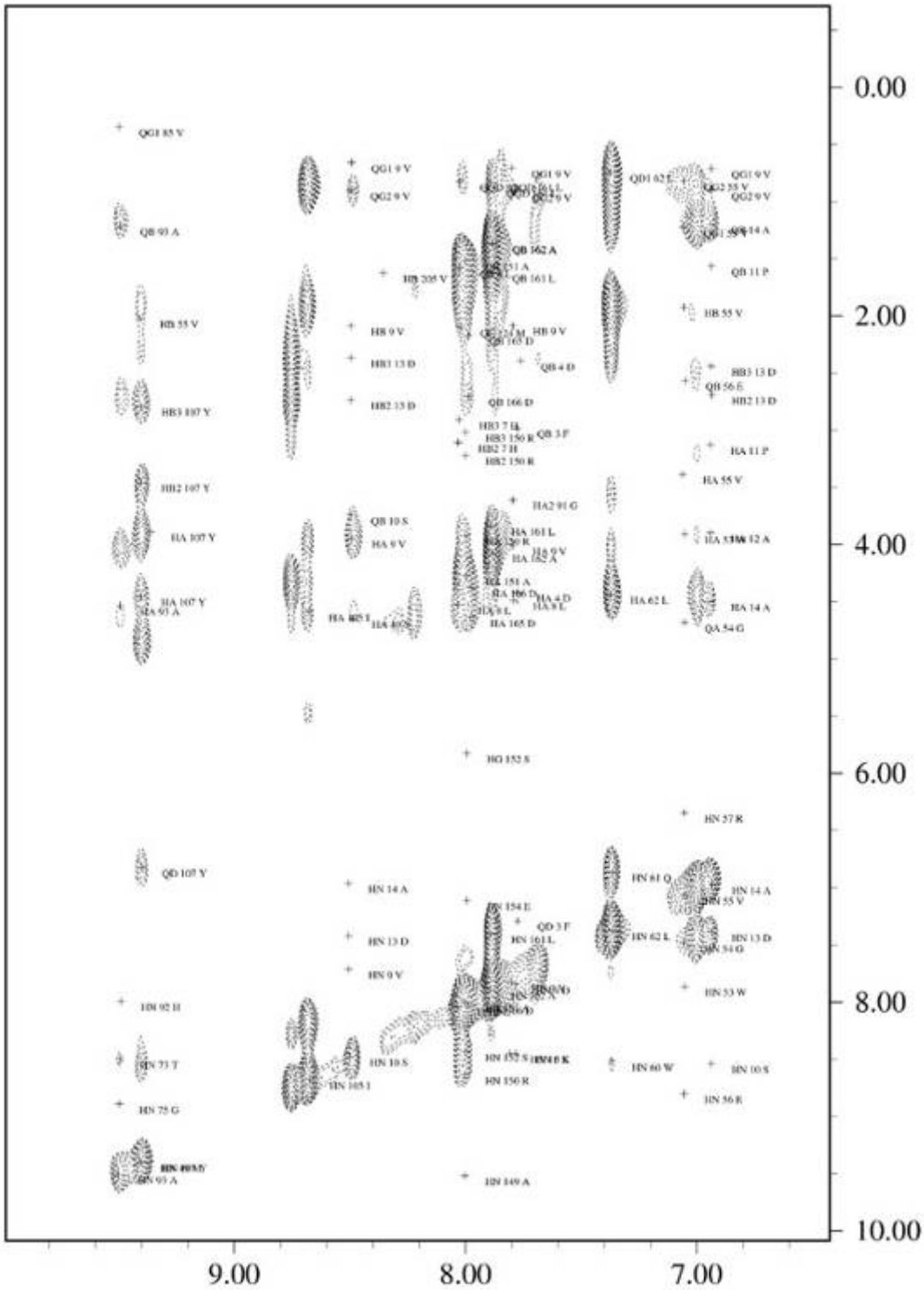


Figure An-2. : Plan ^{1}H-^{1}H issu de l'expérience NOESY HSQC ^{1}H-^{15}N, réalisée sur $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ à 600 MHz et 298 K.

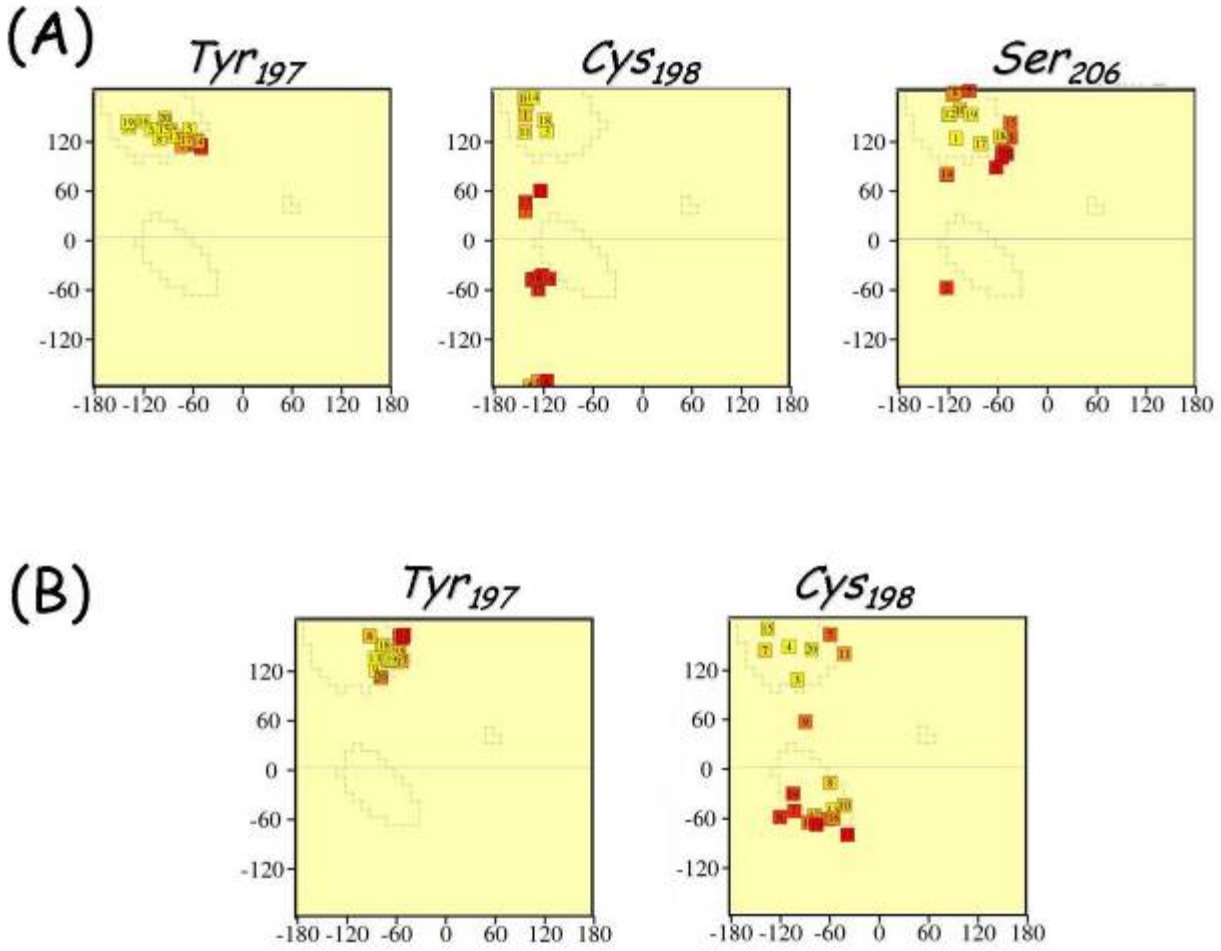


Figure An-3. : ***Digrammes de Ramachandran pour les résidu Tyr_{197}, Cys_{198} et Cys_{206} de $MsrA^{E.coli}_{Red}$ (A) ; et pour les résidus Tyr_{197} et Cys_{198} de $MsrA^{E.coli}_{C51-C198}$ (B)***

A2 Annexe II : Obtention d'échantillons de MsrA marqués

A2.1 Introduction

Les techniques de RMN hétéronucléaires, mises en oeuvre lors de l'étude d'une protéine, mettent à profit les noyaux ^{13}C et ^{15}N qui certes possèdent un nombre de spin demi entier mais présentent une faible abondance naturelle, d'où la nécessité d'un marquage (ou enrichissement) isotopique. Il existe différents types de marquages isotopiques selon que l'on marque l'ensemble des atomes, une fraction ou encore un type d'acide aminé. De plus, on distingue le marquage simple (^{15}N seul), double (^{15}N et ^{13}C) voire triple (^{15}N, ^{13}C, ^{2}H).

Des échantillons marqués de protéine peuvent être obtenus par voie de synthèse peptidique mais ces méthodes sont longues, coûteuses et n'aboutissent qu'à de faibles quantités de produits. Les dernières avancées dans le domaine du génie génétique ont permis d'établir des protocoles relativement simples de production de protéines enrichies en isotopes lourds. Ces méthodes de production de protéines recombinantes mettent en jeu trois étapes :

- **L'obtention du gène codant la protéine et son introduction dans un organisme producteur.** Le gène codant la protéine est obtenu à partir du génome d'un organisme puis amplifié par PCR (polymerisation chain reaction). Le choix de l'organisme producteur dans lequel va être introduit le gène dépend essentiellement de l'origine du gène. Les organismes producteurs bactériens (comme *E. coli*) sont les plus simples à utiliser car ils sont bien connus, croissent aisément en milieu minimum et sont faciles à manipuler. Néanmoins, si le gène n'est pas d'origine bactérienne, et à plus forte raison si la protéine subie des modifications post traductionnelles, l'utilisation de levures (comme *Saccharomyces cerevisiae*) ou de cellules de mammifères (cellules d'ovaires de hamster chinois) peut être plus judicieuse, même si ces cellules sont plus délicates à cultiver.

Lorsque l'organisme producteur est choisi, l'introduction du gène dans l'organisme se fait par le biais d'un vecteur qui peut être plasmidique ou virale.

- **La surexpression du gène par l'organisme producteur.** L'organisme producteur transformé, est cultivé sur un milieu minimum contenant des sources d'azote et/ou de carbone qui peuvent être marquée, ou non, selon l'enrichissement voulu. La source d'azote peut être $^{15}NH_4Cl$ ou $Na^{15}NO_3$; la source de carbone dépend elle, de l'organisme producteur, on utilise généralement le glucose ou le glycérol uniformément marqué ^{13}C. L'expression du gène de la protéine par l'organisme producteur peut être non inductible dans le cas d'un promoteur fort ou induite de manière simple par la chaleur ou l'IPTG. Quelle que soit la méthode choisie la quantité de protéine recombinante produite doit être supérieure de 10 à 30 % à la quantité totale des protéines produites.
- **La purification de la protéine.** Une foi la protéine surexprimée par l'organisme producteur, il est nécessaire de la purifier et de la concentrer. Il existe des méthodes simples de purification mettant un jeu une extrémité « His-tag » (6 histidines en N-terminale) permettant une purification par passage sur colonne d'affinité. Des méthodes plus complexes peuvent être mises en jeu telles qu'un ensemble de techniques séparatives et préparatives comme des précipitations sélectives ou des chromatographies préparatives d'exclusion stérique etc…

Ces méthodes permettent d'obtenir un échantillon pure et fonctionnel en quantité importante, l'objectif étant de disposer d'un échantillon de 500 à 600 µL avec une concentration de l'ordre du millimolaire. Ces méthodes doivent être optimisées pour obtenir les meilleurs rendements, mais une fois mises au point, elles sont relativement faciles à mettre en œuvre. Néanmoins les coûts de production d'un échantillon marqué restent importants, compte tenu du prix des précurseurs enrichis (de l'ordre de 30 € pour le gramme de $^{15}NH_4Cl$, et 100 € pour le gramme de glucose uniformément marqué au ^{13}C).

Le double marquage n'est pas une nécessité. En effet, pour des protéines de 60 à 100 résidus, un simple marquage ^{15}N est suffisant et l'attribution peut être fait uniquement à partir des spectres COSY, TOCSY et NOESY édités ^{15}N. Au-delà de la centaine de résidus, le double marquage ^{13}C, ^{15}N est nécessaire. Toutefois, même pour ces protéines de grande taille, il est toujours judicieux de disposer d'un échantillon simplement marqué ^{15}N pour les études de dynamique et d'interaction.

Lors de cette étude, 4 dérivés de la MsrA d'*Escherichia coli* ont été utilisées (forme sauvage, mutant C51A, double mutant C86S C206S et triple mutant C86S C198S C206S), tous marqués ^{15}N, certains marqués $^{13}C/^{15}N$ voir $^{13}C/^{15}N/^{2}H$.

L'ensemble de ces échantillons, ainsi que le substrat sulfoxyde doublement protégé utilisé pour l'étude du complexe enzyme/substrat, ont été produit au sein de l'équipe d'Enzymologie Moléculaire du Professeur Guy Branlant du laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire (MAEM, UMR CNRS-UHP 7567). Les échantillons protéiques ont été préparés par le docteur Saïd Azza et Mr Mathias Antoine. Les protocoles expérimentaux utilisés sont ici réunis en annexe. La plupart de ces protocoles ont été décrit dans les publications : Antoine *et coll.*, 2003, Boschi-Muller *et coll.*, 2001, Boschi-Muller *et coll.*, 2000, Olry *et coll.*, 2004, Olry *et coll.*, 2002.

A2.2 Matériel biologique et milieux de culture

A2.2.1 Souches bactériennes

A2.2.1.1 E. coli DH5α

Cette souche est utilisée pour l'obtention de l'ADN plasmidique.

Génotype : *supE*44, Δ*lacU*169 (φ80 *lacZ*Δ*M*15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1.

A2.2.1.2 E. coli BL21 (DE3)

Cette souche est utilisée pour la production de MsrA marquée ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$ ou $^{13}C/^{15}N/^{2}H$. Elle contient l'ORF (Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert) codant l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lac*, ce qui permet d'induire la transcription de l'ARNm de l'ARN polymérase de T7 grâce à l'IPTG (IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside, analogue non métabolisable du lactose).

Génotype :F-, *ompT*, *hsdS*$_B$ (r_B – m_B -) *gal*, *dcm*.

A2.2.2 Vecteur plasmidique

pETMsrA *E. coli* est un phagemide recombinant pET-20b portant la séquence codante de la MsrA d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur *T7*, ce qui permet d'induire la transcription de l'ARNm de MsrA grâce à l'IPTG. De plus, pETMsrA porte un gène de résistance à la kanamycine (antibiotique).

A2.2.3 Milieux

A2.2.3.1 Milieu riche SOC

Ce milieu est utilisé pour la régénération des cellules après transformation par la technique du choc thermique.

Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM), $MgCl_2$ (10 mM), $MgSO_4$ (10 mM), glucose (20 mM). Ce milieu est autoclavé 20 min à 120 °C.

A2.2.3.2 Milieu minimum M9

Ce milieu est utilisé pour la production de MsrA marquée ^{15}N, $^{15}N/^{13}C$ ou $^{15}N/^{13}C/^{2}H$.

Composition : NaCl (0,5 g/L), KH_2PO_4 (22 mM), Na_2HPO_4, $7H_2O$ (50 mM), NH_4Cl (1 g/L), glucose (4 g/L), riboflavine (1 mg/L), nicotinamide (1 mg/L), pyridoxine monohydrochloride (1 mg/L), thiamine (1 mg/L), $MgSO_4$, $7H_2O$ (2 mM), $FeSO_4$, $7H_2O$ (25 mg/L), $^{15}NH_4Cl$ (1 g/L) ou $^{15}NH_4Cl$ (1 g/L)+ ^{13}Cglucose (4 g/L) selon le marquage désiré (simple ou double), dans le cas d'un échantillon triplement marqué (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N), H_2O est remplacé par D_2O.

A2.3 Clonage du gène sauvage de MsrA et travaux de mutagenèse dirigée

La production de protéine recombinante (sauvage ou mutée) par un microorganisme nécessite dans un premier temps d'obtenir une grande quantité du gène de la protéine inséré dans un vecteur plasmidique. Ce travail se déroule en plusieurs étapes, il est d'abord nécessaire d'isoler et d'amplifier le gène d'intérêt à partir d'un génome entier, puis d'insérer ce gène dans un vecteur plasmidique et enfin d'amplifier ce vecteur via sa réplication par un microorganisme.

A2.3.1 Amplification du gène sauvage de la MsrA d'<u>Escherichia coli</u>

Le clonage de l'ORF codant la MsrA d'*Escherichia coli* a été réalisé à partir du génome de la souche *E. coli* K12 en utilisant la technique de PCR. Deux oligodésoxyribonucléotides, dont les séquences sont complémentaires aux bordures de l'ORF de MsrA et qui contiennent également les sites de restriction *NdeI* et *SacI*, ont été utilisés pour amplifier l'ORF grâce à l'action de l'ADN polymérase *Pfu*. Après l'amplification du gène, sa présence et sa taille sont

vérifiées par dépôt sur gel d'agarose 0,8%. L'extraction des fragments d'ADN amplifiés du gel d'agarose est réalisée grâce à un kit NucleoSpin (Sigma). Cette extraction repose sur l'utilisation de colonnes échangeuses d'anions, l'ADN étant chargé négativement. On vérifie que le fragment souhaité a bien été extrait du gel d'agarose en déposant 2 µL sur gel d'agarose, aux côtés d'un marqueur de taille adéquat.

A2.3.2 Insertion du gène dans un vecteur et production d'ADN plasmidique

Une fois l'ORF de MsrA amplifié, il est nécessaire de l'introduire dans un vecteur puis d'amplifier ce vecteur grâce à la transformation de bactéries compétentes.

A2.3.2.1 Préparation du vecteur

Le vecteur plasmidique (pET-20b) et l'insert (ORF de MsrA amplifié) sont digérés pendant 1h30 à 37 °C par les enzymes de restriction *NdeI* et *SacI* à raison de 3 unités par µg de matériel nucléique. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. La formation des liaisons phosphodiesters entre les extrémités de l'insert et du vecteur est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4. La ligation se fait en présence de 3 excès d'insert par rapport au vecteur linéarisé. Les mélanges de ligation sont placés dans un bain à 16 °C pendant 4 h.

A2.3.2.2 Préparation et transformation des bactéries compétentes

Une fois le vecteur préparé, il faut l'insérer dans un microorganisme (transformation) avant de pouvoir l'amplifier. Cette méthode est utilisée pour transformer les cellules d'*E. coli* DH5α utilisée pour la production d'ADN plasmidique mais aussi pour transformer la souche BL21 utilisée pour la production des protéines recombinantes.

Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 35 et 37 °C, sous forte agitation. Cette culture est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 30 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10ème du volume initial de solution TB, en présence de diméthyl sulfoxyde (7% final) et incubée 2 h dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C.

La transformation est réalisée en mélangeant 100 ng de plasmide et 50 µl de bactéries compétentes. Après incubation sur glace durant 30 min, le mélange est soumis à un choc thermique de 40 secondes à 42 °C puis les cellules sont régénérées 1 h à 37 °C en milieu SOC avant d'être étalées sur boîte LB avec l'antibiotique de résistance approprié au plasmide utilisé et incubées une nuit à 37 °C.

A2.3.2.3 Préparation de l'ADN plasmidique

Une fois le vecteur comprenant le gène de MsrA inséré dans un microorganisme, et sa présence vérifiée. Le vecteur est purifié grâce à un protocole appelé maxipréparation.

Cette technique est utilisée pour la préparation en grande quantité d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne de 100 mL. Après lyse alcaline des cellules et centrifugation, l'ADN plasmidique est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (Macheray Nagel) qui repose sur l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique élué est concentré par précipitation à l'isopropanol, lavé à l'éthanol à 70% et enfin séché et repris dans du tampon Tris 10 mM, EDTA 2mM, pH 8,0. La concentration de l'ADN ainsi obtenu est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm en admettant qu'une unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée à partir du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm}, qui doit être compris entre 1,8 et 2.

A2.3.2.4 Séquençage de l'ADN double brin

Le séquençage par méthode enzymatique est utilisé afin de vérifier l'introduction correcte de l'insert ainsi que l'absence de mutations parasites sur le plasmide, en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7. Une première étape consiste à préparer l'ADN plasmidique sous forme dénaturée à l'aide de NaOH 2M afin de permettre, dans une deuxième étape, l'hybridation de l'oligodesoxyribonucléotide de séquençage. La troisième étape de séquençage est réalisée avec la T7 ADN polymérase dont l'activité permet l'élongation du brin d'ADN. L'élongation est stoppée après incorporation d'un didésoxyribonucléotide sur le brin d'ADN en élongation. La séquence d'ADN est marquée au ^{33}P grâce à de l'α^{33}PdATP dans le mélange réactionnel d'élongation. La séquence d'ADN est analysée après migration sur un gel de polyacrylamide et révélation par autoradiographie.

A2.3.3 Mutagenèse dirigée

Les mutants de MsrA ont été réalisés grâce à des protocoles de mutagenèse dirigée à partir du gène sauvage de MsrA introduit dans un vecteur (pET-MsrA).

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du Kit «Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit» commercialisé par Stratagène. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* (6 fois plus fidèle, dans la réplication de l'ADN que l'ADN polymérase thermostable *Taq*) pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse. Elle nécessite aussi un plasmide double brin superenroulé et deux oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, vont servir d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par la *Pfu*, conduisant à un plasmide muté aux extrémités non religuées. Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn I* (séquence cible 5'-Gm6ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, afin de digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. En effet, l'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *Dpn I*. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et coupé, est utilisée pour transformer des bactéries DH5α compétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et l'amplifier. Après transformation de 50 µL de cellules DH5α compétentes par 1 à 5 µL de mélange de PCR, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide. Le plasmide muté peut alors être amplifié, purifié et séquencé comme décrit précédemment.

A2.4 Production et purification des échantillons de MsrA marquées

Une fois le gène de la protéine recombinante (sauvage ou mutée) inséré dans un vecteur, et ce vecteur obtenu en grande quantité, il est possible de commencer les travaux de production de la protéine recombinante.

A2.4.1 Production des protéines recombinantes

Les MsrA marquées (^{15}N ou $^{15}N/^{13}C$) d'*E. coli*, sauvage et mutées ont été produites dans une souche d'*E. coli* BL21 transformée avec le vecteur plasmidique pET-MsrA. Les cellules sont ensemencées au 1/50ème à partir d'une préculture d'une nuit en milieu minimum M9 et incubées à 37°C. L'antibiotique de résistance est la kanamicyne (200 mg/ml). A une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,8, l'induction de la synthèse de la T7 ARN polymérase est initiée par ajout de 1 mM d'IPTG et conduit à l'induction de la synthèse en grande quantité d'ARN messager correspondant à la protéine recombinante. La culture est arrêtée 3 h après l'induction. Les

cellules sont récoltées par centrifugation à 3000 g puis lavées dans du tampon A (Saccharose 25 %, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) et enfin centrifugées. Les culots cellulaires sont stockés à -20 °C.

A2.4.2 Purification des protéines recombinantes

La purification de la protéine s'effectue en présence de DTT 50 mM.

A2.4.2.1 Lise des cellules

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

A2.4.2.2 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Le surnageant de sonication est amené à 50 % de saturation en $(NH_4)_2SO_4$ et précipité 2 h sous une légère agitation à 4 °C. A cette concentration en $(NH_4)_2SO_4$, les enzymes sont précipitées, elles sont récupérées dans le culot après centrifugation pendant 30 min à 12000 g.

A2.4.2.3 Filtration sur gel

Le culot de précipitation fractionnée 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 $DO_{280\ nm}$. L'analyse des fractions est effectuée par lecture de la $DO_{280/260nm}$ et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE, 12,5 %). Les fractions contenant la protéine sont ensuite rassemblées. Cette étape permet d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes présentes dans le culot de précipitation et une grande quantité des acides nucléiques.

A2.4.2.4 Chromatographie échangeuse d'anions

La solution protéique issue de la filtration sur gel est filtrée puis injectée sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sépharose (agarose 6 % greffé de groupements triméthylammonium, Amersham Biosciences®) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences®). L'élution se fait par un

gradient linéaire de KCl de 0 à 200 mM sous un débit de 5 ml/min. MsrA est éluée à environ 50 mM de KCl. Cette étape permet d'éliminer les contaminants protéiques et une grande partie des acides nucléiques. Cette dernière étape permet de purifier MsrA à homogénéité

A2.4.2.5 Concentration et conservation des protéines

Les solutions enzymatiques pures sont finalement concentrées par ultra-filtration sous pression à l'aide d'une membrane Amicon YM10 jusqu'à une concentration de l'ordre de 40- 45 DO/mL. Les protéines sont ensuite précipitées en présence de $(NH_4)_2SO_4$ (70% de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservées à –20°C.

A2.4.3 Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées

A2.4.3.1 Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250 (*Figure An-4*).

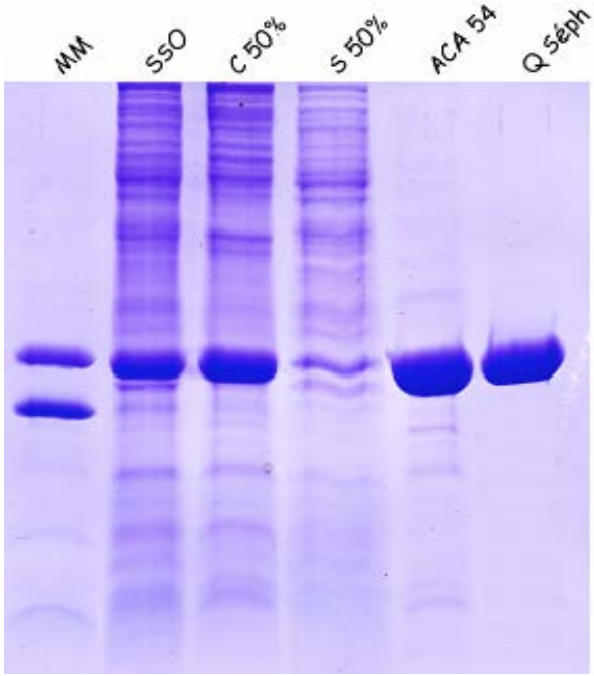


Figure An-4. : Suivi de la purification de MsrA par électrophorèse en conditions dénaturantes. ***MM*** *: Marqueurs de masse moléculaire,* ***SSO*** *: surnageant de sonication,* ***C 50 %*** *: culot de la précipitation à 50 % de sulfate d'ammonium* ***S 50 %*** *: surnageant de la précipitation à 50 % de sulfate d'ammonium,* ***ACA 54*** *: pureté après filtration sur gel,* ***Q séph*** *: pureté après chromatographie échangeuse d'anions.*

A2.4.3.2 Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon débarrassé de toute trace de sels, 500 µg de protéines sont dessalés sur une colonne de filtration sur gel (HiPrep 26/10 Desalting, Amersham Biosciences®) couplée au système FPLC. L'élution est réalisée par un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM (pH 7,6) fraîchement préparé. La fraction la plus concentrée est récupérée puis lyophilisée. Les masses moléculaires des protéines recombinantes ont été déterminées par Guillaume Chevreux du laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique UMR 7509 CNRS-ULP, Strasbourg. L'appareil utilisé est un spectromètre VG-Bio Q triple quadripole (Micromass®)

A3 Annexe III : Préparation du substrat sulfoxyde protégé

L'étude du complexe enzyme/substrat (Chap. III) a nécessité l'utilisation de MetSO protégé par des groupements protecteurs à ses extrémités (groupement acétate à l'extrémité N-terminale et méthylamine à l'extrémité C-terminale). Ce substrat doublement protégé (Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe) a été réalisé selon le protocole d'écrit dans (Olry *et coll.*, 2004) par Mr Alexandre Kriznik

Ce protocole consiste à faire réagir de la méthionine doublement protégée (Ac-L-Met-OMe) commerciale (Bachem) par 25 équivalents de méthylamine dans le méthanol. Cette réaction conduit à Ac-L-Met-NHMe. L'oxydation de Ac-L-Met-NHMe est réalisée par 1,05 équivalent de H_2O_2 dans le méthanol pour donner le substrat doublement protégé : Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe.

Le substrat ainsi synthétisé a été purifié par chromatographie en phase inverse sur une colonne préparative C18 Delta-Pak (19/300) installée sur un appareil HPLC équilibré avec H_2O. L'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 55 %. Le substrat doublement protégé, Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe, est élué à 3 % d'acétonitrile. Le substrat ainsi purifié est ensuite concentré et sa pureté vérifiée par RMN ^{1}H et ^{13}C. La concentration du substrat doublement protégé a été déterminée par chromatographie en phase inverse sur une colonne analytique C18 Atlantis sur un système AKTA explorer (Amersham Bioscience) en intégrant le pic à 215 nm (1 nmol de Ac-L-Met-(*R*,*S*)-SO-NHMe correspond à une aire de 1,62).

A4 Annexe IV : Expression de la constante de dissociation (K_D) et des déplacements chimiques des espèces issues du titrage d'une enzyme par son substrat

Dans le cas d'un système binaire 1:1 la formation du complexe enzyme/substrat est décrite par l'équation :

$$E + S \underset{}{\overset{K_D}{\rightleftharpoons}} ES \qquad \textit{Eq. A-1}$$

où E est l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme/substrat et K_D la constante de dissociation du complexe, décrivant la concentration des différentes espèces à l'équilibre.

On définit par [E] la concentration en enzyme à l'équilibre, $[E]_0$ la concentration totale en enzyme (libre et complexée), [S] la concentration en substrat à l'équilibre, $[S]_0$ la concentration totale en substrat (libre et complexé), [ES] la concentration en complexe enzyme/substrat à l'équilibre, δ_{obs} le déplacement chimique observé pour un noyau, δ_E le déplacement chimique de ce noyau dans l'enzyme libre, δ_{ES} le déplacement chimique de ce noyau dans l'enzyme complexée. La constante de dissociation du complexe enzyme/substrat est alors définie comme :

$$K_D = \frac{[E].[S]}{[ES]} \qquad \textit{Eq. A-2}$$

Avec :

$$[E] = [E]_0 - [ES] \text{ et } [S] = [S]_0 - [ES] \qquad \textit{Eq. A-3}$$

Si le système est en excès de substrat par rapport à l'enzyme, la proportion de substrat dans le complexe est négligeable par rapport à la quantité de substrat libre ([S] est alors égale à $[S]_0$), l'expression de la constante de dissociation devient alors :

$$K_D = \frac{[E]_0.[S]_0 - [ES][S]_0}{[ES]} \qquad \textit{Eq. A-4}$$

Ce qui permet d'exprimer la concentration en complexe en fonction du K_D, de la concentration totale en enzyme $[E]_0$ et de la concentration totale en substrat $[S]_0$:

$$[ES] = \frac{[E]_0.[S]_0}{K_D + [S]_0} \qquad \textit{Eq. A-5}$$

Le déplacement chimique observé pour un noyau est la moyenne pondérée des déplacements chimiques de ce noyau dans l'enzyme libre et dans l'enzyme complexée :

$$\delta_{obs} = X_E \delta_E + X_{ES} \delta_{ES} \qquad \textit{Eq. A-6}$$

Avec X_E et X_{ES} les populations relatives des espèces E et ES, définies comme suit :

$$X_E = \frac{[E]}{[E]_0} \text{ et } X_{ES} = \frac{[ES]}{[E]_0} \qquad \textit{Eq. A-7}$$

En exprimant X_E et X_{ES} uniquement en fonction des quantités constantes, K_D et $[S]_0$, on obtient d'abord :

$$X_E = 1 - X_{ES} \text{ et } X_{ES} = \frac{[S]_0}{K_D + [S]_0} \qquad \textit{Eq. A-8}$$

Puis :

$$X_E = 1 - \frac{[S]_0}{K_D + [S]_0} \text{ et } X_{ES} = \frac{[S]_0}{K_D + [S]_0} \qquad \textit{Eq. A-9}$$

Le déplacement chimique observé devient alors :

$$\delta_{obs} = (1 - \frac{[S]_0}{K_D + [S]_0}).\delta_E + (\frac{[S]_0}{K_D + [S]_0}).\delta_{ES} \qquad \textit{Eq. A-10}$$

δ_{ES} peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\delta_{ES} = \delta_E + \Delta\delta \qquad \textit{Eq. A-11}$$

Le déplacement chimique observée ne dépend alors plus que de δ_E, $\Delta\delta$, $[S]_0$ et K_D.

$$\delta_{obs} = \delta_E + \Delta\delta.(\frac{[S]_0}{K_D + [S]_0}) \qquad \textit{Eq. A-12}$$

A5 Annexe V : Articles

Article I : Thureau A., Olry A., Coudevylle N., Azza S., Boschi-Muller S., Branlant G. & Cung MT. (2004) ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*, *J Biomol NMR*, **30**, 223-224

Article II : Coudevylle N., Thureau A., Hemmerlin C., Gelhaye E., Jacquot JP. & Cung MT. (2004) ^{1}H, ^{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**, 229-230

Article III : Coudevylle N., Thureau A., Azza S., Boschi-Muller S., Branlant G. and Cung MT. (2004) ^{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**, 364-365

Article IV : Coudevylle N., Thureau A., Hemmerlin A., Gelhaye E., Jacquot JP. and Cung MT. (2005) Solution Structure of a Natural CPPC Active Site Variant, the Reduced Form of Thioredoxin h1 from Poplar, *Biochemistry*, **44**, 2001-2008

Article V : Beaufils C., Neiers F., Coudevylle N., Boschi-Muller S., Averlant-Petit MC., Branlant G. and Cung MT. (2005) ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*, soumis à publication

Article VI : Coudevylle N., Antoine M., Boschi-Muller S., Branlant G. and Cung MT. (2005) ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of an oxidized form (Cys51-Cys198) MsrA from *Escherichia coli*, soumis à publication

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

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

Aurélien Thureau[a], Alexandre Olry[b], Nicolas Coudevylle[a], Saïd Azza[b], Sandrine Boschi-Muller[b], Guy Branlant[b] & Manh-Thong Cung[a,*]
[a]*Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France;* [b]*Maturation 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.

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

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}N/^{13}C labelled were prepared by growing cells in a minimal media with ($^{15}NH_4$)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 $^{1}H^{N}$, ^{15}N, C^{α}, C′, and side-chain C^{β} resonances were assigned using ^{1}H-^{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′

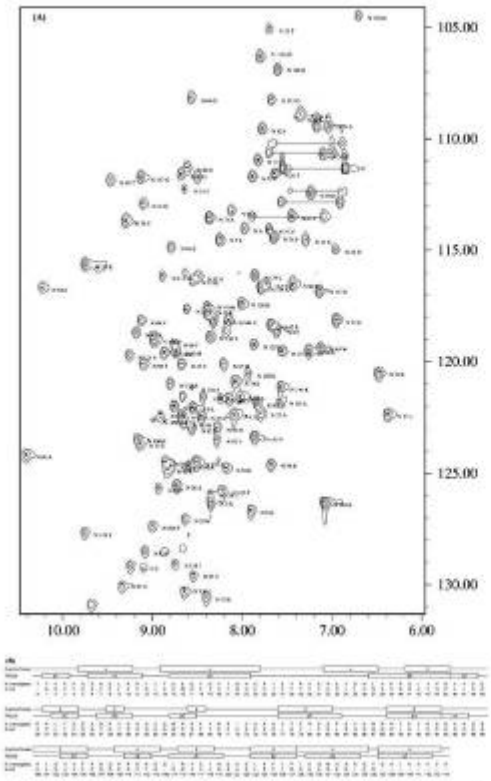


Figure 1. (A) ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of MsrB at 298K. The backbone resonances of S67 and G135 are outside the region shown. Side chain amide protons of N and Q residues are indicated by solid horizontal lines. (B) The secondary structures from the X-ray structure of the *N. gonorrhoeae* MsrB and 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), α1 (D6-R11), α2 (E15-N23), βB (L37-D45), α3 (V46-S48), βC (L52-S54), βD (D57-D60), βE (W65-S67), βF (V77-F83), βG (R89-S94), α4 (H95-A97), βH (H103-F105), α5(R110-K112), βI (L114-N119), βJ (L123-P127), α6 (E129-A134), α7 (G137-K142).

The main differences are the first β-strand (βA) and the two helices (α3) and (α4) 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 ^{1}H ^{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. Chemicals shifts were deposited in the BioMagResBank under access number BMRB-6051 (http://www.bmrb.wisc.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 HNCO, 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 Dorsselear, 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 Dorsselear, 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.

Journal of Biomolecular NMR 30: 363–364, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

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*

Nicolas Coudevylle[a], Aurélien Thureau[a], Saïd Azza[b], Sandrine Boshi-Muller[b], Guy Branlant[b] & Manh-Thong Cung[a,*]

[a]*Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France;* [b]*Maturation 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 29 April 2004; Accepted 28 June 2004

Key words: Escherichia coli, methionine sulfoxide reductase A, resonance assignment

Biological context

Reactive oxygen species (ROS) generated by cells during aerobic respiration or after exposure to various agents, can oxidize proteins. One of the targets in proteins is methionine (Met) which is oxidized into methionine sulfoxide (MetSO). This post-translational modification can provoke loss of protein function. Met oxidation is reversed *in vivo* by methionine sulfoxide reductases (Msr). Therefore, one of the major roles of Msrs is to protect cells against oxidative damage.

There exist two structurally-unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB. The first one is specific for the S enantiomer while the second one is specific for the R enantiomer at the sulfur atom of the sulfoxyde. However, both classes of Msrs display a similar new catalytic mechanism that includes at least three steps (Olry et al., 2002). In the first step, a sulfenic acid intermediate is formed on Cys-51 with a concomitant release of one mol of Met per mol of Msr. Then, in the case of the *Escherichia coli* MsrA, two successive disulfide bonds are formed between first Cys-51 and Cys-198 and then between Cys-198 and Cys-206 (Boschi-Muller et al., 2000). In the last step, the Cys-198/Cys-206 disulfide bond is reduced selectively by thioredoxin (Trx).

Three X-ray structures of MsrAs from *E. coli*, *Bos taurus* and *Mycobacterium tuberculosis* (Tête-Favier et al., 2000; Lowther et al., 2000; Taylor et al., 2003) and one NMR assignment of MsrA from *Erwinia chrysanthemi* (Beraud et al., 2001) have been described so far. In all of the X-ray structures, the active site is occupied by molecules that can mimic either a Michaelis complex or an intermediate/transition state whereas in the NMR structure, no molecule is present in the active site. In all cases, the distances between Cys-51/Cys-198/Cys-206 are too long for disulfide bond formation and therefore the positions of Cys-206 relative to Cys-198 and of Cys-198 relative to Cys-51 which for the latter is situated at the beginning of an α helix, are not representative of those leading to formation of Cys-51/Cys-198 and Cys-198/Cys-206 disulfide bonds. This suggests that there exists a great flexibility of the C terminus of the MsrAs. In that context, the knowledge of the 3D NMR structure of another MsrA, such as the *E. coli* MsrA, not only in its reduced forms but also in its disulfide states will be very informative.

In a first approach, we report here the backbone and side-chain nearly complete assignment of the reduced form of MsrA from *E. coli* as well as one of the putative secondary structures.

Methods and experiments

Production and purification was done as described by Boschi-Muller et al. (2000). Sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 0.9 mM protein concentration (95% H_2O, 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer and 50 mM 1,5-dithiotreitol-d_{10} at pH 7.1. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis gradient TXI probe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with

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

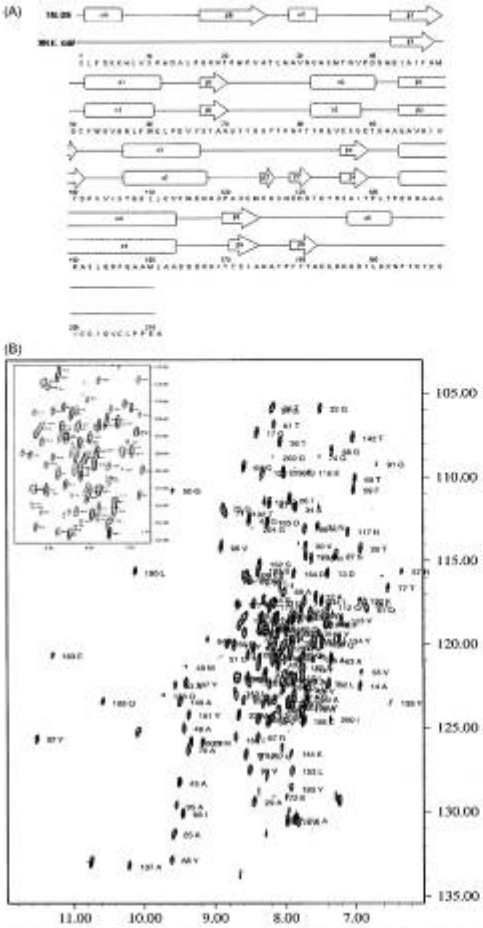


Figure 1. (A) *E. coli* MsrA secondary structure from the TALOS data as compared to the X-ray data. Catalytic cysteines are C_{51}, C_{198} and C_{206}. (B) 2D ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of ^{15}N labelled *E. coli* MsrA at 298 K.

the program XEASY (Bartels et al., 1995). Backbone amide $^{1}H^{N}$, ^{15}N, $^{13}C^{\alpha}$, $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C'$, and side chain ^{1}H, ^{13}C resonances were assigned using ^{1}H-^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and HNHA experiments. HCCH-TOCSY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH and ^{1}H-^{15}N-, ^{1}H-^{13}C- 3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side-chain assignments.

Torsion angles (ϕ, ψ) and secondary structure prediction are based on H^{N}, H^{α}, N, C^{α}, C^{β} and C' chemical shifts using the TALOS program (Cornilescu et al., 1999).

Extent of assignments and data deposition

The ^{15}N TROSY spectrum for *Escherichia coli* MsrA is shown in Figure 1. More than 91% of backbone H^{N}, N, C^{α}, C' and C^{β} nuclei have been assigned, in addition with most of the ^{1}H, ^{13}C side-chain nuclei. Comparing the predicted structure with that of the crystal structure of *E. coli* MsrA, more or less, the structural elements found in solution, *i.e.* 7 α-helices and 6 β-strands, coincide with X-ray data (Figure 1A). The main differences are the first two helices αA, αC, the final α-helix α5 and the β-strand βB which are only predicted in the NMR structure while the β6 is not. It is important to notice that the two Cys-198 and Cys-206, involved in the disulfide bond formation, are present in the C-terminal flexible fragment. The β-strands $\beta3'$ and $\beta3''$ from the X-ray structure are too small elements to be estimated by the NMR secondary structure prediction.

Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB-6090 (http://www.bmrb.wisc.edu).

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 5436). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the SCBIM Nancy I was deeply appreciated. We thank Sophie Gioria and Dr Christine Hemmerlin for their technical assistance.

References

Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 1–10.

Beraud, S., Chambost, J-P., Bersh, B., Gans, P., Barras, F. and Marion, D. (2001) *J. Biomol. NMR*, **20**, 97–98.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, 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., Brot, N., Weissbach, H. and Matthews, B.W. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13307–13312.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12016–12022.

Taylor, A.B., Benglis, Jr., D.M., Dhandayuthapani, S. and Hart, P.J. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 4119–4126.

Tête-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A. (2000) *Structure*, **8**, 1167–1178.

Journal of Biomolecular NMR 30: 229–230, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Letter to the Editor: ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the reduced form of thioredoxin h1 from Poplar, a CPPC active site variant

Nicolas Coudevylle[a], Aurélien Thureau[a], Christine Hemmerlin[a], Eric Gelhaye[b], Jean-Pierre Jacquot[b] & Manh-Thong Cung[a,+]
[a]*Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France;* [b]*Laboratoire Interaction Arbres Microorganismes, UMR 1136 INRA-UHP, Université Henri Poincaré Nancy-1 B.P. 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France*

Received 11 May 2004; Accepted 2 June 2004

Key words: disulfide oxidoreductase, resonance assignment, thioredoxin

Biological context

Thioredoxins belong to a superfamily of oxidoreductase, the function of which is either to create disulfide bonds (protein disulfide isomerases) or reduce disulfides bonds (glutaredoxin, thioredoxin) (Holmgren, 2000). These small molecular weight proteins (ca. 120 amino acids in the mature form for thioredoxin) are generally very stable and excellent catalyst for disulfide reduction. Although thioredoxins can be quite divergent in their primary structure, they seem to be related at the three-dimensional level, with all proteins characterized so far possessing a similar architecture named the thioredoxin fold (Eklund et al., 1984). Genome sequencing has revealed that there are multiple thioredoxin genes in plants (at least 20 in *Arabidopsis thaliana*) (Meyer et al., 2002). Although some of the sequences exhibit unusual mono cysteinic active sites, the vast majority of these sequences conforms to the WCGPC canonic active site. Unlike other organisms however, a significant fraction of the plant proteins exhibits a variant active site with two cysteines and the sequence WCPPC. These CPPC proteins have been studied biochemically in poplar and *Arabidopsis* and found to possess catalytic properties similar to those of the CGPC enzymes. The use of yeast mutants has suggested however that the CPPC enzymes may exhibits specificity in some oxidoreduction reactions that cannot be sustained by the CGPC isoforms (Brehelin et al., 2000). In order to understand the consequence of the G to P mutation on the structure and specificity of thioredoxin, we have overexpressed poplar thioredoxin h1 and purified several isotopically labelled samples. We report here the nearly complete assignments of ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N nuclei as well as the particular secondary structures, a step before the full 3D structural resolution.

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

Methods and experiments

The coding sequence of thioredoxin h1 from *Populus trichocarpa* was cloned into the expression vector pET-Trxh1 and used to transform the expression strain BL21. ^{15}N and ^{15}N/^{13}C labelled samples were prepared by growing cells at 37 °C in minimal media M9, supplemented with ($^{15}NH_4$)Cl as the sole nitrogen source and with ^{13}C-labelled or not glucose, as the only carbon source. Purification and concentration were made as in Behm and Jacquot (2000). Sample purity and molecular mass (12444 Da) were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 1.85 mM protein concentration (95% H_2O, 5% D_2O) in 50 mM phosphate buffer at pH 5.9. All spectra were acquired at 298 °K on Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis TXI probe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analysed with the program XEASY (Bartel et al., 1995). Backbone amide $^{1}H^{N}$, $^{1}H^{\alpha}$, ^{15}N, $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C'$ resonances were assigned using ^{1}H-^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and ^{1}H-^{15}N HSQC-TOCSY experiments, side-chain ^{1}H,

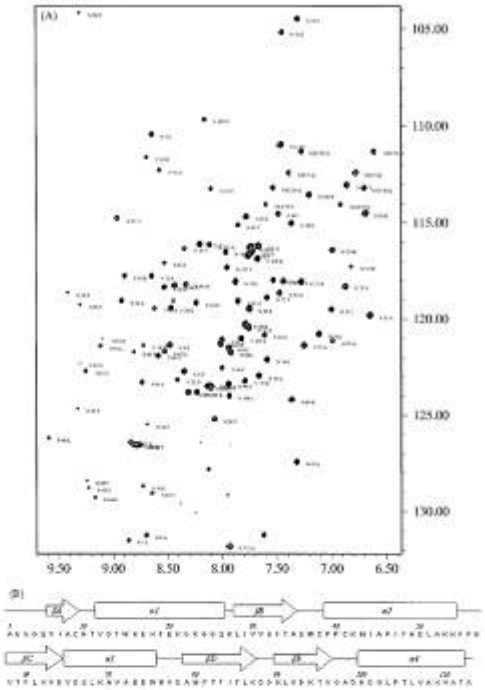


Figure 1. (A) ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of thioredoxin at 298°K. W side chain NH are outside of the region shown. (B) TALOS predicted secondary structures.

^{13}C resonances were assigned using ^{1}H-^{15}N HSQC-TOCSY and HCCH-TOCSY.

Torsions angles (ϕ, ψ) and secondary structure prediction are based on an analysis of the $^{1}H^{N}$, $^{1}H^{\alpha}$, ^{15}N, C^{α}, C' and C^{β} chemical shifts using the TALOS program (Corneliscu et al., 1999).

Extent of assignments and data deposition

More than 96% of backbone, H^{α}, H^{N}, N, C^{α}, C' and side-chain C, H nuclei have been assigned (i.e., 104/107 ^{15}N-H^{N} sites, 110/113 C^{α}, 109/113 H^{α}, 104/107 C^{β}, 109/113 C', and 95% of the side-chain nuclei). Some peaks present in the ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum (Figure 1A) were not found in the other heteronuclear 3D spectra. The TALOS predicted secondary structures (Figure 1B) exhibits a classical thioredoxin fold with 5 β-strands (31% of the primary structure) and 4 α-helices (49% of the primary structure). The CPPC variant active site does not seem to perturb significantly the overall conformation. It will be actually of great interest to complete this study by the assignment of the ^{1}H-^{13}C-, ^{1}H-^{15}N-HSQC NOESY spectra in order to get a high resolution structure of poplar thioredoxin.

Chemicals shifts were deposited in the BioMagResBank under access number BMRB-6079 (http://www.bmrb.wisc.edu).

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL. Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I was deeply appreciated.

References

Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 1–10.

Behm, M. and Jacquot, J.P. (2000) *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 363–369.

Brehelin, C., Mouaheb, N., Verdoucq, L., Lancelin, J.M. and Meyer, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31641–31647.

Corniescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR*, **13**, 289–302.

Elkund, H., Cambillau, N., Sjoberg, B.M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J.O. and Branden, C.I. (1984) *EMBO J.*, **3**, 1443–1449.

Holmgren, A. (2000) *Antioxid Redox Signal*, **2**, 811–20.

Meyer, Y., Vignols, F. and Reichheld, J.P. (2002) *Meth. Enzymol.*, **347**, 394–402.

Biochemistry **2005**, *44*, 2001–2008 2001

Solution Structure of a Natural CPPC Active Site Variant, the Reduced Form of Thioredoxin *h*1 from Poplar[†,‡]

Nicolas Coudevylle,[§] Aurélien Thureau,[§] Christine Hemmerlin,[§] Eric Gelhaye,[∥] Jean-Pierre Jacquot,[∥] and Manh-Thong Cung*[,§]

Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France, and Laboratoire Interaction Arbres Microorganismes, UMR 1136 INRA-UHP, IFR 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelles, Université Henri Poincaré Nancy-1, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France

Received October 12, 2004; Revised Manuscript Received December 2, 2004

ABSTRACT: Assignment of heteronuclear and homonuclear multidimensional NMR spectra permits determination of the first three-dimensional solution structure of a higher-plant thioredoxin *h*. The collection of 1906 distance restraints, 137 TALOS-derived dihedral restraints, and 66 hydrogen bonds was used in the restrained molecular dynamics protocol to calculate the structure of the reduced form of thioredoxin *h*1 from poplar with an atomic rmsd of 0.60 ± 0.12 Å. This enzyme exhibits an unusual active site with the sequence WCPPC and original properties in terms of stability and specificity. Compared to other known thioredoxin structures, thioredoxin *h*1 from poplar adopts the classical "Trx fold". Its atypical active site possesses a conformation similar to that of other common thioredoxins but appears to be more rigid. Moreover, the hydrogen bond network, stabilizing the in-core β-sheet, is tighter than in *Chlamydomonas reinhardtii*, explaining the difference in thermostability.

Thioredoxins (Trxs)[1] belong to a superfamily of oxidoreductases, the function of which is either to create disulfide bonds (protein disulfide isomerases) or to reduce disulfide bonds (glutaredoxins and thioredoxins) (*1*). Thioredoxins are ubiquitous small proteins (ca. 120 amino acids in the mature form), generally very stable, and excellent catalysts for disulfide reduction. Although thioredoxins can be quite divergent in their primary structure, they seem to be related, at the three-dimensional level, to all proteins characterized so far possessing a similar architecture, named the thioredoxin fold (*2*). Genome sequencing has revealed that there are numerous thioredoxin genes in plants (at least 20 in *Arabidopsis thaliana*) (*3*).

The *h* class of thioredoxins is specific to plant organisms. It represents a large multigenic family involved in various processes as protection against oxidative stress and carbon and nitrogen metabolism regulation, but their exact role and cellular distribution remain unclear at least for some isoforms. In higher plants, several members of a subgroup of thioredoxin *h*, called subgroup I (*4*), present unique functional and structural features as a variant active site with two Cys residues and the sequence WCPPC. These "CPPC enzymes" have been studied biochemically in vitro with the poplar and *Arabidopsis* proteins, and found to possess catalytic properties similar to those of the CGPC enzymes (*5*, *6*). The use of yeast mutants suggests, however, that the CPPC enzymes may act specifically in some oxidoreduction reactions, including sulfate assimilation, where they cannot be replaced with the CGPC isoforms (*7*). No structural study has been reported about thioredoxin *h* from higher plants, but the closest structure known is that of *Chlamydomonas reinhardtii* (*8*), the sequence of which is only 53% identical with that of poplar thioredoxin *h*1. Thus, to understand the consequence of the G to P mutation for the structure, properties, and specificity of thioredoxin, we have overexpressed poplar thioredoxin *h*1 (PtTrx*h*1) and purified isotopically labeled samples. We report here the first structure of a higher-plant thioredoxin *h*, determined by NMR spectroscopy, and the structural comparison with other thioredoxins possessing the more classical CGPC active site.

As a first step in this study, we recently reported the near-complete (97%) ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N chemical shift assignment of reduced thioredoxin *h*1 from poplar (*9*). These chemical shifts were deposited in the BioMagResBank as entry BMRB-6079.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. The coding sequence of thioredoxin *h*1 from *Populus tremula* was cloned into the pET-Trxh1 expression vector and used to modify the expression of *Escherichia coli* strain BL21. The ^{15}N- and ^{13}C-labeled

[†] This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I, and INPL.

[‡] Atomic coordinates and NMR-derived restraints have been deposited in the Protein Data Bank (entry 1TI3).

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 33 (0)3 83 17 51 07. Fax: 33 (0)3 83 37 99 77. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr.

[§] UMR 7568 CNRS-INPL.

[∥] Université Henri Poincaré Nancy-1.

[1] Abbreviations: CrTrx*h*1, *C. reinhardtii* thioredoxin *h*; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; rmsd, root-mean-square deviation; PtTrx*h*1, poplar thioredoxin *h*1; Trx, thioredoxin; TSP-d_4, trimethylsilyl-3-propionic acid-2,2,3,3-d_4, sodium salt.

10.1021/bi047816n CCC: $30.25 © 2005 American Chemical Society
Published on Web 01/21/2005

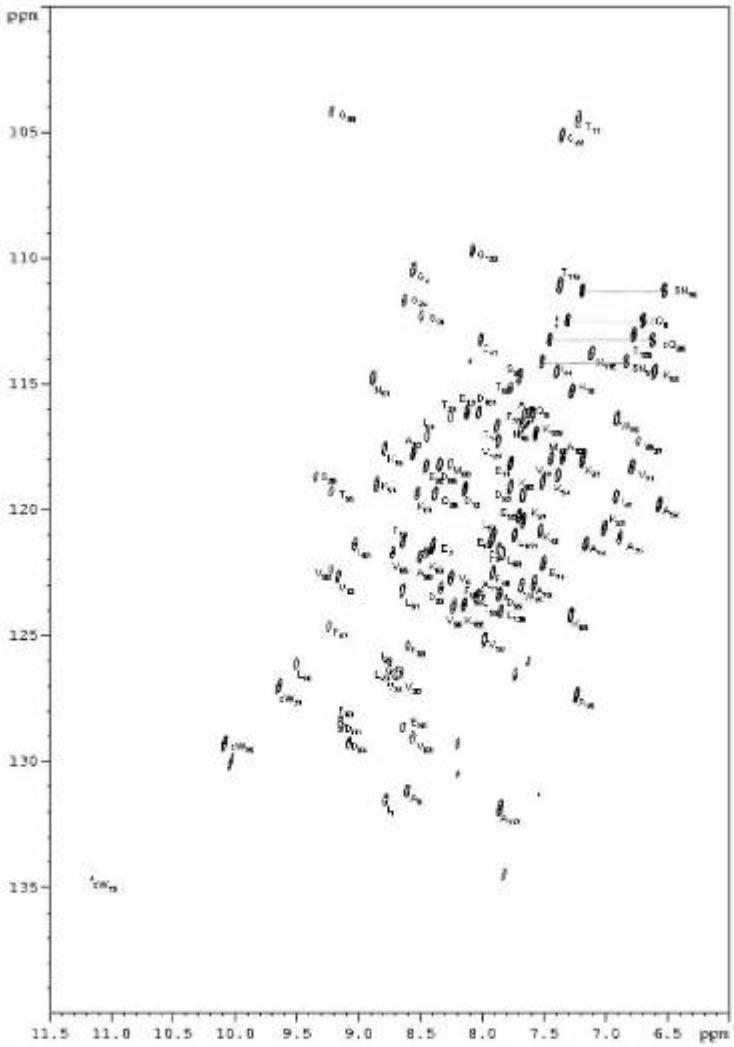


FIGURE 1: $^{1}H-^{15}N$ HSQC spectrum of the reduced form of thioredoxin *h*1 from poplar uniformly labeled with ^{15}N and ^{13}C, recorded at a ^{1}H frequency of 600 MHz, 1.85 mM, in a 95% H_2O/5% D_2O mixture, with 50 mM phosphate buffer (pH 5.9) at 298 K.

sample was prepared by growing cells at 37 °C in minimal medium M9, supplemented with $^{15}NH_4Cl$ (Cambridge Isotope Laboratories) as the sole nitrogen source and with ^{13}C-labeled glucose (Cambridge Isotope Laboratories) as the only carbon source. Purification and concentration were carried out as described by Behm and Jacquot (*5*). The sample purity and molecular mass (12 444 Da for 113 residues) were checked by SDS−PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The uniformly ^{15}N- and ^{13}C-labeled NMR sample had a protein concentration of 1.85 mM (95% H_2O and 5% D_2O) in 50 mM phosphate buffer and 10 mM 1,5-dithiothreitol-d_{10} (Cambridge Isotope Laboratories) (pH 5.9) and sealed under argon.

NMR Spectroscopy and Experimental Restraints. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a gradient three-axis TXI probe. Spectra were processed using XWINNMR (Bruker) and analyzed with XEASY (*10*). TSP-d_4 (Euriso-top) was used as an internal reference for ^{1}H chemical shifts and as external reference for calibration of ^{13}C chemical shifts. Indirect referencing was used for the ^{15}N chemical shift (*11*). Backbone amide $^{1}H^{N}$, $^{1}H^{\alpha}$, ^{15}N, $^{13}C^{\alpha}$, and $^{13}C'$ resonances were assigned using $^{1}H-^{15}N$ HSQC (Figure 1), HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH, and $^{1}H-^{15}N$ HSQC-TOCSY experiments, and side chain ^{1}H and ^{13}C resonances were assigned using $^{1}H-^{15}N$ HSQC-TOCSY and HCCH-TOCSY experiments. Interproton distance restraints were derived from three-dimensional $^{1}H-^{13}C/^{15}N$ HSQC-NOESY experiments with mixing times of 75 and 150 ms; a particular $^{1}H-^{13}C$ HSQC-NOESY experiment was performed with the ^{13}C frequency carrier set to 150 ppm (corresponding to the aromatic carbons) and mixing times of 70 ms, for assignment of the aromatic protons. NOE

cross-peaks were classified as strong, medium, weak, and very weak, and converted into upper limits of 2.5, 3.5, 5.5, and 6.5 Å, respectively. Restraints involving pseudoatoms were systematically overestimated.

Backbone ϕ and ψ dihedral restraints were derived from TALOS (*12*) using as input the ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N backbone chemical shifts determined previously. Only TALOS prediction with 10 matches agreeing was used as ϕ and ψ dihedral restraints which are fixed by the average values with a standard deviation range with a minimum of 10°. All peptide bonds were kept planar and trans, with the exception of that between Met_{80} and Pro_{81} which was restrained to be planar and cis on the basis of the observation of a strong $C^{\alpha}H(i)-C^{\alpha}H(i+1)$ NOE between Met_{80} and Pro_{81} (*13*), and C^{β} and C^{γ} chemical shifts of Pro_{81} ($\delta_{C^{\beta}} = 34.86$ ppm, $\delta_{C^{\gamma}} = 25.56$ ppm) (*14*).

^{1}H−^{15}N HSQC experiments were performed at different temperatures (279.2, 284.7, 289.2, 294.9, 299.6, and 305.4 K) to determine the temperature coefficient ($\Delta\delta/\Delta T$) for each observable H^N on the ^{1}H−^{15}N HSQC spectra. This method permits us to include *a priori* experimental hydrogen bond restraints in the calculation on the basis of a weak observed temperature coefficient (*15*) correlating with the secondary structure prediction (see Table S1 of the Supporting Information for details about temperature coefficients). Hydrogen bond restraints were treated as two distance restraints with an upper limit of 2.4 Å between the hydrogen and the acceptor heavy atom and an upper limit of 3.5 Å between the acceptor and donor heavy atoms. Experimental restraints are summarized in Table 1.

Structure Calculations. Initial structures were calculated with DYANA (*16*). Three hundred randomized structures were generated, and simulated annealing calculations were performed with DYANA. The five structures with the lowest target function were selected for refinement.

The structures were refined by a minimization protocol using DISCOVER (Accelrys Inc., San Diego, CA) and the cvff force field (*17*) with a distance-dependent dielectric constant set to 4*r*, by means of 100 steps of steepest descent followed by 10 000 steps of a conjugate gradient algorithm. The five minimized structures were used as starting structures for restrained molecular dynamics at 300 K; after an equilibration period of 200 ps, each of the five structures was recorded every 5 ps over the course of 50 ps to generate 50 structures. The 20 best-fitting structures were selected as the final set. An arithmetic average was computed with MOLMOL (*18*) to describe the mean structure. Tables and figures were created using DYANA, MOLMOL, PROCHECK-NMR (*19*), and INSIGHT II. The coordinates of the 20 final structures have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank as entry 1TI3.

RESULTS

NOE Assignments and Structure Determination. After the required backbone and side chain ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N assignments had been made (*9*), the three-dimensional HSQC-NOESY spectrum was examined. A first set of approximately 900 unambiguous restraints (including dihedral restraints and hydrogen bonds stabilizing evident secondary structure elements) allows us to define the overall topology of PtTrx*h*1. Taking this topology into account, we then found it easier to assign ambiguous correlations and to identify the heavy atom acceptor for H^N exhibiting a low temperature coefficient (as $H^{N\delta1}_{37}$ or H^N_{41}), and to gather the final set of 1906 distance restraints used for the calculation procedure described below (NOEs are represented in Figure 2).

Table 1: NMR-Derived Geometrical Restraints and Structural Statistics of the Conformational Ensemble

restraint	number
upper interproton	
total of distance restraints	1906
H-bonds[a]	122
intramolecular	894
sequential ($i, i+1$)	663
long-distance	217
dihedral angle	138
φ	67
ψ	70
ω[b]	1
violation	**no. per conformer**
distance violation (Å)	
>0.0	81 ± 9
>0.1	1.6 ± 1.4
>0.2	0
dihedral violation	
>0°	18 ± 3
>5°	2.1 ± 1.4
>10°	0
Ramachandran plot of residues[c]	
residues in the most favorable region (%)	79
residues in additional allowed regions (%)	19
residues in generously allowed regions (%)	2
residues in disallowed regions (%)	0
atoms	**rmsd (Å)**
backbone (residues 3−111)	0.53 ± 0.10
backbone (residues 1−113)	0.60 ± 0.12
heavy (residues 3−111)	0.89 ± 0.15
heavy (residues 1−113)	0.96 ± 0.18

[a] Each hydrogen bond is treated as two distance restraints, so 122 distance restraints represent 61 hydrogen bonds. [b] Only the cis peptide bond ($Met_{80}-Pro_{81}$), experimentally characterized, has been imposed. [c] Calculated with PROCHECK-NMR.

Structural Statistics. The 20 final structures of reduced PtTrx*h*1 exhibit an atomic rms distribution about the mean coordinate positions of 0.5 ± 0.1 Å for the backbone atoms and 0.90 ± 0.15 Å for all of the heavy atoms, excluding the two N- and C-terminal residues, which are ill-defined. The restrained molecular dynamics protocol has the advantage of offering a dynamic view of the structure, and most of the restraint violations are less than 0.1 Å. The structure set fits the experimental restraints with no interproton distance and torsion angle violations greater than 0.2 Å and 10°, respectively (Table 1). As shown in Figure 3, the rms distribution is not homogeneous along the sequence, which indicates a degree of flexibility in some regions (loops or turns). All of the backbone torsion angles of the non-glycine residues fall in the allowed regions of the Ramachandran plot, with the exception of Lys_{90} which is implicated in the β-bulge (Table 1).

Description of the Overall Structure. The overall structure of PtTrx*h*1 adopts a classical Trx fold that consists of a five-stranded β-sheet surrounded by four α-helices. Figure 4A shows the superposition of the 20 backbone structures and a schematic view of the regular secondary elements of the most representative structure. Approximately 80% of the

FIGURE 2: Summary of the sequential NOE connectivities in the reduced form of thioredoxin *h*1 from poplar. For the NN, αN, βN, and αβ nearest-neighbor connectivities, the NOE intensities are represented by different line thicknesses and are classified as strong, medium, weak, and very weak.

residues in PtTrx*h*1 are involved in regular secondary structures. The noncanonical active site forms a protruding loop from the end (Ala_{35}) of the second β-strand to the beginning (Lys_{42}) of helix α_2.

Hydrogen Bonding. Most of the imposed hydrogen bonds are present in the structure with a frequency greater than 80%. Four other important bonds are observed; the H^N_{54}···O_{51} bond, which appears in 70% of the calculated structures, is certainly due to the local disorder at the last turn of helix α_2 that generates a bifurcated hydrogen bond for H^N_{54}. The H^N_{52}···O_{79} hydrogen bond (55% occurrence) seems to stabilize the loop between α_3 and β_4. The H^N_{89}···O_{87} bond, which participates to the loop between the β_4 and β_5 strands, and the H^N_4···O_{52} hydrogen bond are certainly modeling artifacts due to the absence of an explicit solvent; in fact, these two latter H^N protons present high temperature coefficients that are incompatible with the presence of hydrogen bonding (-9.3×10^{-3} and -7.13×10^{-3} ppm/K, respectively).

β-Sheet. The core of PtTrx*h*1 consists of a five-stranded β-sheet. The individual strands comprise residues from Val_5 to Cys_9 (β_1), Leu_{28} to Thr_{34} (β_2), Val_{58} to Asp_{64} (β_3), Thr_{82} to Lys_{87} (β_4), and Val_{92} to Val_{96} (β_5), this last strand being interrupted by the β-bulge (from Lys_{90} to Val_{92}). Both parallel (p) and antiparallel (a) arrangements of the strands display the pattern β_1(p)β_3(p)β_2(a)β_4(a)β_5. H^N_{65} forms a hydrogen bond with O_{34} that would allow us to include Val_{65} in β_3, but the dihedral angles ($\varphi = -54.4 \pm 5.5°$ and $\psi = -38.5 \pm 7.3°$) suggest that Val_{65} should belong to a type III β-turn from Val_{65} to Leu_{68} stabilized by the H^N_{68}···O_{65} hydrogen bond [this turn is characterized by the strong αN(65,68) NOE correlation]. The β-sheet has the characteristic right-handed twist.

Helices. PtTrx*h*1 contains four α-helices surrounding the β-sheet core. The first helix, α_1, extends from Val_{12} to Gly_{22} with three turns of regular α-helix. The second helix, α_2, is also regular and extends from Pro_{39} to Lys_{54} (including the Pro_{39}−Cys_{41} fragment of the active site). A small distortion in the axis of this helix is caused by Pro_{46}, and this helix displays a regular helical hydrogen bond network with four turns. The third α-helix, α_3, extends from Lys_{69} to Asn_{76} with two turns of regular α-helix. The fourth and last α-helix, α_4, extends from Gly_{102} to His_{110}, with two regular turns and with the three final residues irregularly included as an incomplete turn because of the significant flexibility of that segment (shown by an important rmsd, 0.7 ± 0.3 Å, on the last three residues) but with retention of the H^N_{111}···O_{107} hydrogen bond in 100% of the structures.

Active Site. PtTrx*h*1 possesses a noncanonical active site with the Ala_{35}-Ser_{36}-Trp_{37}-Cys_{38}-Pro_{39}-Pro_{40}-Cys_{41}-Lys_{42} sequence, which is very well defined with a local backbone rmsd of 0.4 ± 0.1 Å (0.5 ± 0.1 Å for heavy atoms). As shown in Figure 4C, the active site forms a protruding loop outside the protein; residues Ala_{35}−Cys_{38} are located on the

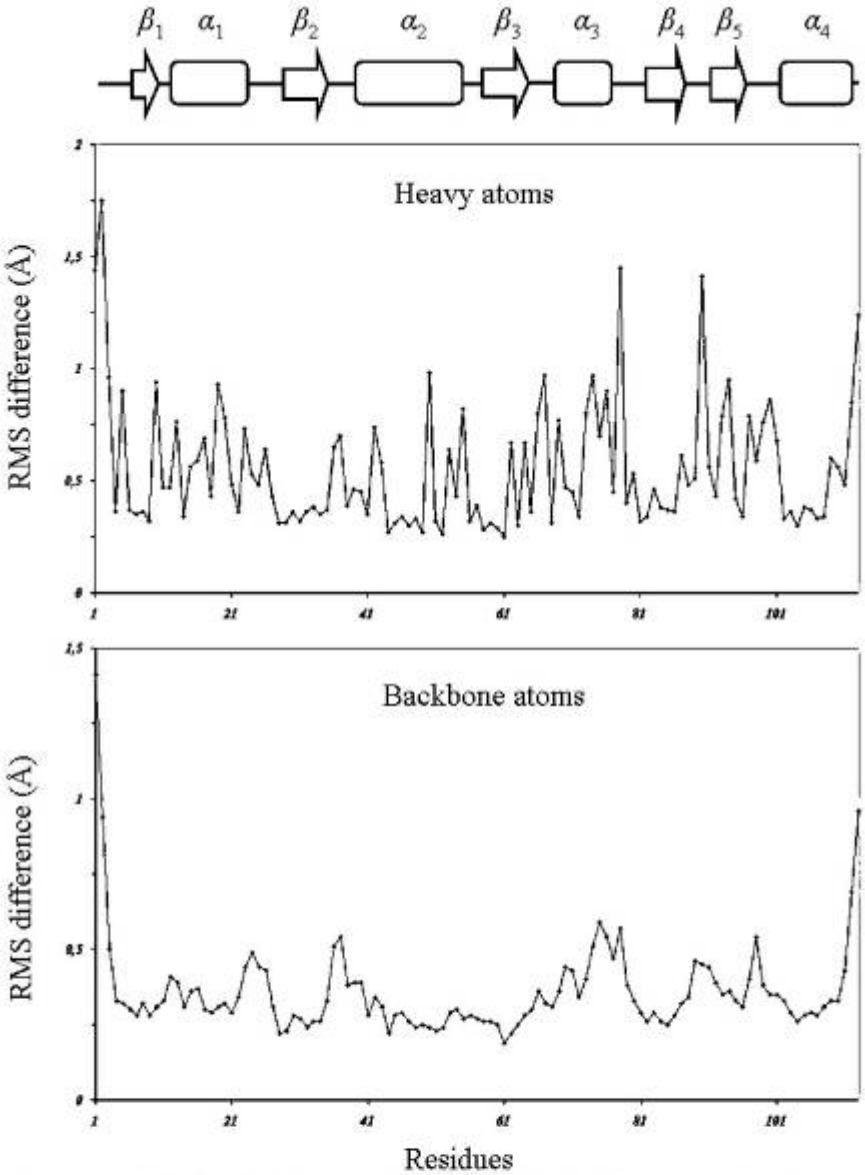


FIGURE 3: Root-mean-square distribution along the sequence. The rms distribution is not homogeneous along the sequence, reflecting flexibility of some regions, i.e., loops or turns between secondary structure elements.

loop between β_2 and α_2 and residues Pro_{39}–Lys_{42} initiating the first turn of α_2 which is stabilized by both H^N_{42}···O_{38} and H^N_{43}···O_{39} hydrogen bonds. The aromatic ring of Trp_{37} is on the protein surface and interacts with its spatial neighboring residues (Ala_{35} and Met_{80}), a strong hydrogen bond between H^{ζ}_{37} and O^{δ}_{66} (H^{ζ}_{37} exhibits a temperature coefficient near 0 ppb/K) being observed in 90% of the structures. Cys_{38} and Cys_{41} are in their sulfhydryl form, and a hydrogen bond between H^N_{41} and S^{γ}_{38} is found in 100% of the structures (H^N_{41} exhibits a small temperature coefficient of -1.8×10^{-3} ppm/K), stabilizing the spatial structure of the active site. Asp_{32}, which is supposed to facilitate the thiol deprotonation of Cys_{41} (*20*), is correctly located on strand β_2 (see Table S2 of the Supporting Information for the statistical data about the active site).

Aromatic Side Chains. Eight aromatic residues contribute to the structural stability of the protein hydrophobic core: Trp_{15} (which is specific to class I of thioredoxin *h*) (*4*), His_{18}, Phe_{33}, Phe_{48}, Phe_{60}, and Trp_{75} (which is specific to plant thioredoxin *h*, and not found in Trx*h* from *C. reinhardtii*, for example), Phe_{83}, and Phe_{85}. As shown in Figure 5A, residues Phe_{33}, Phe_{60}, Phe_{83}, and Phe_{85} are located on the inner side of the β-sheets and His_{18} and Phe_{48} are situated on the inner side of amphipathic helices and interact within

2006 *Biochemistry, Vol. 44, No. 6, 2005* Coudevylle et al.

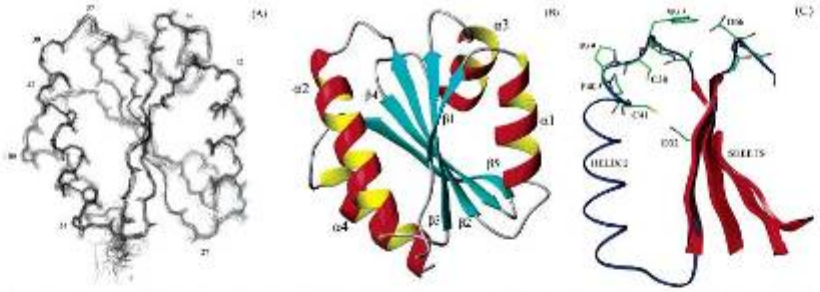


FIGURE 4: Overall solution structures of PtTrx*h*1 and its active site. (A) Backbone superposition of the ensemble of 20 structures. (B) Symbolic representation of the different secondary structure elements. (C) Active site of the most representative form (essential amino acids are represented with their side chains).

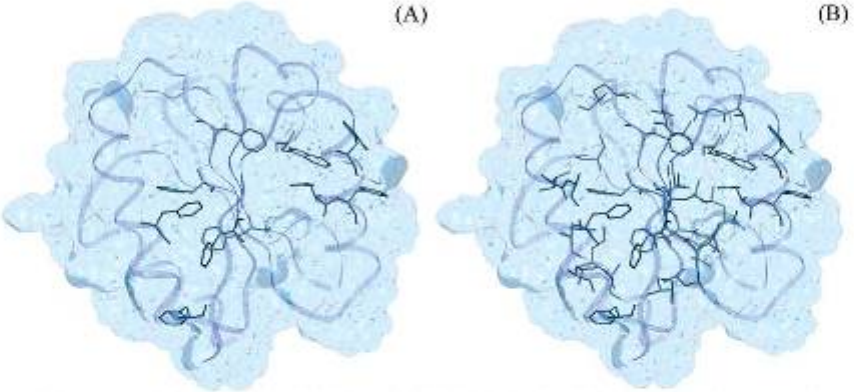


FIGURE 5: Hydrophobic core organization of PtTrx*h*1. (A) Aromatic side chains involved in the hydrophobic core are those of Trp_{15}, His_{18}, Phe_{19}, Phe_{33}, Phe_{42}, Phe_{55}, Phe_{60}, Trp_{75}, Phe_{83}, and Phe_{85}. (B) Aromatic and aliphatic side chains involved in the hydrophobic core are those of Leu_{28}, Ile_{29}, Val_{30}, Val_{31}, Ile_{44}, Leu_{51}, Val_{53}, Leu_{57}, Val_{63}, Leu_{78}, Ile_{82}, Leu_{84}, Leu_{91}, Val_{92}, Val_{94}, Leu_{103}, Leu_{104}, and Val_{105}.

the hydrophobic core. Trp_{15} and Trp_{75} interact with one another (and certainly with His_{18}) in a groove formed by helices α_1 and α_5. Moreover, several NOE correlations can be observed between the two Trp_{15} and Trp_{75} side chains. In addition, Phe_{55}, which is conserved in thioredoxins (*21*), is positioned at the end of a groove formed by helices α_2 and α_4 and Phe_{19} in the groove between helices α_1 and α_5, near Trp_{15} and Trp_{75}. As shown in Figure 5B, other nonaromatic hydrophobic side chains participate in the hydrophobic core.

DISCUSSION

Comparison with Other Known Thioredoxin Structures. Thioredoxins can be quite divergent in their primary structures, although all of the structures resolved up to date adopt the Trx fold. In that context, it is interesting to compare our solution three-dimensional structure of PtTrx*h*1 with other well-known thioredoxins, the closest one being thioredoxin *h* from *C. reinhardtii* (CrTrx*h*1) (*8*).

The sequences of these two proteins are only 50% identical, although the overall tertiary structures are very close: the different secondary structure elements have the same size and position. As in human thioredoxin (*22*), the α_1 and α_5 helices are longer than in the bacterial thioredoxin and α_3 helix is clearly identified as a regular α-helix.

Also, some differences can be observed with the structure of thioredoxin *h* from *C. reinhardtii* (CrTrx*h*1), the N-terminus of PtTrx*h*1 being much longer than that of CrTrx*h*1 and freely exposed to solvent. The Lys_{22}–Lys_{27} loop of PtTrx*h*1 (located between α_1 and β_2) is quite different from the Lys_{21}–Lys_{25} loop of CrTrx*h*1. In the case of PtTrx*h*1, Lys_{22}–Lys_{27} form an irregular α_1-turn (stabilized by the $H^N_{25}\cdots O_{21}$ hydrogen bond) ending the α_1 helix; this loop interacts closely with the Asp_{80}–Leu_{91} one (extending from β_4 to β_5); for CrTrx*h*1, the Lys_{21}–Lys_{25} loop remains unstructured. The β-bulge is also more structurally defined in PtTrx*h*1 than in CrTrx*h*1, introducing slight conformational differences between the Asp_{85}–Leu_{91} (PtTrx*h*1) and Asp_{87}–Lys_{90} (CrTrx*h*1) loops.

It was reported that CrTrx*h*1 is less thermostable than PtTrx*h*1 (*5*). A closer examination of the structural differences between the two proteins might explain this observation. The first idea is that Trp_{75} contributes to the reinforcement of the hydrophobic core, thus increasing the thermal stability. Indeed, this residue is not present in CrTrx*h*1 (substituted for Ala), but an experimental A74Y mutation in CrTrx*h*1 did not change the thermal properties of this enzyme (*23*). The number of hydrogen bonds in each structure shows that the β-sheets in PtTrx*h*1 are stabilized by a greater number of hydrogen bonds than in CrTrx*h*1 (*24*), 25 instead of 20. This observation could explain the difference in thermal stability between these two proteins. Moreover, this observation supports the idea that this family

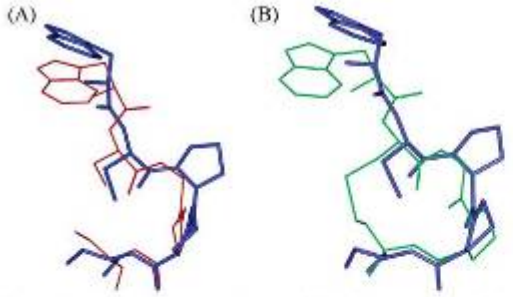


FIGURE 6: Active site comparisons. (A) Backbone superposition between the active site of PtTrx*h*1 (blue) and that of *E. coli* Trx (red) leads to a rmsd of 0.98 Å. (B) Backbone superposition with the active site of the oxidized CrTrx*h*1 (green) gives a rmsd of 1.14 Å.

of protein is more stabilized by the inner β-sheet disposition (and its hydrogen bonding network) than by hydrophobic packing forces.

As reported above, the PtTrx*h*1 active site is well-defined and consists of a protruding loop between β_2 and α_2, including the first turn of α_2. Backbone superposition between the active site of PtTrx*h*1 ($W_{29}C_{30}P_{39}P_{40}C_{41}$) and that of *E. coli* Trx ($W_{31}C_{32}G_{33}P_{34}C_{35}$) (*25*) leads to a rmsd of 0.98 Å as shown in Figure 6A. The same superposition with the active site of the oxidized CrTrx*h*1 give a rmsd of 1.14 Å as shown in Figure 6B. It has been reported that the difference between oxidized and reduced forms of a Trx from a given organism is negligible (*26*, *27*). Assuming that backbone position and side chain orientations of the PtTrx*h*1 active site are very close to that observed in classical thioredoxins, we can conclude that the G to P mutation does not give rise to important conformational changes but leads to more rigid structural characteristics. First, the presence of a second proline in the active site seems to decrease the flexibility of the loop as revealed by a low rmsd on the Ala_{36}–Lys_{44} segment; second, the portion of the active site, included in the α_2 helix, adopts a more regular α-helical turn than in other structures where this turn is commonly considered to be rather loosely defined.

Structure–Function Relationship. As reported below, the atypical active site adopts a classical spatial disposition, suggesting that the conformation of the Cys-X-X-Cys loop is necessary for the redox activity. The presence of a proline instead of a glycine residue may play a singular role in specificity and/or in redox potential. No explanation can be formulated about structural determinants for PtTrx*h*1 specificity, but the characteristics induced by Pro and/or the chemical nature of the side chains surrounding the active site probably play an important role in specificity.

PtTrx*h*1 exhibits an important propensity to polymerize at high concentrations; this type of covalent aggregation may occur for the oxidized form of thioredoxin *h*, suggesting the formation of an intermolecular disulfide bridge involving a cysteine residue other than Cys_{38} or Cys_{41}. The only single cysteine (Cys_6) present in the PtTrx*h*1 sequence may participate to the formation of an intermolecular covalent bond. In fact, this cysteine is situated on strand β_1 and is relatively exposed to the solvent, a position in favor of the formation of a heterodisulfide bridge.

Thioredoxins *h* from subgroup 1 are found in the phloem sieve tubes. Since these proteins are synthesized in the companion cell, they are able to be transferred through plasmodesmata to the enucleate sieve tube elements (*28*). The N-terminal motif AEE, necessary for this cell to cell transfer, is a recognition sequence, and in agreement, it is largely exposed to solvent. It does not exhibit any particular conformation and seems to be particularly flexible except that the two glutamate side chains must face the solvent, allowing a possible protein–protein interaction. Moreover, the fourth following glycine residue in the sequence may increase the flexibility of the AEE fragment and its conformational adaptability.

CONCLUDING REMARKS

The solution structure of thioredoxin *h*1 from poplar described in this paper is the first reported structure of a higher-plant thioredoxin *h*. On the basis of the particularities of that protein, we have focused on the understanding of the structural determinants of its specificity and thermostability. Along with the similarities found between this protein and other thioredoxins, we showed its specific conformation to be mandatory for its redox activity. In that context, it will be of a great interest, by means of NMR studies, to investigate interaction mechanisms of different protein–protein complexes involving thioredoxin *h*1 with other in vivo partners such as NADP thioredoxin reductase (NTR) or glutaredoxin (GRX) (*29*).

ACKNOWLEDGMENT

Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I, is deeply appreciated. We thank Dr. G. Boussard for his critical review of the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Tables giving the temperature coefficients ($\Delta\delta/\Delta T$) of H^N involved in hydrogen bond restraints and the structural statistics about the Ala_{36}–Lys_{44} active site. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES

1. Holmgren, A. (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems, *Antioxid. Redox Signaling 2*, 811–820.
2. Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B. M., Holmgren, A., Jornvall, H., Höog, J. O., and Brändén, C. I. (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins, *EMBO J. 3*, 1443–1449.
3. Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J. P. (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position, *Methods Enzymol. 347*, 394–402.
4. Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J. P. (2004) The thioredoxin h system of higher plants, *Plant Physiol. Biochem. 42*, 265–271.
5. Behm, M., and Jacquot, J. P. (2000) Isolation and characterization of thioredoxin h from poplar xylem, *Plant Physiol. Biochem. 38*, 361–369.
6. Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J. P., Decottignies, P., Miginiac Maslow, M., and Meyer, Y. (1995) Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92*, 5620–5624.
7. Broselin, C., Mouaheb, N., Verdoucq, L., Lancelin, J. M., and Meyer, J. M. (2000) Characterization of determinants for the specificity of *Arabidopsis* thioredoxins *h* in yeast complementation, *J. Biol. Chem. 275*, 31641–31647.

8. Mittard, V., Blackledge, M. J., Stein, M., Jacquot, J. P., Marion, D., and Lancelin, J. M. (1997) NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem. 243*, 374−383.
9. Coudevylle, N., Thureau, A., Hemmerlin, C., Gelhaye, E., Jacquot, J. P., and Cung, M. T. (2004) ^{1}H, ^{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*, 229−230.
10. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules, *J. Biomol. NMR 6*, 1−10.
11. Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., and Sykes, B. D. (1995) ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR, *J. Biomol. NMR 5*, 135−140.
12. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J. Biomol. NMR 13*, 289−302.
13. Forman-Kay, J. D., Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P., Richards, F. M., and Gronenborn, A. M. (1989) A proton nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure determination of recombinant human thioredoxin, *Biochemistry 28*, 7088−7097.
14. Siemion, I. Z., Wieland, T., and Pook, K. H. (1975) Influence of the distance of the proline carbonyl from the beta and gamma carbon on the ^{13}C chemical shifts, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 14*, 702−703.
15. Baxter, J. N., and Williamson, M. P. (1997) Temperature dependence of ^{1}H chemical shifts in proteins, *J. Biomol. NMR 9*, 359−369.
16. Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, *J. Mol. Biol. 273*, 283−298.
17. Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M., and Hagler, A. T. (1988) Structure and Energetics of Ligand Binding to Proteins: *E. coli*. Dihydrofolate Reductase-Trimethoprim, A Drug-Receptor System, *Proteins: Struct., Funct., Genet. 4*, 31−47.
18. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics 14*, 52−55.
19. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J. Biomol. NMR 8*, 477−486.
20. Chivers, P. T., and Raines, R. T. (1997) General Acid/Base Catalysis in the Active Site of *Escherichia coli* Thioredoxin, *Biochemistry 36*, 15810−15816.
21. Eklund, H., Gleason, F. K., and Holmgren, A. (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species, *Proteins: Struct., Funct., Genet. 11*, 13−28.
22. Forman-Kay, J. D., Clore, G. M., Wingfield, T. P., and Gronenborn, M. A. (1991) High-resolution three-dimensional structure of reduced recombinant human thioredoxin in solution, *Biochemistry 30*, 2685−2698.
23. Lemaire, S. D., Richardson, J. M., Goyer, A., Keryer, E., Lancelin, J. M., Makhatadze, G. I., and Jacquot, J. P. (2000) Primary structure determinants of the pH- and temperature-dependent aggregation of thioredoxin, *Biochim. Biophys. Acta 1476*, 311−323.
24. Mittard, V., Morelle, N., Brutscher, B., Simorre, J. P., Marion, D., Stein, M., Jacquot J. P., Lirsac P. N., and Lancelin, J. M. (1995) ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N resonance assignments oxidized thioredoxin *h* from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using new methods based on 2D triple-resonance NMR spectroscopy and computer assisted backbone assignment, *Eur. J. Biochem. 229*, 473−485.
25. Dyson, H. J., Gippert, G. P., Case, D. A., Holmgren, A., and Wright, P. (1990) Three-dimensional solution structure of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry 29*, 4129−4136.
26. Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1994) High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin, *Structure 2*, 853−868.
27. Coupne, J., Remerowski, M. L., Bailleul, A., Courcon, M., Gilles, N., Quemeneur, E., and Jamin, N. (1998) Differences between the electronic environments of reduced and oxidized *Escherichia coli* DsbA inferred from heteronuclear magnetic resonance spectroscopy, *Protein Sci. 7*, 2065−2080.
28. Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., and Chino, M. (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap, *Planta 195*, 456−463.
29. Tamarit, J., Belli, G., Cabiscol, E., Herrero, E., and Ros, J. (2003) Biochemical Characterization of Yeast Mitochondrial Grx5 Monothiol Glutaredoxin, *J. Biol. Chem. 278*, 25745−25751.

BI047816N

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

Chrystel Beaufils[a], Fabrice Neiers[b], Nicolas Coudevylle[a], Sandrine Boschi-Muller[b], Marie-Christine Averlant-Petit[a], Guy Branlant[b] and Manh-Thong Cung[a, *]

[a]LCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France;

[b]MAEM, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

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

Neisseria meningitidis bacteria possess several antioxidant defence mechanisms that protect them against their host environment among which the PilB protein is postulated to be involved. PilB is composed of three domains including the N-terminal part that was recently shown to reduce the oxidized forms of methionine sulfoxide reductase and belongs to the thioredoxin-fold family (Wu et al., 2005). We report the nearly complete ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (143 amino acids). 2D and 3D NMR experiments were performed with uniformly ^{15}N-, ^{13}C-labelled protein. More than 95% of backbone H^{N}, N, C^{α}, C' and side chain C^{β} nuclei have been assigned. Secondary structure determination using CSI method and TALOS lead to the prediction of 5 α-helical and 5 β-sheet segments. BMRB deposit with accession number 6709.

Biological context

Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae are the only two pathogenic members of the *Neisseria* family of Gram-negative bacteria. These bacteria possess several antioxidant defence mechanisms that protect them against their host environment among which the PilB protein is postulated to be involved. Indeed, the secreted form of Pilb, which is bound to the outer membrane, was recently shown to be implied in survival of the *N. gonorrhoeae* in the presence of oxidative damage (Skaar *et al*., 2002). PilB is composed of three domains. The central and the C-terminal domains display methionine sulfoxide reductase (Msr) A and B activities, respectively (Olry *et al*., 2002) while the N-terminal part was recently shown to reduce the oxidized forms of MsrA and MsrB. The biochemical properties of the N-terminal domain also suggest a fold belonging to the thioredoxin-fold family (Wu *et al*., 2005).

Comparison of the primary structure of the N-terminal domain with those of the known and putative proteins in the public data bases shows however no significant identity with any protein, excepted for some thiol-disulfide interchange proteins like CcmG/DsbE implicated in cytochrome C-type biogenesis (from 20 to 24 % identities). The only peculiar feature is the presence of a CXXC signature. Therefore, the N-terminal domain appears as a good target to selectively block the invasion of these pathogens. For that, knowledge of the three-dimensional structure appears as a prerequisite. We report here the backbone and side-chain atom nearly complete assignment of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (143 amino acids), which only differs from its *N. gonorrhoeae* counterpart by four amino acids. The probable secondary structures are also presented.

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for N-terminal domain ($\Delta_{33\text{-}175}$) of PilB production was BL21-DE3 pLysS transformed with a pETNterPilB plasmid. ^{15}N- and ^{15}N/ ^{13}C- labelled samples were prepared by growing cells in a minimal media with $^{15}NH_4Cl$ as the sole nitrogen source and with glucose, ^{13}C-labelled or not, as the only carbon source. The N-terminal domain production was induced at an OD_{600} of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h for the ^{15}N/^{13}C protein and 16 h for the ^{15}N protein. Purification was done as described by Wu *et al*. (2005). Sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 1 mM protein concentration (95% H_2O, 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer and 50 mM 1,5-dithiotreitol-d_{10} at pH 7.1. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis gradient TXI probe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels *et al.*, 1995). Backbone amide $^1H^N$, ^{15}N, $^{13}C^\alpha$, $^1H^\alpha$, ^{13}C', and side chain ^{1}H, ^{13}C resonances were assigned using ^{1}H-^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and HNHA experiments. HCCH-TOCSY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH and ^{1}H-^{15}N-, ^{1}H-^{13}C- 3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side-chain assignments.

Torsion angles (ϕ, ψ) and secondary structure prediction are based on H^N, H^α, N, C^α, C^β and C' chemical shifts using the TALOS program (Cornilescu *et al*., 1999).

Extent of assignments and data deposition

The ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum for the N-terminal domain of PilB is shown in Figure 1. More than 95% of backbone H^N, N, C^α, C' and C^β nuclei have been assigned (i.e., 127/134 ^{15}N-

H^N sites, 139/144 C^α, 139/144 C', 130/135 C^β). Proton and carbon chemical shift data for the majority of side chain groups were determined using a combination of 3D spectra. Evaluation of the obtained H^α, C', C^α and C^β chemical shifts by the CSI program (Wishart and Sykes, 1994) lead to the prediction of five α-helical and five β-sheet segments longer than four residues : β1 (P57-F62), αA (L69-W80), αB (A84-S87), β2 (A89-P97), αC (D107-A113), β3 (L120-N126), αD (T129-L134), β4 (S137-I145), β5 (R153-K156), αE (E161-R169). In addition, the TALOS program predicts also the presence of several secondary structure elements, composed by segments shorter than four residues, in the N-terminal part and in the 147-160 fragment of the protein. The predicted secondary structures of the N-terminal domain are near of those of the CcmG/DsbE from *Bradyrhizobium japonicum* and differ only by the length of the β-strands and the α-helices (Edeling *et al*., 2002).

Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB 6709 (http://www.bmrb.wisc.edu).

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Ministère délégué à la Recherche (ACI BCMS047), the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires, Nancy I was deeply appreciated. We thank Aurélien Thureau and Dr Guy Boussard for their assistance.

References

Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 1-10.

Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR*, **13**, 289-302.

Edeling, M.A., Guddat, L.W., Fabianek, R.A., Thony-Meyer, L. and Martin, J.L. (2002) *Structure*, **10**, 973-9.

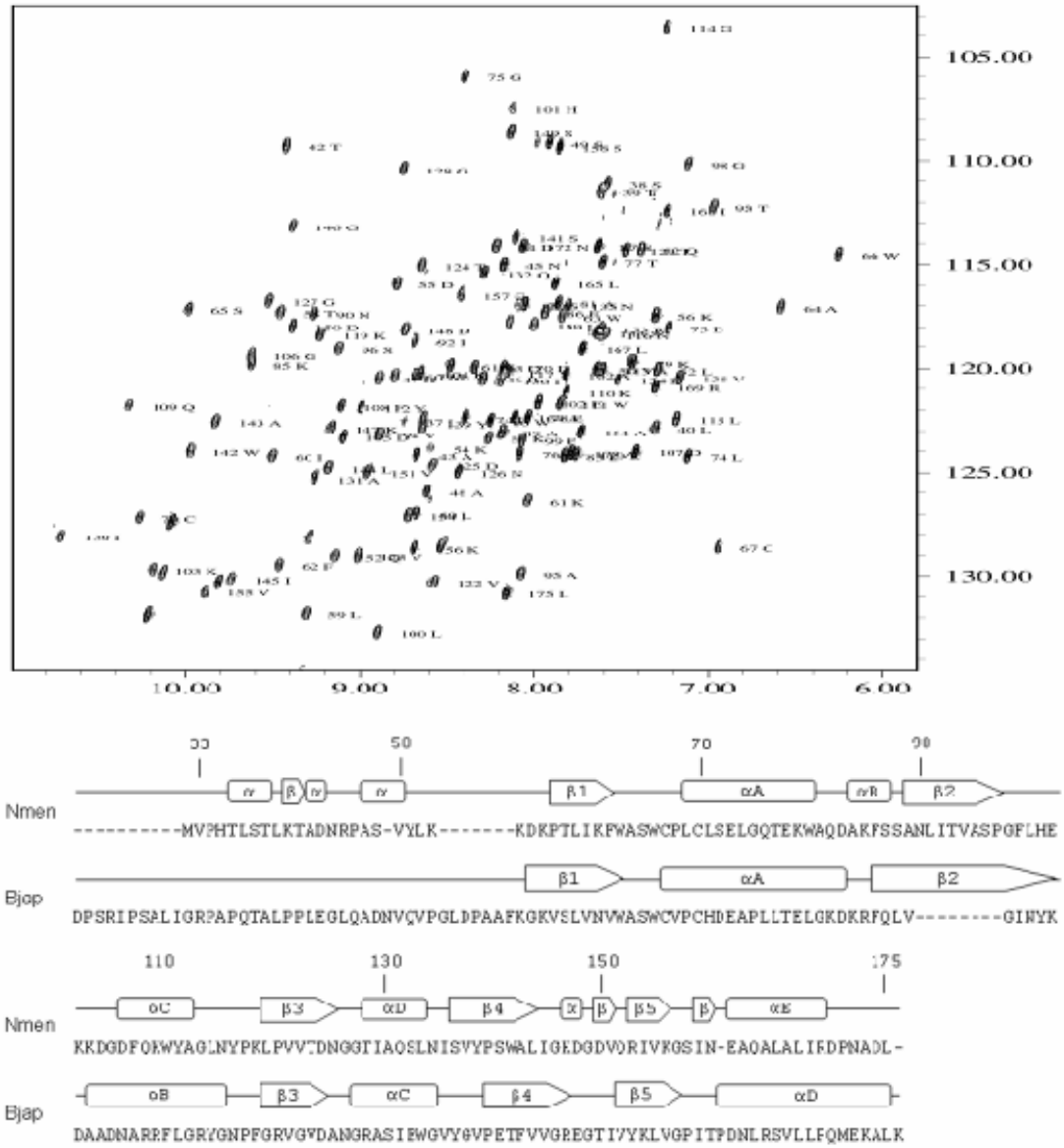
Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12016-12022.

Skaar, E. P., Tobiason, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Seifert, H. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 10108–10113.

Wishart, D.S. and Sykes, B.D. (1994) *J. Biol. NMR*, **4**: 171–180.

Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. and Branlant, G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12344-12350.

Figure 1: (Top) ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* at 298 K and 600 MHz. (Bottom) Sequences alignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* (with secondary structure elements predicted by TALOS) with CcmG/DsbE from *Bradyrhizobium japonicum* (with secondary structure elements from the X-ray structure). The numbering of amino acid residues is based on the numbering of the entire PilB (Wu *et al*., 2005).



^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of an oxidized form (Cys_{51}-Cys_{198}) of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Escherichia coli*

Nicolas Coudevylle[a], Mathias Antoine[b], Sandrine Boschi-Muller[b], Guy Branlant[b] and Manh-Thong Cung[a, *]

[a]LCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France;

[b]MAEM, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

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

Methionine Sulfoxide Reductase A (MsrA) is involved in the reduction of methionine-(*S*)-sulfoxides generated during an oxidative stress. The catalytic mechanism of *E. coli* MsrA involves the formation of two successive disulfide bonds (Cys_{51}-Cys_{198} and Cys_{198}-Cys_{206}), both are reducible by thioredoxin. We report the nearly complete ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the oxidized form (Cys_{51}-Cys_{198}). 2D and 3D NMR experiments were performed with uniformly ^{15}N-, ^{13}C-labeled protein. 88 % of backbone H^{N}, N, C^{α}, C' and the large majority of side chain nuclei have been assigned. Almost of the unassigned residues are located in the 122-132 segment, which may be poorly structured, undergoing a conformational exchange, as revealed by linewidth increase for residues up- and down-stream of this segment (certainly due to exchange contribution to transverse relaxation). BMRB deposits with accession number 6786.

Biological context

Reactive oxygen species (ROS) are generated by cellular metabolism and involved in various physiological processes as signal transduction or immune response. Upon oxidative stress conditions, methionines (Met) included in proteins, are easily oxidized into Met-(*R*)-SO and Met-(*S*)-SO. In many cases, Met oxidation leads to protein functional alteration. Methionine Sulfoxide Reductases (Msr) are enzymes able to reduce MetSO back to Met. Msr of class A is stereospecific for the *S* absolute configuration of MetSO (Moskovitz *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002). The *E. coli* MsrA exhibits an original catalytic mechanism in three steps involving three cysteine residues (Boschi-Muller *et al.*, 2000). First, the attack of the catalytic cysteine (Cys_{51}) on the sulfoxide function of MetSO leads to the formation of a sulfenic acid intermediate and the liberation of one mole of Met per mole of enzyme. Then, two successive intra disulfide bonds are

formed, first between Cys_{51} and Cys_{198}, and after, between Cys_{198} and Cys_{206}. The last step consists of reducing the Cys_{198}-Cys_{206} disulfide bond by thioredoxin. As shown for the MsrAs which only have the Cys198 as a recycling cysteine, the Cys_{51}-Cys_{198} disulfide bond in a *E. coli* MsrA in which the C206 has been replaced, is also efficiently reduced by Trx as the Cys_{198}-Cys_{206} disulfide bond is in the wild type (unpublished results). In a first approach, we recently reported the backbone and side-chain assignment of the reduced form of MsrA from *E. coli* (Coudevylle *et al.*, 2004). We now report the nearly complete backbone and side-chain assignment of the first oxidized form occurring in the catalytic cycle and containing the Cys_{51}-Cys_{198} disulfide bond.

Methods and experiments

E. coli MsrA contains four cysteines at positions 51, 86, 198 and 206. C206 was replaced by a serine residue in order to form only the Cys_{51}-Cys_{198} disulfide bond while C86, which is located on the surface of MsrA, was substituted by a serine to avoid any protein aggregation. The C86S/C206S double mutant was obtained by site-directed mutagenesis. The *E. coli* strain used for MsrA production was BL21-DE3 transformed with a plasmidic construction containing the coding sequence under the T7 promoter. ^{15}N and ^{15}N/ ^{13}C samples labeled were prepared by growing cells in a minimal media with ($^{15}NH_4$)Cl as the sole nitrogen source and with glucose, ^{13}C-labeled or not, as the only carbon source. MsrA production was induced at an OD_{600} of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h. for the $^{15}N/^{13}C$ protein and 16 h for the ^{15}N protein. Purification was done as described by Boschi-Muller *et al*. (2000). The oxidation was performed by incubation of the labeled MsrA with excess of MetSO. The sample was then purified by gel filtration. Purity of the oxidized form of the mutant and its molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 1 mM protein concentration (95% H_2O, 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer (pH 7.1). Spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis gradient TXI probe and on a Bruker DRX 800 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels *et al.*, 1995). Backbone $^{1}H^{N}$, ^{15}N, $^{13}C^{\alpha}$, $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C'$, and side chain ^{1}H, ^{13}C resonances were assigned using ^{1}H-^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and HNHA experiments. HCCH-TOCSY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH and ^{15}N-, ^{13}C- 3D NOESY spectra were also recorded with the aim of side-chain assignments.

Extent of assignments and data deposition

The ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum for this oxidized form (Cys_{51}-Cys_{198}) of *E. coli* MsrA is shown in Figure 1. 88% of backbone H^{N}, N, C^{α}, C' and C^{β} nuclei were assigned, as the large majority of the ^{1}H, ^{13}C side-chain nuclei. Almost of the unassigned residues are located in the 122-132 segment, likely poorly structured and undergoing a conformational exchange, as revealed by linewidth increase for residues up and down it (certainly due to exchange contribution to transverse relaxation). Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB-6786 (http://www.bmrb.wisc.edu).

Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Accesses to the Bruker DRX 600 of the SCBIM, Nancy I, and to the Bruker DRX 800 of the ISCN, CNRS, NMR facilities were deeply appreciated.

References

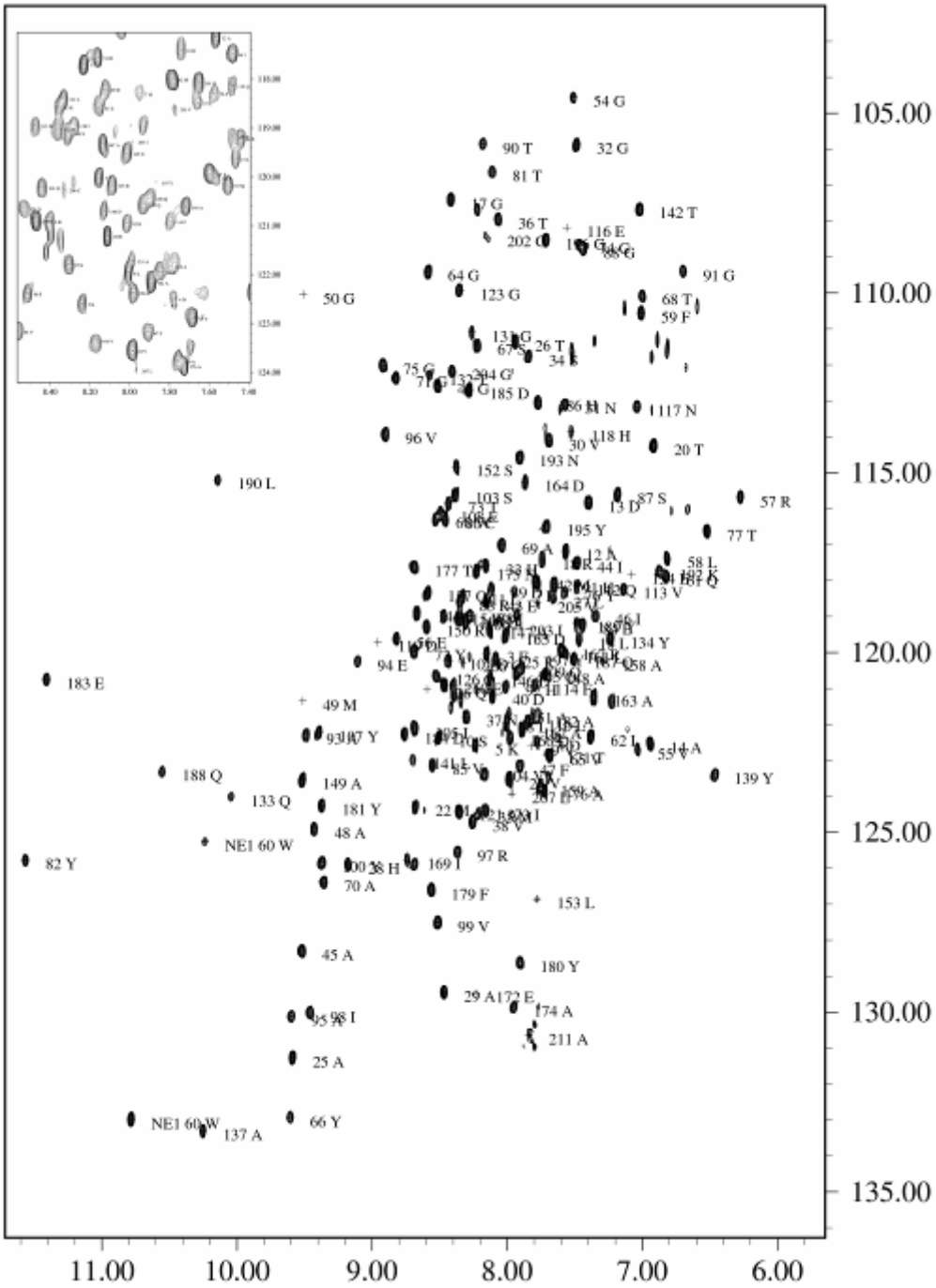
Antoine, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*, *J Biol Chem* **278**, 45352-7.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J Biol Chem* **275**, 35908-13.

Coudevylle, N., Thureau, A., Azza, S., Boshi-Muller, S., Branlant, G., Cung, M. T. (2004) (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.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*, *J Biol Chem* **277**, 12016-22.

Figure 1: 2D ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of ^{15}N labeled oxidized form (Cys_{51}-Cys_{198}) of E. coli MsrA at 600 MHz, 298 K, pH 7.1.



Références bibliographiques

Antoine, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2003) Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from Neisseria meningitidis, *J Biol Chem* ***278***, 45352-7.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. (2001) E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide, *Protein Sci* ***10***, 2272-9.

Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli, *J Biol Chem* ***275***, 35908-13.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2004) Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from Neisseria meningitidis, *Biochemistry* ***43***, 11616-22.

Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A., Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from Neisseria meningitidis, *J Biol Chem* ***277***, 12016-22.

Résumé

Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) sont une famille d'enzymes capables de réduire les méthionines sulfoxydes, générées en condition de stress oxydant, en méthionine. Nous avons entrepris l'étude structurale et dynamique par RMN de la forme réduite et d'une forme oxydée de la Msr de classe A d'*Escherichia coli*. Nous avons ainsi résolu les structures tridimensionnelles en solution de ces deux formes et pu caractériser leur dynamique en solution. Nous avons, de plus, entrepris l'étude du complexe non covalent enzyme/substrat, déterminé les valeurs de K_D locaux, et réalisé l'étude préliminaire de l'intermédiaire acide sulfénique intervenant lors du cycle catalytique. L'ensemble de ces résultats conduit à une meilleure connaissance des déterminants structuraux et dynamiques intervenant lors d'une cycle catalytique de cette classe d'enzyme mais aussi lors de l'interaction avec le substrat (notamment en terme de spécificité) et avec la thiorédoxine.

Abstract

Methionine sulfoxide reductases (Msr) are a class of enzymes able to reduced back methionine sulfoxide, generated during an oxidative stress, to methionine. We performed a structural, dynamical and functional study by NMR of the reduced form and of an oxidized form of *Escherichia coli* MsrA. We solved the solution structures of these two forms and characterized their dynamic in solution. We also studied the non covalent enzyme/substrate complex, in order to determine local K_D values, and made a preliminary study of the sulfenic acid intermediate which occurs in the catalytic cycle. All these results lead to a better knowledge of the structural and dynamical factors involved in the catalytic cycle of this class of enzyme and involved in the interaction with substrate (in specificity terms) and thioredoxin.

Mots clefs : RMN, Msr, methionine sulfoxyde, structure tridimensionnelle des protéines en solution, dynamique des protéines en solution.

Keywords : NMR, Msr, methionine sulfoxide, protein solution structure, protein dynamic.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Eric GUITTET, Directeur de Recherche, ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette

Monsieur Jean Marc LANCELIN, Professeur, Université Claude Bernard, Villeurbanne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur COUDEVYLLE Nicolas

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Etude structurale, dynamique et fonctionnelle par Résonance Magnétique Nucléaire de la Méthionine Sulfoxyde Réductase A d'*Escherichia coli*"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Génie des procédés et des produits »**

Fait à Vandoeuvre, le 23 novembre 2005

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55