



HAL
open science

Mécanisme et spécificité structurale des Méthionine sulfoxyde réductases (Msr) de *Neisseria meningitidis* et rôle du métal dans les MsrB

Alexandre Olry

► **To cite this version:**

Alexandre Olry. Mécanisme et spécificité structurale des Méthionine sulfoxyde réductases (Msr) de *Neisseria meningitidis* et rôle du métal dans les MsrB. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN10004 . tel-01754425

HAL Id: tel-01754425

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754425v1>

Submitted on 30 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Enzymologie Moléculaire

par **Alexandre OLRV**

Mécanisme et spécificité structurale des Méthionine sulfoxyde réductases (Msr) de *Neisseria meningitidis* et rôle du métal dans les MsrB

Soutenue publiquement le 13 Avril 2005

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. B. Friguet	Professeur, Université Denis Diderot, Paris VII
	M. V. Nivière	Directeur de Recherches au CNRS, Grenoble I
Examineurs :	M. M. T. Cung	Directeur de Recherches au CNRS, INPL
	Mme. S. Boschi-Muller	Maître de Conférences, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M. G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Président du jury :	M. J. P. Jacquot	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

J'exprime ma sincère reconnaissance à Mme le Dr. Christiane Branlant, Directeur de l'UMR 7567 CNRS-UHP pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr le Pr. Guy Branlant, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire, qui a dirigé ce travail. Je le remercie pour m'avoir encadré tout au long de ma thèse mais aussi lors de mon D.E.A. Grâce à ses conseils avisés, j'ai pu mener à bien mon projet de la meilleure des manières. Grâce à sa grande culture scientifique, sa curiosité, sa rigueur qu'il m'a en partie transmises je lui suis reconnaissant et je le remercie profondément. Merci pour m'avoir impliqué dans de nombreuses collaborations et m'avoir ainsi permis d'acquérir une culture scientifique très large.

Mes reconnaissances s'adressent également à Mme le Dr. Sandrine Boschi-Muller, Maître de conférences dans l'équipe Enzymologie Moléculaire qui m'a co-encadré depuis mon arrivée au laboratoire. Merci pour son soutien durant ces quatre années passées au laboratoire ainsi que pour ses conseils avisés. Je lui suis très reconnaissant pour son aide quant à la rédaction de mon manuscrit de thèse. Je lui souhaite sincèrement de mener du mieux possible sa carrière scientifique.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. Vincent Nivière, Directeur de Recherches au CNRS et au Pr. Bertrand Friguet qui me font l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs. Merci également au Dr. Mahn Thong Cung, Directeur de Recherches au CNRS et au Pr. Jean-Pierre Jacquot d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Merci à toutes les personnes qui ont collaboré sur ma thématique et partagé avec moi de nombreuses discussions scientifiques enrichissantes: Mr le Pr. Daniel Burnel du laboratoire de Toxicologie des Métaux, UHP Nancy I; Guillaume Chevreux et le Dr. Sarah Sanglier du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique UMR 7509 CNRS-ULP, Strasbourg; le Dr. Brice Kauffmann, le Dr. Frédérique tête-Favier et Moutsé Rainaivoson de l'équipe Bio-Cristallographie UMR 7036 CNRS-UHP, Nancy I; le Dr. Benjamin Ezraty et Julia Bos du Laboratoire de Chimie Bactérienne UPR-CNRS 9043, Marseille; le Dr. Bulent Balta du Laboratoire de Chimie et Biochimie Théorique UMR 7565 SRSMC, Nancy I.

Je remercie chaleureusement mes amis Aurélien et Nico les deux RMNistes du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR 7568 CNRS-INPL, ENSIC. Je n'oublierai jamais toute l'amitié qu'ils m'ont donnée en dehors du travail. Des personnes comme eux on en a besoin.

Beaucoup de personnes du laboratoire me sont chères. Je pense en particulier à mes amis Christophe, un mec bien, Séverine toujours à l'écoute, Jimmy le fofou, Fabrice.

Je n'oublie pas non plus les nombreuses autres personnes que j'estime beaucoup : Jacky la plus gentille des mamans, les 2 François, Fred le samouraï, Arnaud, Christophe J, Denise, Corinne, Benoit, Seve, Karine, Bruno, Alex K Seb, Val,

Antoine, Florence, Xav et Xav, Allan, Houda, Mathias, Adeline, Athanase, Virginie, Fabrice, Lionel, Sophie, Hong et Junzhu...

Merci à tous mes amis de l'ENSAIA: Ben je t'adore, David, Romain, Seb, Sandrine, Reine, Fred le cous je t'accorde une dédicace spéciale pour tous les moments partagés ... pour leurs conseils, leurs encouragements. On en a passé des moments à discuter et à rigoler.

Cette thèse, je la dédie à ma famille que j'adore maman, papa, charly, mon lolo, mes grand-parents. Leur soutien m'a été indispensable, merci pour leurs encouragements, leur écoute.

Voilà maintenant c'est à moi de jouer.... Je pense à tous ceux qui m'estiment pour ce que je suis et qui pensent que je leur ai apporté ne serait-ce qu'un rien.

SOMMAIRE

■ Etude bibliographique

PARTIE I : LES MOLECULES DU STRESS OXYDANT	1
I : Chimie et source cellulaire des FAO	1
I. 1. Le dioxygène (O₂)	1
I. 2. L'oxygène singulet (O₂[*])	3
I. 3. L'ozone (O₃)	4
I. 4. Les produits de réduction du dioxygène	4
I. 4. 1. <u>L'anion superoxyde</u>	5
I. 4. 2. <u>Le peroxyde d'hydrogène</u>	6
I. 4. 3. <u>Le radical hydroxyle</u>	6
I. 5. Les entités nitrées réactives	7
I. 5. 1. <u>L'oxyde nitrique (NO[•])</u>	7
I. 5. 2. <u>Le peroxydinitrite</u>	7
I. 6. Les entités halogénées réactives : les acides hypohalogénés	8
II. Systèmes d'élimination des FAO	9
II. 1. Les systèmes enzymatiques	11
II. 1. 1. <u>Elimination de l'anion superoxyde</u>	11
II. 1. 1. 1. Les superoxyde dismutases	11
II. 1. 1. 2. Les superoxyde réductases (SOR)	13
II. 1. 2. <u>Elimination du peroxyde d'hydrogène : les peroxydases</u>	14
II. 1. 2. 1. Les peroxydases hémiques	14
II. 1. 2. 1. α. <u>Catalase/Catalase peroxydase</u>	14
II. 1. 2. 1. β. <u>Autres peroxydases hémiques</u>	15
II. 1. 2. 2. Les peroxydases non hémiques	16
II. 1. 2. 2. α. <u>Les glutathion peroxydases</u>	16
II. 1. 2. 2. β. <u>Les peroxyrédoxines (Prx)</u>	17
II. 1. 2. 2. γ. <u>NADH peroxydase</u>	18
II. 1. 3. <u>L'oxydase hémique (HO)</u>	20
II. 1. 4. <u>Les protéines de choc thermique (Hsp)</u>	20
II. 1. 5. <u>La thiorédoxine (Trx)</u>	21
II. 1. 6. <u>Régulation intracellulaire de la concentration en fer libre</u>	22
II. 1. 6. 1. Internalisation via les récepteurs à transferrines	22
II. 1. 6. 2. Stockage dans les ferritines	22
II. 2. Les systèmes non enzymatiques	23
II. 2. 1. <u>L'acide α-lipoïque (AL) et l'acide dihydrolipoïque (DHLA)</u>	23
II. 2. 2. <u>Le glutathion (GSH)</u>	24

Sommaire

II. 2. 3. <u>Les vitamines C et E</u>	25
II. 2. 4. <u>Les flavonoïdes</u>	26
II. 2. 5. <u>Les caroténoïdes</u>	27
II. 2. 6. <u>L'ubiquinone (coenzyme Q)</u>	28
III. FAO et Signalisation cellulaire : activation des voies de signalisation <i>via</i> l'oxydation de Cys et la formation de ponts disulfures	29
III. 1. Les systèmes OxyR et SoxR/S chez <i>E. coli</i>	29
III. 1. 1. <u>OxyR</u>	29
III. 1. 2. <u>SoxR/S</u>	30
III. 2. Les protéines phosphatases chez les eucaryotes	30
IV. Action des FAO sur les biomolécules et réparation des dommages causés par les FAO	32
IV. 1. Action sur l'ADN et réparation	32
IV. 2. Action sur les lipides et réparation	32
IV. 3. Action sur les protéines et réparation	33
IV. 3. 1. <u>Altération de la chaîne principale</u>	33
IV. 3. 2. <u>Altération de la chaîne latérale</u>	33
IV. 3. 2. 1. Résidus aliphatiques	33
IV. 3. 2. 2. Résidus aromatiques	34
IV. 3. 2. 3. Résidus soufrés	34
IV. 3. 3. <u>Altération des centres Fe/S</u>	35
IV. 3. 4. <u>Réparation des protéines</u>	36
PARTIE II : Oxydation des Met dans les protéines, conséquences et réparation par les Msr	37
I. Introduction	37
II. Réaction de la Met avec les FAO	38
III. Conséquences de l'oxydation des Met en MetSO dans les protéines	39
III. 1. Première étape vers une voie de dégradation des protéines	39
III. 2. Modulation de la fonction des protéines	41
III. 2. 1. <u>Les canaux ioniques</u>	41
III. 2. 2. <u>L'α-synucléine ; implication dans la maladie de Parkinson</u>	42
III. 2. 3. <u>Les inhibiteurs de protéase</u>	43
III. 2. 4. <u>Autres exemples de modulation de l'activité</u>	43

III. 3. Rôle antioxydant	45
IV. Rôle physiologique des Msr	45
IV. 1. Rôle de réparation et de régulation	46
IV. 1. 1. <u>La protéine ribosomale L12</u>	46
IV. 1. 2. <u>Les canaux ioniques</u>	46
IV. 1. 3. <u>L'apolipoprotéine A-I</u>	46
IV. 1. 4. <u>La protéase de HIV-II</u>	47
IV. 1. 5. <u>Les protéines de choc thermique (Hsp)</u>	47
IV. 1. 6. <u>La protéine Ffh, composante de la particule de reconnaissance SRP</u>	48
IV. 1. 7. <u>L'inhibiteur de protéase plasminogène</u>	48
IV. 1. 8. <u>La protéine chaperone GroEL</u>	49
IV. 2. Résistance au stress oxydant	49
IV. 3. Rôle dans la virulence des bactéries pathogènes	50
IV. 3. 1. <u>Les MsrA : enzymes impliquées dans l'interaction hôte-pathogène ?</u>	50
IV. 3. 2. <u>Rôle dans la résistance à un stress généré par la cellule hôte</u>	51
IV. 4 Implication dans le vieillissement cellulaire et dans les pathologies humaines	52
IV. 4. 1 <u>Les Msr : des enzymes « anti-âge »</u>	52
IV. 4. 2 <u>Les maladies humaines</u>	53
V. Distribution tissulaire et localisation subcellulaire des Msr	54
V. 1. Distribution tissulaire	54
V. 2. Localisation subcellulaire	55
VI. Propriétés des MsrA et des MsrB	57
VI. 1. Spécificité de substrat	57
VI. 2. Mécanisme catalytique	58
VI. 3. Structure tridimensionnelle	58
VI. 3. 1. <u>MsrA</u>	60
VI. 3. 1. <u>MsrB</u>	63
VI. 4. Sous-classes de Msr	66
VI. 4. 1. <u>MsrA</u>	66
VI. 4. 2. <u>MsrB</u>	68
VII. Organisation génomique des Msr	70
VII. 1. Chez les bactéries	70
VII. 2. Chez les <i>archae</i>	71
VII. 3. Chez les eucaryotes	71
■ <u>Objectifs</u>	73

■ Résultats

PARTIE I : Mécanisme catalytique et stéréospécificité des Msr de PilB de <i>N. meningitidis</i>	75
I. Mécanisme catalytique des Msr de <i>N. meningitidis</i>	76
II. Spécificité de substrat des Msr de <i>N. meningitidis</i>	77
III. Publication n° 1	80
PARTIE II : Caractérisation du mécanisme cinétique et des trois étapes du mécanisme catalytique de la MsrB de <i>N. meningitidis</i>	87
I. Le mécanisme cinétique de la MsrB de <i>N. meningitidis</i> est de type ping-pong	87
I. 1. Résultats cinétiques	87
I. 2 Discussion	89
II. Détermination de la vitesse des trois étapes du mécanisme	90
II. 1. Etape 1 de réduction du substrat sulfoxyde	91
II. 2. Etape 2 de formation du pont disulfure Cys117-Cys63	91
II. 3. Etape 3 de réduction du pont disulfure Cys117-Cys63 par la Trx	92
III. Publication n° 2	94
PARTIE III : Acides aminés impliqués dans la première étape du mécanisme catalytique des MsrB	101
I. Détermination des pKa des Cys117 et Cys63 catalytiques dans l'enzyme libre	101
II. Détermination des pK_{app} des résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase	102
III. Conclusion	104
PARTIE IV : Etude de l'interaction MsrB-Trx	105

I. Résultats	107
I. 1. Formation des complexes stables	
MsrBCys117-TrxCys32 et MsrBCys63-TrxCys32	107
I. 2. Formation du complexe stable MsrB sauvage-Trx Cys35Ser	107
I. 3. Analyse des complexes MsrB-TrxCys35Ser	
purifiés par spectrométrie de masse électrospray	108
I. 3. 1. <u>Vérification de la présence du complexe par</u>	
<u>spectrométrie de masse électrospray</u>	
<u>en conditions dénaturantes</u>	109
I. 3. 2. <u>Digestion du complexe MsrB-Trx Cys35Ser</u>	
<u>et analyse par spectrométrie de masse MALDI</u>	110
I. 3. 3. <u>Analyse du complexe MsrB-Trx Cys35Ser</u>	
<u>par spectrométrie de masse électrospray</u>	111
II. Conclusion	111
PARTIE V : Rôle du site à métal dans les MsrB	112
I. Identification du site et de la nature du métal	
dans la MsrB d'<i>E. coli</i>	112
II. Rôle du site à métal dans la MsrB d'<i>E. coli</i>	114
II. 1. Paramètres catalytiques de la MsrB d'<i>E. coli</i>	114
II. 2. Conséquences de l'absence du métal sur les propriétés	
catalytiques de la MsrB d'<i>E. coli</i>	115
II. 3. Conséquences structurales de l'absence du site à métal	
dans la MsrB d'<i>E. coli</i>	117
III. Conséquences de l'introduction des deux signatures CXXC	
dans la MsrB de <i>N. meningitidis</i>	118
III. Conclusion	120
■ <u>Discussion-Perspectives</u>	122
■ <u>Annexes</u>	
<u>Publication n° 3</u>	132
<u>Publication n° 4</u>	135
<u>Publication n° 5</u>	137

Abréviations

<i>A. thaliana</i>	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. Taurus</i>	: <i>Bos taurus</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. chrysanthemii</i>	: <i>Erwinia chrysanthemii</i>
<i>M. smegmatis</i>	: <i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	: <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P. furiosus</i>	: <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>R. capsulatus</i>	: <i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. coelicolor</i>	: <i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. pyogenes</i>	: <i>Streptomyces pyogenes</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>X. campestris</i>	: <i>Xanthomonas campestris</i>
AL	: acide lipoïque
CSAct	: activateur des cérébrosides sulfate
DHLA	: acide dihydrolipoïque
DO	: densité optique
DSC	: calorimétrie différentielle de balayage
DTNB	: dithionitrobenzoate
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: acide éthylène diamide tétraacétique
FAO	: formes activées de l'oxygène
Fe/S	: fer/soufre
FPLC	: chromatographie liquide moyenne pression
GFP	: protéine fluorescente verte
Gpx	: glutathion peroxydase
Grx	: glutarédoxine
GSH	: glutathion (forme réduite)
GSSG	: glutathion (forme oxydée)
hCS	: hormone chorionique somatomamotropine
HDL	: lipoprotéine de haute densité
hGH	: hormone de croissance
HO	: oxydase hémique
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
Hsp	: protéine de stress thermique
IAM	: iodoacétamide
IPTG	: isopropylthiogalactoside
ITC	: calorimétrie de titration isothermique
k_{cat}	: constante catalytique
K_M	: constante de Michaélis
k_{obs}	: constante de vitesse observée

Abréviations

k_{obsmax}	: constante de vitesse observée maximale
K_S	: constante apparente d'affinité
LB	: Luria Bertani
LDL	: lipoprotéine de faible densité
MetSO	: méthionine sulfoxyde
MsrA, B	: méthionine sulfoxyde réductase A et B
NADPH	: nicotinamide dinucléotide phosphate, forme réduite
PAGE	: gel d'électrophorèse en polyacrylamide
2PDS	: 2, 2' dithiopyridine
<i>Pfu</i>	: ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
Prx	: peroxyrédoxine
PTP	: protéine tyrosine phosphatase
qsp	: quantité suffisante pour
RCS	: entité halogénée réactive
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RNS	: entité nitrée réactive
ROS	: entité oxygénée réactive
RX	: rayons X
SDS	: sodium dodécyl sulfate
SOD	: superoxyde dismutase
SOR	: superoxyde réductase
Taq	: ADN polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	: acide trichloroacétique
TFA	: acide trifluoroacétique
TNB-	: thionitrobenzoate
Tris	: N-tris(hydroxyméthyle)éthyle-2-aminométhanesulfonate
Trx	: thiorédoxine
UA	: unité arbitraire

Etude bibliographique

PARTIE I : LES MOLECULES DU STRESS OXYDANT

I : Chimie et source cellulaire des FAO

Dans des conditions physiologiques normales, le métabolisme aérobie produit un grand nombre de formes activées de l'oxygène (FAO) qui peuvent se répartir en trois grandes familles : les entités oxygénées réactives (ROS), les entités nitrées réactives (RNS) et les entités halogénées réactives (RCS) (Tableau 1, p. 2).

Ces entités, en tant qu'oxydant des biomolécules peuvent jouer un rôle de second messager comme H_2O_2 , mais la majorité d'entre elles conduisent à déréguler la fonction des biomolécules qu'elles ont modifiées. Les cellules disposent de nombreux systèmes antioxydants qui permettent d'éliminer les FAO et ainsi de maintenir l'équilibre redox antioxydant/oxydant. On parle de « stress oxydant » lorsque cette balance redox est modifiée en faveur des FAO, suite soit à une surproduction de FAO, soit à une action moins efficace des systèmes antioxydants. Par exemple, un stress oxydant peut survenir suite à une exposition à des rayonnements UV, une réaction immunitaire ou encore suite à une hyperoxie. Il a comme principale conséquence une altération de la viabilité cellulaire. Dans cette partie, seront exposées de façon non exhaustive les propriétés des principales FAO présentes au niveau cellulaire.

I. 1. Le dioxygène (O_2)

La molécule d' O_2 à l'état fondamental est un biradical avec deux électrons non appariés dans une orbitale antiliante sur son orbitale externe. Ceci lui confère un caractère paramagnétique. Le spin des deux électrons célibataires, localisés sur des orbitales distinctes est parallèle. La liaison covalente qui lie les deux atomes d'oxygène est forte ce qui lui confère une bonne stabilité et une faible réactivité. Si une molécule doit réagir avec O_2 dans son état fondamental, il doit y avoir obligatoirement un changement de spin durant la réaction ou alors une déstabilisation de la liaison oxygène-oxygène *via* un apport d'énergie (photonique ou thermique). Par contre même sans apport d'énergie, il existe une probabilité

Entités oxygénées réactives	
- Radicaux	- Non radicaux
Superoxyde $O_2^{\cdot-}$ Hydroxyle OH^{\cdot} Peroxyle RO_2^{\cdot} Alcoxyle RO^{\cdot} Hydroperoxyle HO_2^{\cdot}	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Acide hypochloreux $HOCl \dagger$ Ozone O_3 Oxygène singulet O_2^* Acide hypobromeux $HOBr \dagger$
Entités nitrées réactives	
- Radicaux	- Non radicaux
Oxyde nitrique NO^{\cdot} Dioxyde de nitrogène NO_2^{\cdot}	Acide nitreux HNO_2 Cation nitrosyle NO^+ Anion nitrosyle NO^- Tétroxyde de dinitrogène N_2O_4 Trioxyde de dinitrogène N_2O_3 Peroxynitrite $ONOO^-$ Cation nitronium NO^{2+} Chlorure de nitryle NO_2Cl Alkyl peroxynitrate $ROONO^-$ Anion nitroxyle NO^-
Entités halogénées réactives	
	- Non radicaux
	Acide hypochloreux $HOCl \dagger$ Acide hypobromeux $HOBr \dagger$ Chlorure de nitryle NO_2Cl

Tableau 1 : Principales FAO présentes dans les cellules vivantes. On distingue trois familles de FAO : les entités oxygénées (ROS), nitrées (RNS) ou halogénées (RCS) réactives qui peuvent exister sous forme radicalaire ou non radicalaire.

† : Quelques espèces appartiennent soit aux ROS soit aux RCS (HOCl et HOBr).

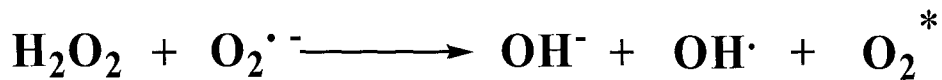
non négligeable pour que la molécule d'oxygène se trouve dans un état excité et que la réaction se produise.

Par contre, si les espèces avec lesquelles O₂ réagit possèdent des électrons célibataires ou peuvent faire une interconversion d'état de spin, alors la restriction de spin n'est plus nécessaire. La plupart de la chimie de O₂ concerne des réactions avec des espèces paramagnétiques, des espèces donneuses d'électrons, la lumière ou les trois combinaisons à la fois.

I. 2. L'oxygène singulet (O₂^{*})

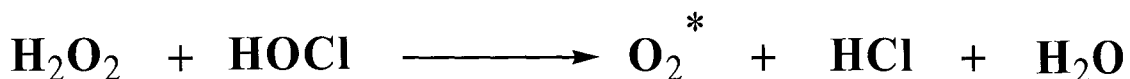
C'est l'état excité de O₂, le plus faible en énergie. Il peut être formé durant le processus de photo-oxydation (Foote *et al.*, 1984). Sa demi-vie pour un état excité est longue : 10⁻⁶-10⁻⁵ seconde. Il est aussi généré durant des processus naturels de peroxydation des lipides (Thom et Elbuken, 1991) ou encore par la réaction de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) *via* la réaction d'Haber-Weiss (Koppenol, 2001, pour revue) :

- Réaction d'Haber-Weiss :



O₂^{*} est également généré durant des processus enzymatiques notamment des processus de peroxydation comme c'est le cas pour la myéloperoxydase (Steinbeck *et al.*, 1992) ou la lactoperoxydase, enzyme présente uniquement dans les cellules phagocytaires (Kanofsky, 1983). O₂^{*} peut également être généré au cours de la réaction catalysée par la xanthine oxydase qui au cours de la réaction enzymatique produit O₂^{•-}. Celui-ci réagit avec H₂O₂ pour former O₂^{*} selon la réaction d'Haber-Weiss décrite ci-dessus.

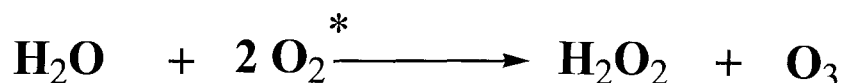
Les concentrations élevées en H₂O₂ et en acide hypochloreux (HOCl), qui est un oxydant puissant produit dans les phagocytes, (voir paragraphe I. 6.) permettent également la formation d'une quantité importante d'O₂^{*} (Noguchi *et al.*, 2002) suivant la réaction ci-dessous :



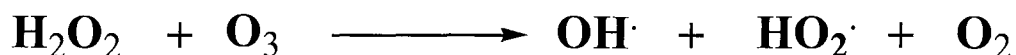
Ce mécanisme est impliqué dans la peroxydation du linoléate (Kellogg et Fridovich, 1975).

I. 3. L'ozone (O₃)

Le trioxygène est principalement connu pour être un produit de l'oxydation photochimique de O₂. Mais il n'est pas présent uniquement dans l'air atmosphérique. En effet, récemment, il a été montré de façon surprenante que la formation de O₃ pouvait être catalysée par des anticorps fabriqués par des leucocytes (Datta *et al.*, 2002; Babior *et al.*, 2003; Wentworth *et al.*, 2003). Cette catalyse implique deux molécules d'O₂* produites par des anticorps des leucocytes et une molécule d'eau pour donner une molécule de O₃.



O₃ est connu pour se décomposer en OH· au contact de H₂O₂ (Datta *et al.*, 2002) selon la réaction ci-dessous :



Cette découverte ouvre une voie nouvelle de recherche sur les mécanisme de défense immunitaire (Marx, 2002; Nieva et Wentworth, 2004).

I. 4. Les produits de réduction du dioxygène

La réduction de O₂ *via* l'apport d'un ou de plusieurs électrons déstabilise la liaison oxygène-oxygène et donne des espèces chimiques beaucoup plus réactives dont la réactivité n'est pas soumise à une restriction de spin (Figure 1, p. 5).

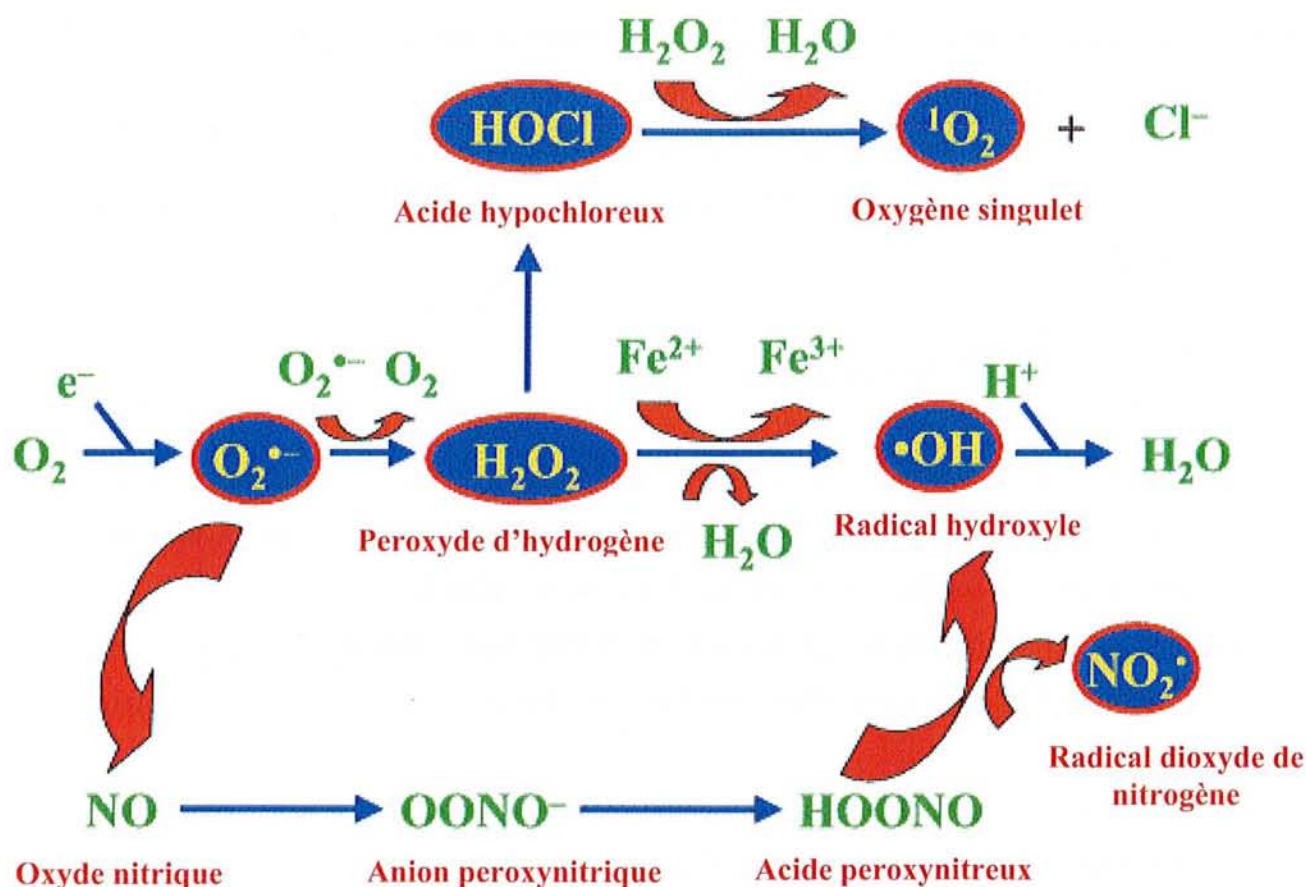


Figure 1 : Schéma des principales FAO présentes dans les cellules et des réactions croisées entre elles (d'après Haddad, 2004).

1. 4. 1 L'anion superoxyde

Le premier produit de réduction de O_2 est $O_2^{\cdot-}$. Sa réactivité est faible et sa charge négative ne lui permet pas de franchir les membranes biologiques.

Les sources d' $O_2^{\cdot-}$ sont très diverses. Il peut être produit dans différents organites intracellulaires comme la mitochondrie, le chloroplaste, les microsomes ou le noyau. Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), la source principale d' $O_2^{\cdot-}$ vient des "fuites" au niveau de la chaîne respiratoire. Deux principaux sites de production membranaires d' $O_2^{\cdot-}$ y ont été identifiés. L'un au niveau du complexe de la NADH déshydrogénase par autooxydation de sa flavine semiquinone, l'autre localisé au niveau du complexe du cytochrome bc1 qui produit de l'ubisemiquinone (Messner et Imlay, 1999). Néanmoins, lors de changements environnementaux, comme le passage d'un environnement anaérobie à aérobie, la source principale d' $O_2^{\cdot-}$ est la fumarate réductase par autooxydation (Messner et Imlay, 2002). Enfin, certaines protéines autooxydables, n'appartenant pas à la chaîne respiratoire, peuvent être la

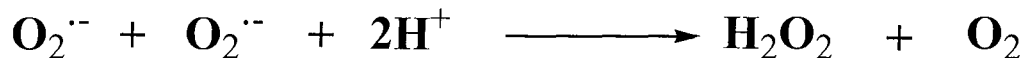
Etude bibliographique

cause de la formation de $O_2^{\cdot -}$ comme la xanthine oxydase (Fridovich, 1970), la ferrédoxine (Misra et Fridovich, 1971) ou l'hémoglobine (Misra et Fridovich, 1972). Il peut également être produit par l'autooxydation de petites molécules non protéiques; la plus connue étant le paraquat, couramment utilisé en laboratoire dans le but de générer un stress oxydant (Hassan et Fridovich, 1979).

I. 4. 2. Le peroxyde d'hydrogène

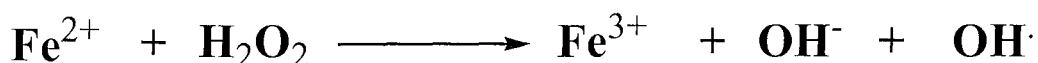
Il est le résultat de la réduction par deux électrons de O_2 . Ses électrons sont appariés. Son absence de charge lui permet de diffuser librement au travers des membranes biologiques, ce qui lui confère des propriétés de messenger secondaire. H_2O_2 a la possibilité par exemple d'intervenir dans la régulation de la prolifération cellulaire (Stone et Collins, 2002). Malgré sa faible réactivité, H_2O_2 constitue une entité impliquée dans de nombreux processus d'oxydation.

H_2O_2 peut provenir enfin de la dismutation spontanée, ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), de $O_2^{\cdot -}$ selon la réaction ci-dessous :



I. 4. 3. Le radical hydroxyle (OH \cdot)

Parmi les FAO, $OH\cdot$ est sûrement le plus réactif de tous. Son action sur les biomolécules se limite à son lieu de formation. Les méthodes permettant de montrer son implication dans un stress oxydant sont indirectes. Ce sont en effet des méthodes de dosage de produits d'oxydation caractéristiques de la présence de ce radical (Cheng *et al.*, 2002). Comme nous l'avons vu précédemment, $OH\cdot$ est produit majoritairement *via* des réactions croisées avec d'autres FAO comme H_2O_2 , O_3 ou $O_2^{\cdot -}$ (voir pages 3 et 4) ou *via* la réaction de Fenton (1876) (Wardman et Candeias, 1996) selon la réaction ci-dessous qui est une source importante de $OH\cdot$:



Il est bien sûr également produit lors des "fuites" de la chaîne respiratoire (Giulivi *et al.*, 1995).

OH[•] agit sur les molécules biologiques suivant trois types de réaction, 1) réactions d'addition conduisant à la formation de bases puriques et pyrimidiques et d'acides aminés aromatiques hydroxylés, 2) arrachement d'un hydrogène et; 3) transfert de son électron non apparié sur d'autres biomolécules conduisant par exemple à la formation du radical peroxy (ROO[•]).

I. 5. Les entités nitrées réactives

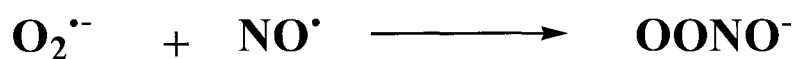
I. 5. 1. L'oxyde nitrique (NO[•])

Il est synthétisé enzymatiquement à partir de l'acide aminé arginine *via* la nitrite oxyde synthase (Bredt et Snyder, 1990), enzyme ubiquitaire présente dans tous les compartiments cellulaires. Il peut réagir avec de nombreuses molécules dont O₂⁻ pour former du peroxy nitrite (ONOOH), et l'oxygène moléculaire pour former de l'acide nitrique (NO₂) et du trioxyde de dinitrogène (N₂O₃) qui sont des agents nitrosant des Tyr et des Trp en particulier (Zhang *et al.*, 1996).

Son absence de charge lui permet de diffuser à travers les membranes biologiques et de jouer un rôle de second messager essentiel en conditions physiologiques normales (Togashi *et al.*, 1992). Sa demi-vie est de 0,1 seconde *in vivo*. Il joue son rôle de second messager par exemple en réagissant de façon réversible avec les cystéines (Cys) pour former des nitrosothiols. Ces derniers sont plus stables que NO[•] et celui-ci pourra donc être transporté par ce mécanisme plus facilement dans un compartiment cellulaire différent (Katsumi *et al.*, 2004).

I. 5. 2. Le peroxy nitrite

ONOOH provient de la réaction chimique entre une molécule de NO[•] et une molécule d'O₂⁻ (Jourdeuil *et al.*, 2001) selon la réaction décrite ci-dessous :



Etude bibliographique

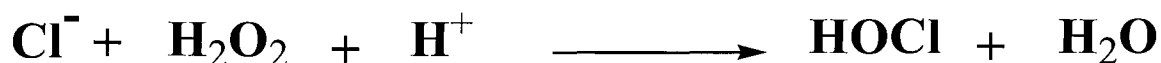
Son pKa est de 6,5-6,8 dans l'eau suivant la concentration en sel. Il peut facilement s'isomériser en nitrate (Crow *et al.*, 1994). ONOO⁻ est assez stable à des pH supérieurs à son pKa. Sous forme protonée, il présente un temps de demi-vie d'une seconde. Il peut se décomposer par homolyse en NO₂ et en OH[·] (Beckman *et al.*, 1990) mais cette réaction bien que démontrée *in vitro* reste encore sujet à controverse sur son existence *in vivo* (Merenyi et Lind, 1998). Sous forme protonée, ONOOH est également un puissant oxydant à un ou deux électrons.

La production de ONOOH dans des conditions physiologiques normales ([NO[·]] = 10⁻⁹ M) est considérée comme inexistante. En effet, la SOD est capable de dismuter une grande partie de O₂⁻ produit dans des conditions physiologiques normales et donc de prévenir la formation de ONOOH. En revanche, quand la concentration en NO[·] et en O₂⁻ est anormalement élevée (10⁻⁶ M) suite à un stress oxydant, la production de ONOOH devient significative.

Les lieux de production de ONOOH sont assez variés. On peut citer les mitochondries où l'action conjuguée de la production d'O₂⁻ et de NO[·] due à la présence de la nitrite oxyde synthase permet sa génération (Boveris *et al.*, 2002). Sa concentration est aussi élevée dans les macrophages (Linares *et al.*, 2001). Le fait que NO[·], dont un des rôles serait celui de second messenger, soit la source de ONOOH suggère un rôle de ONOOH dans de nombreux phénomènes de régulation cellulaire (Uc *et al.*, 2003).

I. 6. Les entités halogénées réactives : les acides hypohalogénés

Les deux entités réactives principales sont HOCl et l'acide hypobromeux (HOBr). Ils sont préférentiellement formés dans les cellules phagocytaires. En effet, la réponse des neutrophiles et des monocytes suite par exemple à une infection bactérienne, génère un grand nombre de FAO et conduit à l'induction de la synthèse de l'enzyme hémique myéloperoxydase. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du chlorure par H₂O₂ selon la réaction ci-dessous pour donner HOCl, un puissant oxydant.



Cet acide possède une telle réactivité que son taux cellulaire ne peut pas être titré directement mais *via* l'utilisation de marqueurs, produits d'oxydation par OH[·]. En effet, il

peut réagir avec $O_2^{\cdot -}$ et conduire à la formation de OH^{\cdot} (Jiang *et al.*, 1997) selon une réaction analogue à celle de Fenton mais ne nécessitant pas la présence de Fe^{2+} (Candeias *et al.*, 1994).



HOCl est utilisé industriellement en tant qu'antimicrobien (King *et al.*, 2004). C'est d'ailleurs l'agent désinfectant le plus employé au monde mais il peut aussi causer des dommages tissulaires. En effet, il est décrit être impliqué dans certaines pathologies comme l'asthme et l'athérosclérose où le taux de myéloperoxydase est anormalement élevé (Hazell *et al.*, 1996; Hazen *et al.*, 1999).

Il est aussi impliqué dans la formation de O_2^* , puissant oxydant (voir page 2) synthétisé enzymatiquement par l'enzyme hémique myéloperoxydase (Kettle et Winterbourn, 1990).

Quand à HOBr, ce dérivé réactif peut être formé dans les cellules phagocytaires *via* l'oxydation du bromure ou alors *via* l'oxydation des amines pour aboutir à la formation de bromamines (Thomas *et al.*, 1995). Il peut également être formé *via* une voie enzymatique comme pour HOCl par la myéloperoxydase ou la peroxydase phagocytaire (Weiss *et al.*, 1986). Ces deux enzymes ont des affinités différentes en fonction de l'halogénure considéré et la formation de l'un ou de l'autre hypohalogénure dépend de leur concentration respective (Henderson *et al.*, 2001). Par exemple, HOBr est préférentiellement formé dans les fluides du fait de la plus faible concentration en chlorure.

II. Systèmes d'élimination des FAO

Les FAO étant produites constamment au cours du métabolisme, les cellules ont élaboré tout un arsenal de molécules permettant de les éliminer et de prévenir leur accumulation. Ces molécules peuvent être de nature non protéique ou protéique (Figure 2, p. 10). Lorsqu'elles sont de nature protéique, leur expression est généralement régulée en fonction de l'état physiologique de la cellule.

- Enzymes :

Les superoxyde dismutases

Les superoxyde réductases

Les peroxydases

Les protéines de stress thermique

L'oxydase hémique

- Molécules non protéiques

de petite taille :

Le glutathion

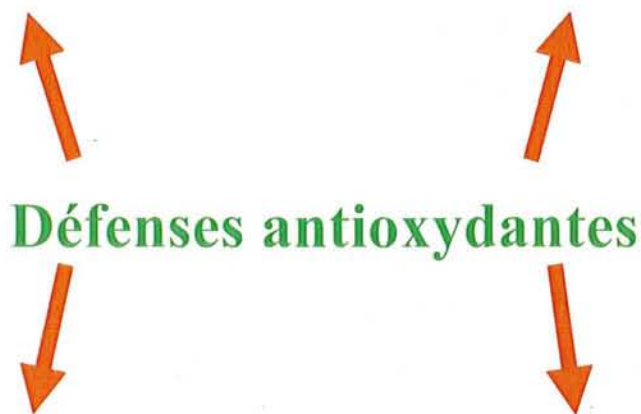
L'acide α -lipoïque

Les vitamines C et E

Les flavonoïdes

Les caroténoïdes

L'ubiquinone



- Protéines de séquestration du

Fer :

Les récepteurs à transferrines

Les ferritines

- Systèmes de réparation des dommages :

- ADN = excision de bases et remplacement

- Lipides = glutathion peroxydases et peroxyrédoxines

- Protéines = thiorédoxine et méthionine sulfoxyde réductases

Figure 2 : Les différentes enzymes, protéines et petites molécules non protéiques impliquées dans la lutte contre le stress oxydant. Les molécules impliquées peuvent, 1) agir directement sur les FAO en les éliminant de manière enzymatique ou non enzymatique, 2) les séquestrer dans des protéines ou; 3) réparer les molécules modifiées.

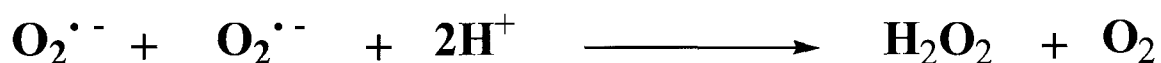
II. 1. Les systèmes enzymatiques

II. 1. 1. Elimination de l'anion superoxyde

II. 1. 1. 1. *Les superoxyde dismutases*

Mann et Keilin en 1939 avaient purifié, à partir d'érythrocytes de bœuf, une protéine de couleur bleue contenant du cuivre qu'ils avaient nommé « hémocupréine » (Mann et Keilin, 1939). L'équipe de Fridovich a montré trente ans plus tard que l'hémocupréine possédait une fonction de SOD et qu'il s'agissait d'une métalloenzyme contenant un centre $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (McCord et Fridovich, 1969).

Les SOD catalysent la réaction de dismutation de $\text{O}_2^{\cdot -}$ en O_2 et en H_2O_2 selon la réaction suivante :



Cette famille d'enzymes peut être divisée en trois classes selon le type de centre métallique présent (Fe^{2+} , Mn^{2+} , $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, Ni^{2+}) et de leur homologie structurale. Ces trois classes diffèrent également entre elles par leur localisation cellulaire.

Les SOD à centre $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ sont la première famille à avoir été caractérisée par l'équipe de Fridovich (McCord et Fridovich, 1969). Sa distribution chez les êtres vivants n'est pas ubiquitaire. La $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD codée par le gène *sodC* est rarement trouvée chez les bactéries, sa présence se limitant aux bactéries gram négatif. Elle est localisée dans le périplasma (Kroll *et al.*, 1995). Elle peut aussi être attachée à la membrane externe comme la $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD de *Mycobacterium tuberculosis*, qui possède un motif d'adhésion aux lipoprotéines (Wu *et al.*, 1998), ou localisée au niveau du stroma et des thylakoïdes des chloroplastes chez les plantes (Jackson *et al.*, 1978). Cela lui confère un rôle de première barrière dans la protection des fonctions membranaires contre les FAO.

Chez les eucaryotes, la $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Weisiger et Fridovich, 1973). Cette activité est impliquée dans la sénescence des cellules de fibroblaste humain et jouerait un rôle de protection contre le vieillissement (Blander *et al.*, 2003). Les SOD à centre $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ne sont pas inductibles en réponse à une hyperoxie (Ho *et al.*, 1996).

Etude bibliographique

Les SOD à centre Fe^{2+} et Mn^{2+} codées respectivement par le gène *sodB* et *sodA* chez *E. coli* ont été découvertes également par l'équipe de Fridovich, respectivement en 1970 et en 1973 chez *E. coli* (Keele *et al.*, 1970; Yost et Fridovich, 1973). Les Fe^{2+} -SOD et les Mn^{2+} -SOD ont été classées dans la même classe uniquement du fait de leur structure tertiaire très proche. Il arrive même que le métal accepté puisse être indifféremment du Fe^{2+} ou du Mn^{2+} sans perturbation de l'activité globale : ce sont les SOD cambialistiques (Martin *et al.*, 1986). La distribution des Fe^{2+} -SOD dans le règne vivant ne semble pas ubiquitaire contrairement à la distribution des Mn^{2+} -SOD. Ainsi, elles ne sont pas présentes chez les cellules eucaryotes hormis chez quelques protozoaires et dans les chloroplastes de plantes (Jackson *et al.*, 1978). Leur localisation subcellulaire est distincte, ce qui assure une protection cellulaire plus efficace. Les Fe^{2+} -SOD sont cytosoliques et proches de la membrane interne, site où environ 60% de O_2^- est produit (Gregroy *et al.*, 1973). Chez les bactéries, les Mn^{2+} -SOD sont localisées dans le cytosol où environ 30% de O_2^- est produit plus spécifiquement proche du nucléoïde afin d'assurer une protection efficace de l'ADN. Chez *E. coli*, la Mn^{2+} -SOD interagit avec l'ADN (Steinman *et al.*, 1994). En effet, elle possède une boucle C-terminale basique qui lui permet de se fixer à l'ADN. Ainsi, une cellule d'*E. coli* n'exprimant plus la Mn^{2+} -SOD assure une protection deux fois moins élevée de son ADN qu'une souche n'exprimant plus de Fe^{2+} -SOD (Hopkin *et al.*, 1992). Chez les eucaryotes, les Mn^{2+} -SOD sont localisées au niveau de la matrice mitochondriale (Weisiger et Fridovich, 1973). Elles y jouent un rôle dans la protection du complexe III de la chaîne respiratoire (Raha *et al.*, 2000). Leur expression semble être régulée par plusieurs facteurs de transcription comme le système SoxR/S que nous détaillerons dans le chapitre III, suite par exemple à une hyperoxie ou une disponibilité en Mn^{2+} (Compan et Touati 1993). Les Mn^{2+} -SOD sont impliquées dans des maladies génétiques comme la maladie d'Huntington (Maier et Chan, 2002).

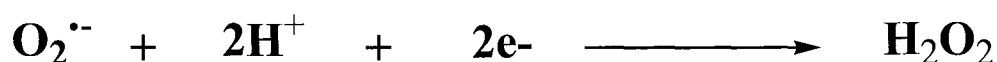
La famille de SOD à centre Ni^{2+} a été mise en évidence plus récemment, en 1996 (Youn *et al.*, 1996) chez l'actinomycète *Streptomyces pyogenes* et *S. coelicolor*. Elle est codée par le gène *sodN* qui est régulé positivement au niveau transcriptionnel par une augmentation du taux de Ni^{2+} dans la cellule (Kim *et al.*, 1998). Une activation par une coupure protéolytique de la pré-protéine est également nécessaire. Activation transcriptionnelle et maturation protéique pourraient être effectuées grâce à la protéine CbiXhp qui contient une région riche en histidine (Kim *et al.*, 2003).

La structure primaire ainsi que tertiaire de cette classe de SOD (Barondeau *et al.*, 2004) est distincte de celle des autres classes. Jusqu'à présent, aucun rôle biologique associé à une quelconque résistance à un stress oxydant n'a été mis en évidence.

II. 1. 1. 2. Les superoxyde réductases (SOR)

Récemment, un nouveau mode d'élimination de $O_2^{\cdot-}$ a été mis en évidence chez les bactéries anaérobies strictes ou microaérophiles : l'activité SOR.

Elle permet la réduction de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 selon la réaction ci-dessous :



L'avantage de ce système est qu'il ne produit pas de O_2 , ce qui pour les bactéries strictement anaérobies est essentiel. D'ailleurs, ces bactéries ne possèdent pas, pour la plupart, de SOD. H_2O_2 est, quant à lui, éliminé par des peroxydases.

La première observation suggérant la présence d'un tel système enzymatique a été faite par l'équipe de Danièle Touati à Paris en 1996 (Pianzola *et al.*, 1996). Leur but était d'isoler un gène codant l'activité SOD dans le but de comprendre la surprenante aérotolérance de quelques bactéries sulfato-réductrices. La complémentation fonctionnelle d'une souche d'*E. coli sod-, rec A-* avec un gène de la bactérie *Desulfoarculus baarsii* les a conduit à isoler le gène codant la rubrédoxine oxydoréductase (Rbo). Cette protéine avait déjà été étudiée par d'autres équipes chez *D. desulfuricans* et *D. vulgaris* sans qu'ils en identifient la fonction. Ils l'avaient nommée désulfoferrodoxine (Moura *et al.*, 1990). Son nom se référait non pas à sa fonction mais à la présence d'un centre ferrique similaire à celui des désulforédoxines (Verhagen *et al.*, 1993). Il a été révélé par la suite que cette Rbo portait une activité SOR (Jenney *et al.*, 1999; Lombard *et al.*, 2000). Cette nouvelle activité est capable de suppléer l'absence d'activité SOD dans une souche d'*E. coli*.

Les Rbo sont des homodimères, structurellement caractérisés. Le monomère est organisé en 2 domaines chacun ayant un centre 1Fe, l'un donneur d'électrons (centre I) et l'autre qui est le domaine catalytique (centre II) et qui possède l'activité SOR (Yeh *et al.*, 2000). Il est à noter que ce centre possède également une activité SOD mais très faible en comparaison de l'activité SOR.

Une autre classe de SOR a également été caractérisée chez la bactérie *Pyrococcus furiosus* et nommée nealarédoxine (Nlx) en référence à sa couleur bleue (Chen *et al.*, 1994). Cette classe diffère de la première par l'absence du centre 1Fe I. Initialement, la Nlx fut identifiée comme présentant une activité SOD (Romao *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999) mais comme pour la classe des Rbo, son activité s'est révélée être principalement de type SOR

Etude bibliographique

(Jovanovic *et al.*, 2000). La Nlx est également une protéine à centre 1Fe. Ce centre Fe/S est identique au centre 1Fe II des Rbo.

Le système donneur d'électrons permettant la régénération de l'activité SOR est composé de la rubrédoxine qui est régénérée par la rubrédoxine réductase (Lee *et al.*, 1998). Il a été montré qu'à la fois la classe des Rbo et celle des Nlx pouvaient être l'accepteur d'électrons respectivement chez *D. vulgaris* (Coulter et Kurtz, 2001) et la bactérie microaérophile *Treponema pallidum* (Auchere *et al.*, 2004). La rubrédoxine est une petite protéine Fe-S ubiquitaire dont l'ensemble des fonctions physiologiques n'a pas encore été identifiée. Son centre Fe/S est composé d'un atome de Fe²⁺ coordonné par quatre Cys.

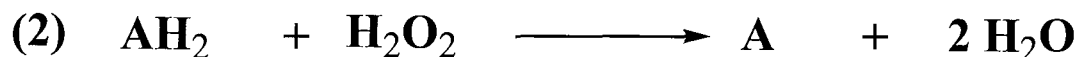
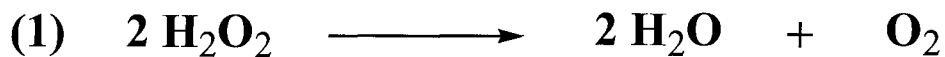
II. 1. 2. Elimination du peroxyde d'hydrogène : les peroxydases

Précédemment, nous avons vu que H₂O₂ était la source de nombreuses autres FAO plus réactives *via* les réactions de Fenton, d'Haber-Weiss ou *via* sa réaction avec O₃. Les cellules ont donc élaboré de nombreuses stratégies en vue de prévenir l'accumulation de H₂O₂.

II. 1. 2. 1. *Les peroxydases hémiques*

II. 1. 2. 1. α. Catalase/catalase peroxydase

Cette enzyme ubiquitaire, qui est la plus étudiée des peroxydases, catalyse la décomposition de H₂O₂ selon 2 modes : le mode catalytique (catalase) selon la réaction 1) et le mode peroxydatique (catalase peroxydase) selon la réaction 2 (AH₂ et A représentent respectivement la forme réduite et oxydée de la catalase) :



Il existe trois familles de catalases : les Mn²⁺-catalases non hémiques qui ont été peu étudiées, les catalases hémiques bifonctionnelles à activité peroxydasique et les catalases hémiques monofonctionnelles ou « vraies » catalases qui sont les mieux caractérisées. Chez *E. coli*, il y a 2 catalases : la catalase bifonctionnelle HPI codée par le gène *katG* et la catalase

monofonctionnelle HPII codée par le gène *katE*. HPII est la catalase principalement synthétisée en phase stationnaire en culture aérobie alors que HPI est exprimée en condition aérobie et anaérobie et sa synthèse est induite à des concentrations sub-létales de H₂O₂ (Loewen *et al.*, 1985).

Chez les eucaryotes, la localisation des catalases est majoritairement dans les peroxysomes, lieu de production intense de H₂O₂ par les oxydases (Van den Bosch *et al.*, 1992). Néanmoins, une petite quantité de catalase est trouvée dans les mitochondries du cœur de rat (Radi *et al.*, 1991). La catalase joue un rôle important dans la résistance au stress oxydant puisqu'il a été montré que sa surexpression rendait les cellules plus résistantes à H₂O₂ et à une hyperoxie (Lindau-Shepard et Shaffer, 1993; Danel *et al.*, 1998). Par contre, des cellules musculaires de l'artère aorte de rats qui surexpriment la catalase présentent une sensibilité accrue à un stress oxydant, un retard de croissance et un taux de mortalité plus élevé par rapport aux cellules parentales. H₂O₂ est connu pour intervenir dans des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire *via* son rôle dans la signalisation cellulaire. La surexpression de l'activité catalase entraînerait donc une perturbation des fonctions cellulaires essentielles (Rodriguez *et al.*, 2000).

Chez l'homme, une déficience en catalase peut causer certaines pathologies comme l'acatalasémie qui correspond à une tendance accrue à la gangrène de la bouche. Ce phénomène est attribué aux dommages causés par la production de H₂O₂ par les bactéries présentes comme les streptocoques, les pneumocoques ou les cellules phagocytaires (Feinstein, 1973).

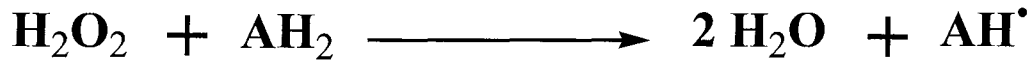
II. 1. 2. 1. β. Autres peroxydases hémiques

La cytochrome c peroxydase : cette peroxydase hémique est retrouvée pour l'ensemble des espèces de levures et dans quelques bactéries. Sa localisation chez la levure se situe au niveau des membranes interne et externe de la mitochondrie, lieu de production d'une quantité importante d'O₂⁻ et qui ne contient ni catalase ni glutathion peroxydase (Gpx). Chez les levures, en particulier chez *S. cerevisiae*, elle est présente dans les peroxysomes ou le cytosol. Cette peroxydase est spécifique de la réduction de H₂O₂. L'atome de fer de l'hème de la peroxydase subit une réduction à un électron et le donneur d'électrons permettant de régénérer l'activité peroxydasique est le cytochrome C.

Etude bibliographique

La Horseradish peroxydase : c'est l'une des peroxydases non spécifiques de H₂O₂ la plus étudiée. Elle est retrouvée dans les racines de la plante horseradish.

La réaction catalysée est la suivante :



AH₂ représente le substrat réducteur qui peut être : des phénols aromatiques, des acides phénoliques, des amines ou des sulfonates.

De nombreux rôles physiologiques ont été attribués à cette peroxydase dans la lignification ou la résistance à une infection, par exemple.

L'ascorbate peroxydase : cette activité est retrouvée de façon abondante dans les tissus photosynthétiques. Plusieurs isoformes se distinguent notamment par leur localisation subcellulaire au niveau du cytosol, des peroxysomes, des mitochondries et des chloroplastes. La réaction catalysée est la suivante :

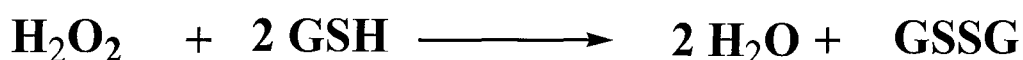


Cette activité a été montrée participer *in vivo* à la résistance au paraquat, molécule génératrice d'O₂^{•-}. En effet, la surexpression de l'activité ascorbate peroxydase thylakoïdale entraîne une résistance trois fois plus élevée au paraquat chez *Arabidopsis thaliana* (Murgia *et al.*, 2004).

II. 1. 2. 2 Les peroxydases non hémiques

II. 1. 2. 2. α. Les glutathion peroxydases

Cette classe de peroxydase retrouvée uniquement chez les eucaryotes supérieurs catalyse la réduction de H₂O₂, d'hydroperoxydes organiques et de lipides en présence de glutathion (GSH) (chapitre II. 2. 1. 1.) comme donneur d'électrons (Flohe *et al.*, 1971; Maiorino *et al.*, 1995) selon la réaction qui suit :

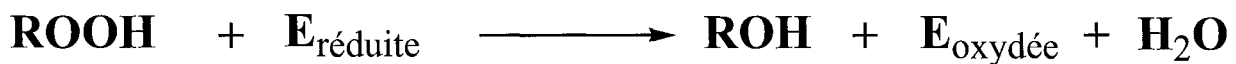


Chez les mammifères, on dénombre 5 isoformes qui se distinguent entre elles par leur spécificité de substrat, leur localisation cellulaire et leur distribution (Ursini *et al.*, 1995). Toutes les Gpx, excepté celles sécrétées dans le milieu extracellulaire, possèdent une sélénocystéine (sélénoCys) catalytique dans leur site actif. Chez les plantes, de nombreuses isoformes de Gpx ont été isolées, similaires à celles de mammifères.

Des études récentes ont montré son implication dans certaines pathologies. En effet, des patients qui possèdent certains allèles de Gpx1 contenant des codons codant une leucine en position 198 ont un risque accru de déclencher un cancer du poumon (Ratnasinghe *et al.*, 2000). Les Gpx sont impliquées dans la résistance au stress oxydant : une corrélation a été montrée sur des rats entre l'expression de la *gpx1* et la résistance à un stress oxydant de cellules neuronales (Barkats *et al.*, 2000). De même, il a été montré qu'une expression plus élevée des Gpx est associée à une capacité des cellules humaines lymphocytaires à maintenir un cycle cellulaire normal pendant un stress oxydant (Bilodeau *et al.*, 2002).

II. 1. 2. 2. β . Les peroxyrédoxines (Prx)

Une classe d'enzyme présente chez les *archaea*, les bactéries et les eucaryotes a été caractérisée : les Prx qui sont capables de participer au mécanisme de détoxification cellulaire *via* la réduction d'hydroperoxydes variés incluant H₂O₂, en alcool et eau correspondant. Cette famille de peroxydase a la particularité d'être non hémique et de catalyser la réaction *via* une Cys catalytique. La réaction catalysée est la suivante :



En fonction du nombre des Cys directement impliquées dans la catalyse, deux classes ont pu être définies : les 1-Cys-Prx et les 2-Cys-Prx (Figure 3, p. 19). Le mécanisme de régénération de l'activité peroxydase varie selon les 2 classes :

Pour les 1-Cys-Prx qui ne possèdent que la Cys catalytique et dans lesquelles l'acide sulfénique s'accumule, le réducteur physiologique serait le GSH (Kang *et al.*, 1998), la Trx (Pedrajas *et al.*, 2000) ou la cyclophiline humaine (Lee *et al.*, 2001).

Etude bibliographique

Pour les 2-Cys-Prx, deux sous-classes peuvent être différenciées : les 2-Cys-Prx atypiques monomériques et les 2-Cys-Prx typiques homodimériques.

Les 2-Cys-Prx typiques sont la sous-classe la plus représentée avec conservation des deux Cys : la Cys catalytique et la Cys de régénération (Hofmann *et al.*, 2002). Cette dernière permet la formation d'un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys catalytique de l'autre monomère. Le donneur d'électrons est généralement la thiorédoxine (Trx) réduite (Netto *et al.*, 1996) (voir le chapitre II. 1. 5. de la partie I de l'Introduction). Le pont disulfure peut être également réduit par AhpF ou la tryparédoxine par exemple (Nogoceke *et al.*, 1997; Poole *et al.*, 2000; Bryk *et al.*, 2002).

La sous-classe 2-Cys-Prx atypique présente le même mécanisme que les 2-Cys-Prx typiques mais cette fois-ci, un pont disulfure intramoléculaire se forme entre la Cys catalytique et celle de régénération. Le système Trx/Trx réductase est le donneur d'électrons (Seo *et al.*, 2000).

Des études réalisées sur les 2-Cys-Prx eucaryotes ont montré que l'intermédiaire acide sulfénique est occasionnellement oxydé en acide sulfinique avant la formation du pont disulfure ce qui conduit à l'inactivation de l'activité peroxydase. Cette oxydation a récemment été montrée être réversée (Chevallet *et al.*, 2003; Rabilloud *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2003) par les enzymes sulfirédoxines et sestrines (Biteau *et al.*, 2003; Budanov *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004). Cette suroxydation et sa réversibilité auraient un rôle dans la régulation de la signalisation cellulaire en permettant de maintenir une concentration minimale en H₂O₂ nécessaire à la transmission du message cellulaire.

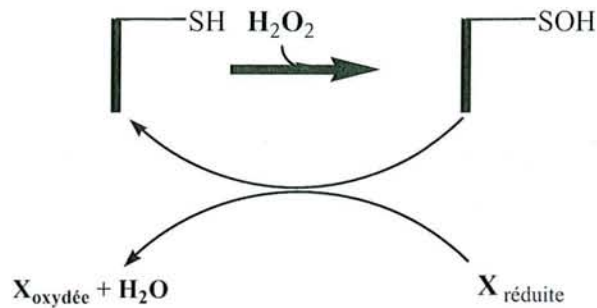
II. 1. 2. 2. γ . NADH peroxydase

C'est une flavoprotéine qui utilise uniquement H₂O₂ pour le convertir en eau et former du NAD oxydé selon la réaction ci-dessous :



Elle est présente dans de nombreuses bactéries et participe à l'élimination de H₂O₂ produit en conditions de stress (Aminova *et al.*, 1991).

1-Cys-Prx



2-Cys-Prx

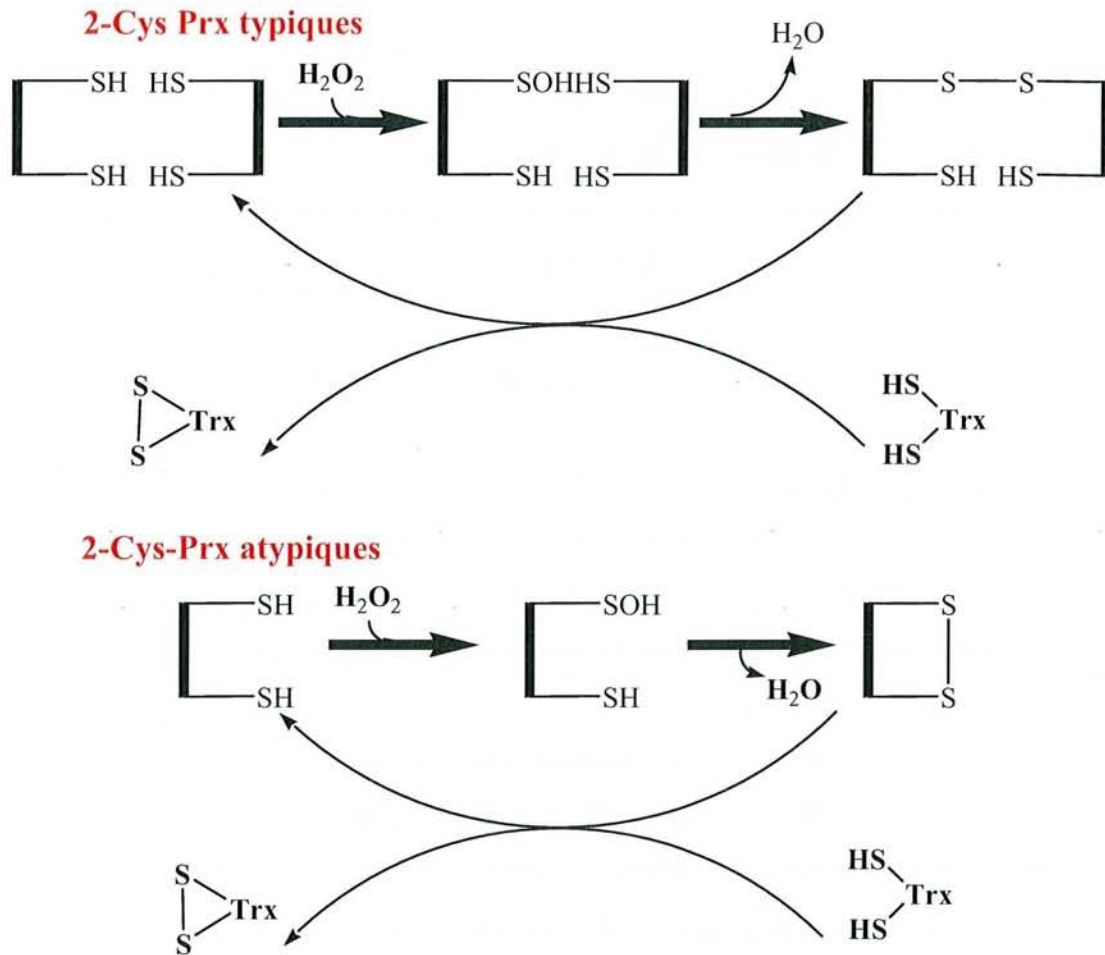


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme des différentes familles de Prx (d'après Kang *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2000). Toutes les Prx comportent une Cys N-terminale conservée transformée en acide sulfénique après réduction de l'hydroperoxyde : la Cys catalytique. Pour les 1-Cys-Prx, une seule Cys catalytique est présente et l'intermédiaire acide sulfénique formé est réduit directement par la Trx, la cyclophiline ou le GSH (X représente le réducteur). Pour les 2 Cys-Prx, la régénération de l'activité peut s'effectuer soit *via* un pont disulfure intermoléculaire (2-Cys-Prx typiques), soit intramoléculaire (2-Cys-Prx atypiques).

II. 1. 3. L'oxydase hémique (HO)

L'HO est une protéine impliquée dans la dégradation de l'hème prostétique. Elle catalyse une série de trois réactions successives, 1) NADPH-cytochrome P450 réductase, 2) HO-1 réductase et; 3) biliverdine réductase qui conduit à la conversion de l'hème en biliverdine IX α . Il existe trois isoformes de HO dont une, la HO-1, a son expression induite par de nombreux composés et notamment des FAO (Abraham *et al.*, 1998). Les métabolites dérivés de l'hème peuvent constituer des produits ayant une fonction antioxydante, anti-inflammatoire, de signalisation ou antiapoptotique (Wagener *et al.*, 2001). En effet, la biliverdine IX α produite par la biliverdine réductase est un précurseur de la bilirubine qui est connue pour être une molécule antioxydante (Stocker *et al.*, 1987).

Ce double rôle vis-à-vis d'un stress oxydant a été démontré, l'absence d'HO-1 conduisant à un stress oxydant et à des complications inflammatoires (Poss et Tonegawa, 1997).

II. 1. 4. Les protéines de choc thermique (Hsp)

En général, les Hsp qui sont des protéines ubiquitaires ont comme fonction de protéger les protéines intracellulaires vis-à-vis d'un stress thermique (Hartl, 1996) (Figure 4, p. 21). Leur synthèse est induite en réponse à un stress thermique ce qui procure ainsi une protection contre un stress oxydant aussi bien chez les bactéries (VanBogelen *et al.*, 1987) que chez les eucaryotes (Mehlen *et al.*, 1995).

Ainsi, l'exposition à des températures élevées de cellules de levures *Schizosaccharomyces pombe* cultivées en conditions aérobies accroît la concentration intracellulaire de FAO (Chen *et al.*, 2003). Ce stress induit la synthèse de Hsp. Chez *E. coli*, les Hsp, IbpA et IbpB, sont impliquées dans la résistance à O₂⁻ généré par un traitement des cellules au paraquat. En effet, une cellule d'*E. coli* surexprimant IbpA et IbpB est non seulement mieux résistante à un stress thermique mais aussi à un stress généré par O₂⁻ (Kitagawa *et al.*, 2000). Au contraire, une cellule n'exprimant plus ces protéines y est plus sensible. H₂O₂ peut également induire fortement la synthèse des Hsp (Godon *et al.*, 1998).

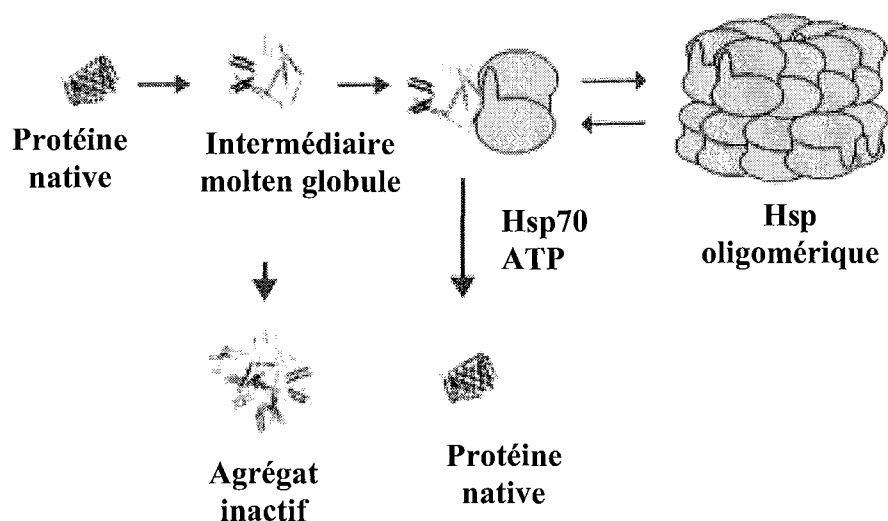


Figure 4 : Schéma simplifié du mécanisme par lequel les Hsp permettent aux protéines sensibles à un stress thermique de retrouver leur conformation active. Suite à un stress oxydant, il peut s'en suivre un déploiement de la protéine. Ce déploiement peut conduire soit à une agrégation soit en présence de Hsp70 à un repliement de celle-ci *via* un système ATP-dépendant (d'après Sundby *et al.*, 2004).

II. 1. 5. La thiorédoxine

L'oxydation des résidus Cys sur les protéines conduit notamment à la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires. La Trx en réduisant les ponts disulfures permet la régénération de l'activité de certaines protéines modifiées par les FAO comme par exemple la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Fernando *et al.*, 1992). Chez *E. coli*, deux types de Trx existent, Trx1 et Trx2, codées respectivement par les gènes *trxA* et *trxC* (Laurent *et al.*, 1964; Miranda-Vizueté *et al.*, 1997). La Trx, de par sa faible spécificité de substrat, agit sur de nombreuses cibles et contribue à la défense contre le stress oxydant. D'autre part, il a été montré que la Trx pouvait agir en tant que peroxydase et réduire H_2O_2 (Nakamura *et al.*, 1994). Elle est elle-même oxydée sous forme de pont disulfure et son activité est régénérée par l'enzyme Trx réductase codée par le gène *trxB* chez *E. coli*.

Ainsi, chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus* qui ne possède que le gène *trxA* codant la Trx1, un stress oxydant induit l'expression du gène *trxA*, le taux d'induction étant en partie fonction de l'oxydant utilisé (Li *et al.*, 2003). Chez l'homme, la Trx1 protège les cellules du cristallin d'un stress oxydant et contribue ainsi au ralentissement de l'apparition de la cataracte (Bhuyan *et al.*, 2002).

II. 1. 6. Régulation intracellulaire de la concentration en fer libre

Parmi tous les métaux présents dans la cellule, le fer est probablement l'élément impliqué dans le plus grand nombre de processus physiologiques comme par exemple sa participation à la formation des centres Fe/S ou encore son rôle de catalyseur dans les centres hème ou de fixation de l'oxygène dans l'hémoglobine. Par contre, sous forme libre sa forme majoritaire est la forme réduite qui comme nous l'avons vu précédemment, *via* la réaction de Fenton, génère OH[•], entité extrêmement réactive. La cellule a donc élaboré différents systèmes permettant de limiter la concentration intracellulaire du fer sous forme libre.

II. 1. 6. 1. Internalisation via les récepteurs à transferrines

Ce récepteur ubiquitaire permet la régulation de l'entrée du fer dans la cellule. Chez les eucaryotes et certaines bactéries pathogènes comme la bactérie *Neisseria meningitidis*, cette glycoprotéine possède une partie localisée à la surface de la cellule. Après ancrage spécifique de la transferrine qui contient un atome de Fe³⁺ à internaliser, une réorganisation conformationnelle provoque le transfert du Fe³⁺ à l'intérieur de la cellule (Oakhill *et al.*, 2002). Pour d'autres bactéries non pathogènes, le fer peut être chélaté par les sidérophores, petites molécules dont la masse n'excède pas 1000 Da et internalisé *via*, comme pour la transferrine, l'interaction avec des récepteurs à sidérophores (Dorsey *et al.*, 2004).

II. 1. 6. 2. Stockage dans les ferritines

Les ferritines sont une famille d'enzymes ubiquitaires composées d'un assemblage de 24 sous-unités identiques formant une structure sphérique de 500 KDa avec une cavité centrale permettant la création d'une sorte de réservoir. Le fer est stocké sous forme ferrihydrite (FeOOH). Une molécule de ferritine peut lier jusqu'à 4500 molécules de fer (Hudson *et al.*, 1993).

II. 2. Les systèmes non enzymatiques

II. 2. 1. L'acide α -lipoïque (AL) et l'acide dihydrolipoïque (DHLA)

L'AL et le DHLA, qui sont des molécules amphipathiques peuvent servir d'antioxydant à la fois dans un milieu hydrophile et lipophile (Figure 5).

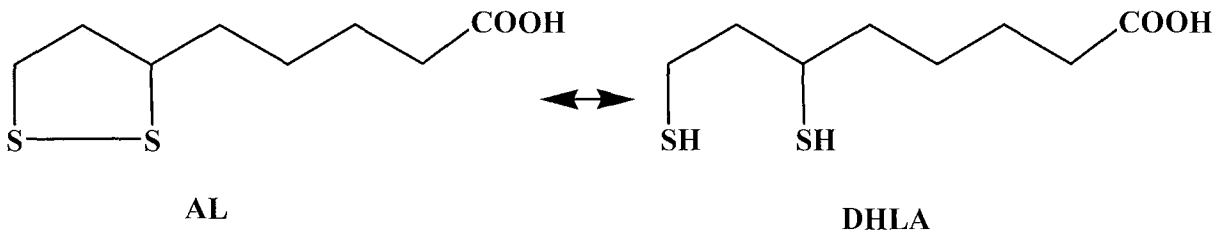


Figure 5 : Structure de l'AL et du DHLA

L'action antioxydante de l'AL permet de piéger OH^\cdot , HOCl et O_2^* (Packer *et al.*, 1995; Matsugo *et al.*, 1996). Il a été également montré former des complexes stables avec des métaux comme Mn^{2+} , Cu^{2+} et $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Deux enzymes sont connues pour réduire l'AL : l'enzyme mitochondriale dihydrolipoamide déshydrogénase et la GSH réductase (Constantinescu *et al.*, 1995). Le rôle antioxydant de l'AL est maintenant bien démontré. Ainsi, la supplémentation d'AL à des êtres humains diminue significativement le taux urinaire de F2-isoprostane, un marqueur de peroxydation des lipides (Marangon *et al.*, 1999).

Le DHLA a lui la capacité de piéger OH^\cdot , HOCl , le radical peroxyde et $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de chélater le Fe^{2+} et le Fe^{3+} (Moini *et al.*, 2002). Hormis son action directe en tant que piégeurs de FAO, le DHLA a la capacité de réduire le GSH oxydé. Ainsi, l'administration de DHLA à des rats permet une augmentation du taux de GSH réduit (Busse *et al.*, 1992). Il a été également démontré *in vitro* une potentialité du DHLA de réduire l'ubiquinone (Kozlov *et al.*, 1999).

II. 2. 2. Le glutathion

Le GSH est le tripeptide ($\gamma\text{Glu-L-Cys-Gly}$) intracellulaire le plus répandu parmi les êtres vivants (Sies, 1999). Sa forme oxydée (GSSG) est également présente. Son action est

polyvalente. Il protège les lipides de la peroxydation et les protéines de l'oxydation et de l'agrégation (Figure 6).

Dans le cœur, organe fortement exposé à un stress oxydant, sa concentration peut atteindre l'ordre du millimolaire. Le GSH agit en tant qu'antioxydant en piégeant les FAO et en détoxifiant les xénobiotiques. Il a aussi une fonction de maintenance du potentiel redox intracellulaire comme cofacteur, régénérant les groupes thiols des protéines, comme par exemple le recyclage des Gpx. D'ailleurs, le rapport GSSG/GSH est un indicateur de l'équilibre redox dans la cellule. Il est également admis que le GSH joue un rôle dans la signalisation cellulaire (Mallery *et al.*, 1993). Enfin, le GSH joue un rôle important dans la réduction du déshydroascorbate (Rose *et al.*, 1995). Dans les cellules eucaryotes, le GSH est présent majoritairement dans le cytosol (90%) mais aussi dans les mitochondries.

In vivo, son action antioxydante a été démontrée par exemple dans des cellules du cœur qui subissent une privation en GSH. Dans ces cellules, on note une diminution de l'activité mitochondriale de production d'ATP. Des études ont montré sur ces cellules que certaines enzymes de la chaîne respiratoire étaient plus sensibles à un stress oxydant (Zhang *et al.*, 1990).

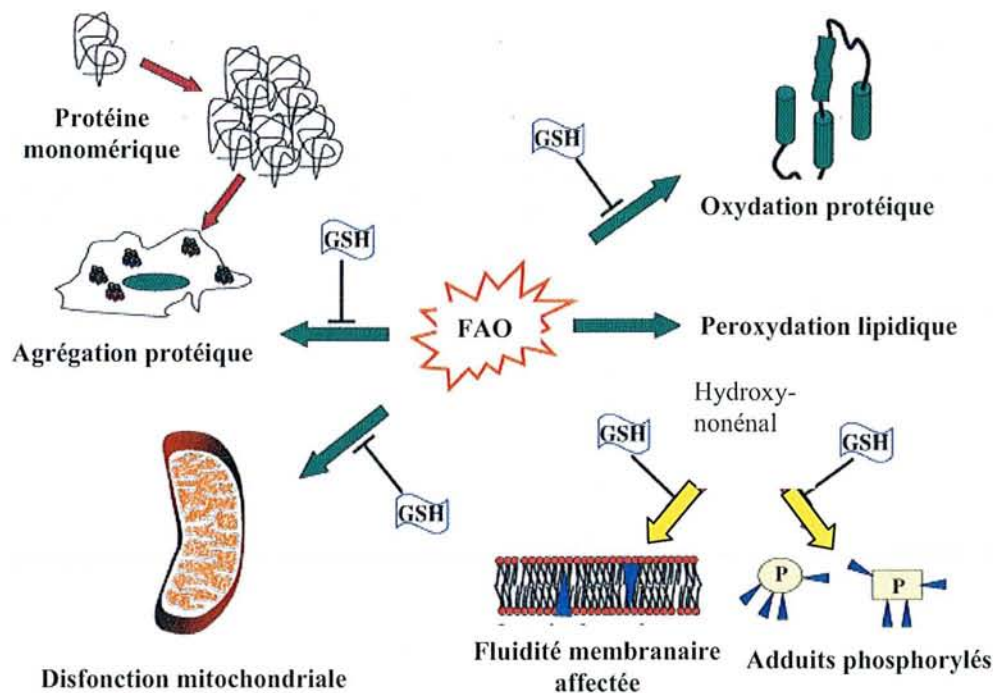


Figure 6 : Rôles attribués au GSH suite à un stress oxydant (d'après Bharath *et al.*, 2002).

II. 2. 3. Les vitamines C et E

La vitamine C possède des propriétés de piègeur des FAO comme OH^\cdot ou O_2^\cdot . La propriété de l'acide ascorbique à réduire le fer ferrique lui vaut des fonctions de pro-oxydant (Bielski *et al.*, 1975) (Figure 7).

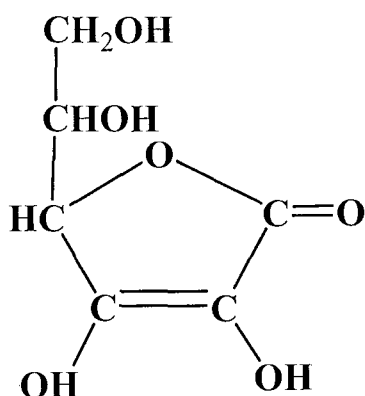


Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique (ou vitamine C)

La vitamine E ou α -tocophérol est un des principaux antioxydants des membranes cellulaires (Niki, 1987) (Figure 8).

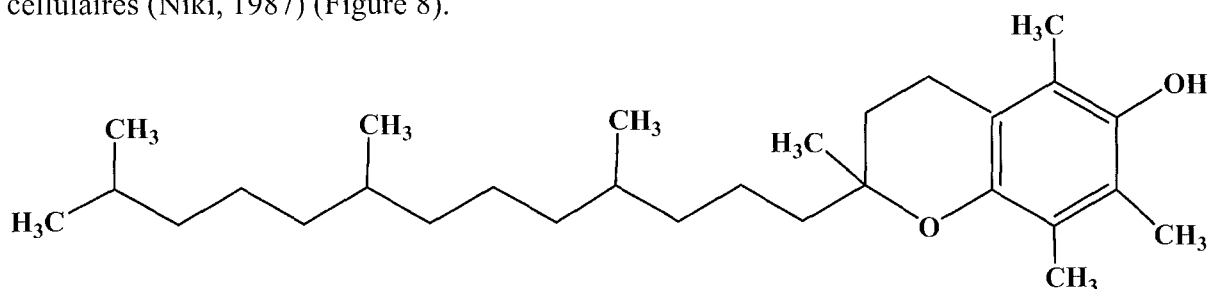


Figure 8 : Structure de la vitamine E

Il agit en tant que piègeur des radicaux peroxydes et prévient ainsi la peroxydation des lipides (Clemens et Waller, 1987). La forme oxydée de l' α -tocophérol peut être régénérée *in vivo* par l'acide ascorbique (Packer *et al.*, 1979). Des études ont montré qu'une supplémentation en α -tocophérol de sujets humains induisait une décroissance du taux de peroxydation plasmatique et des LDL dans des conditions de stress sévère causé par une administration de Cu^{2+} . Au contraire, un stress oxydant modéré et une supplémentation en α -tocophérol de ces mêmes sujets induit une diminution du taux de peroxydation plasmatique uniquement en cas de supplémentation avec de l'acide ascorbique. Ceci montre l'étroite relation entre ces deux molécules (Kontush *et al.*, 1996).

II. 2. 4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une famille de plus de 4000 composés polyphénoliques qui sont présents uniquement dans les végétaux (Figure 9).

Un grand nombre d'études menées *in vitro* ont permis de montrer qu'ils possédaient des propriétés antioxydantes en tant que piègeur de ROS et de RNS (Oldreive *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 1999; Rice-Evans, 2001). Leur mécanisme d'action antioxydante implique le transfert sur l'entité réactive d'un électron ou d'un atome d'hydrogène pour le stabiliser (Rice-Evans et Miller, 1996). Ils possèdent de nombreuses propriétés *in vivo* : anti-allergiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, antimutagènes, anti-carcinogènes (Kandaswami *et al.*, 1992; Galati *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001) et sont impliqués dans la régulation de nombreuses activités enzymatiques (Li *et al.*, 2004).

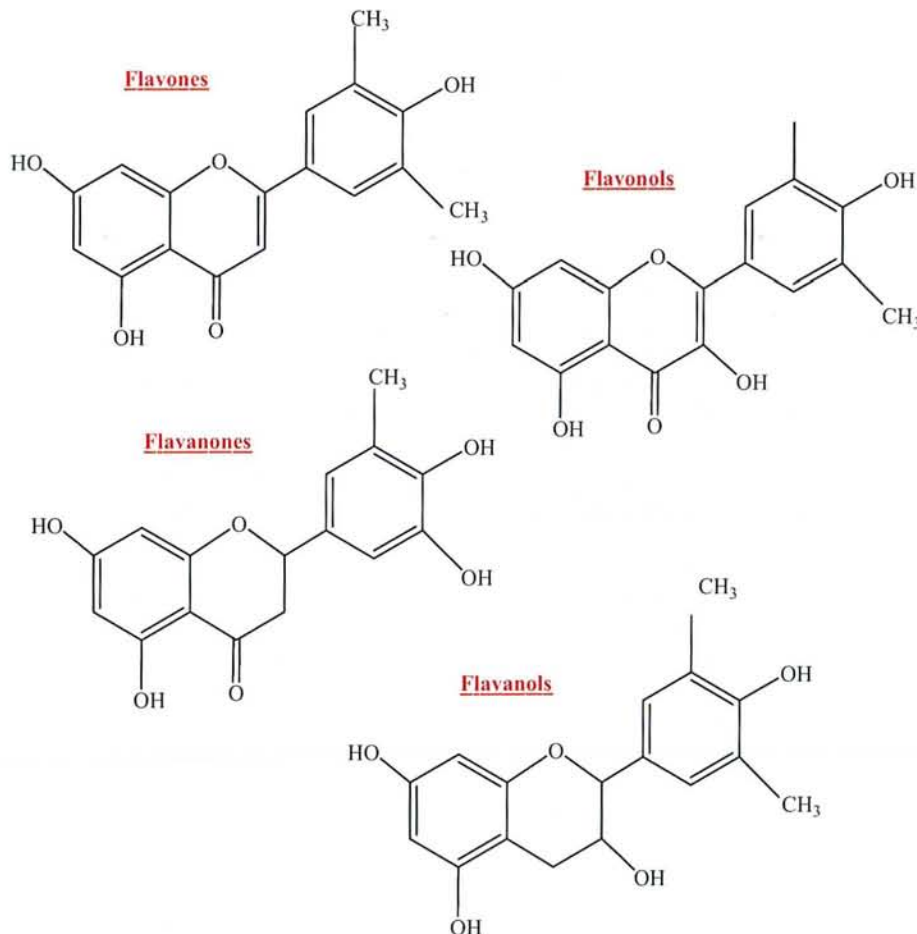


Figure 9 : Structures de base des quatre familles des flavonoïdes (d'après Ren *et al.*, 2003).

II. 2. 5. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une famille de pigments contenant au moins 600 membres retrouvés dans les bactéries, les algues et les champignons et appartenant à la famille des rétinoïdes (Figure 10).

La structure chimique de chaque caroténoïde dérive d'une structure de base : le lycopène formé par l'enchaînement de 8 unités isopréniques. Les caroténoïdes se différencient par leur taux de cyclisation, d'insaturation et d'oxydation. Dans les cellules, les caroténoïdes sont associés aux bicouches lipidiques et sont transportés dans l'organisme par les lipoprotéines (Parker, 1996). Certains caroténoïdes présents chez l'homme, *via* leur apport dans l'alimentation peuvent être métabolisés enzymatiquement pour aboutir à de l'acide rétinoïque (Vitamine A) (Hebuterne *et al.*, 1996). Leur activité antioxydante peut s'expliquer par leurs propriétés à piéger les FAO comme par exemple O_2^* (Montenegro *et al.*, 2002; Cantrell *et al.*, 2003).

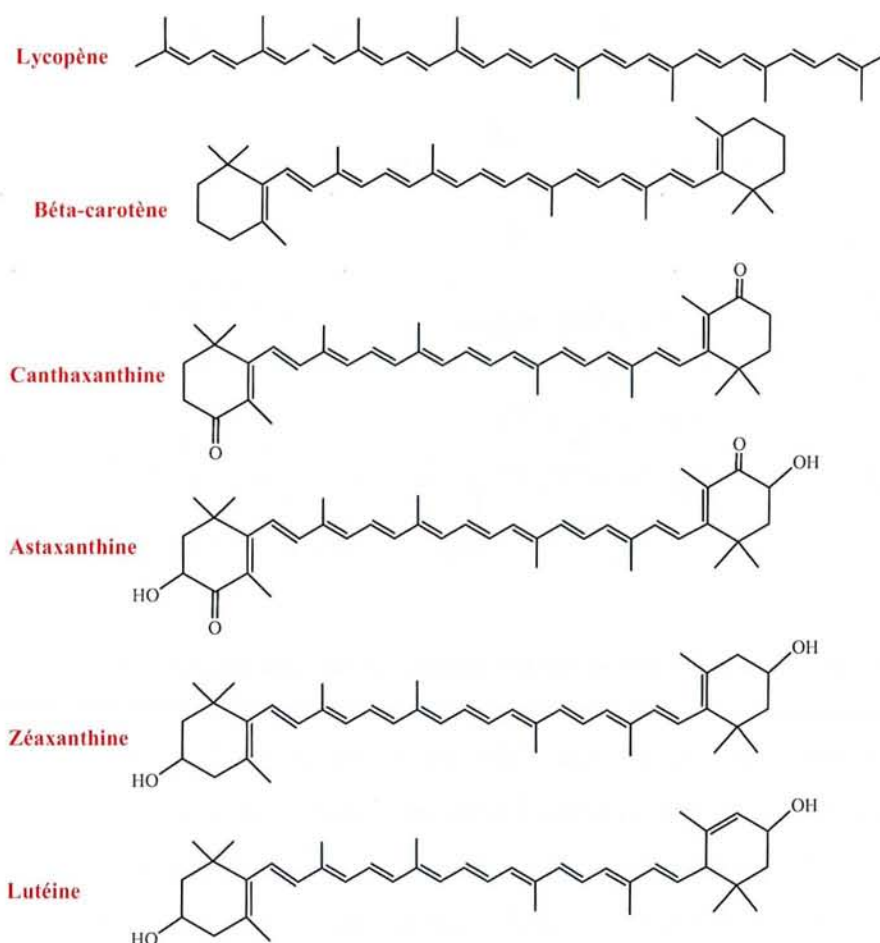


Figure 10 : Structures de différents caroténoïdes (d'après Cantrell *et al.*, 2003).

II. 2. 6. L'ubiquinone (coenzyme Q)

L'ubiquinone est une molécule présente au niveau des membranes cellulaires. On la retrouve au niveau de la membrane interne et externe mitochondriale, des vésicules golgiennes et des membranes lysosomales en grande quantité mais en quantité négligeable au niveau des membranes des particules LDL (Ericsson et Dallner, 1993). Cette distribution inégale suggère un rôle différent selon la membrane concernée (Kalen *et al.*, 1987).

Une de ses fonctions *in vivo* est d'assurer le transfert d'un électron directement à O_2 via l'ubiquinone réduite de manière univalente, ceci participant à la formation d' $O_2^{\cdot-}$ (Figure 11).

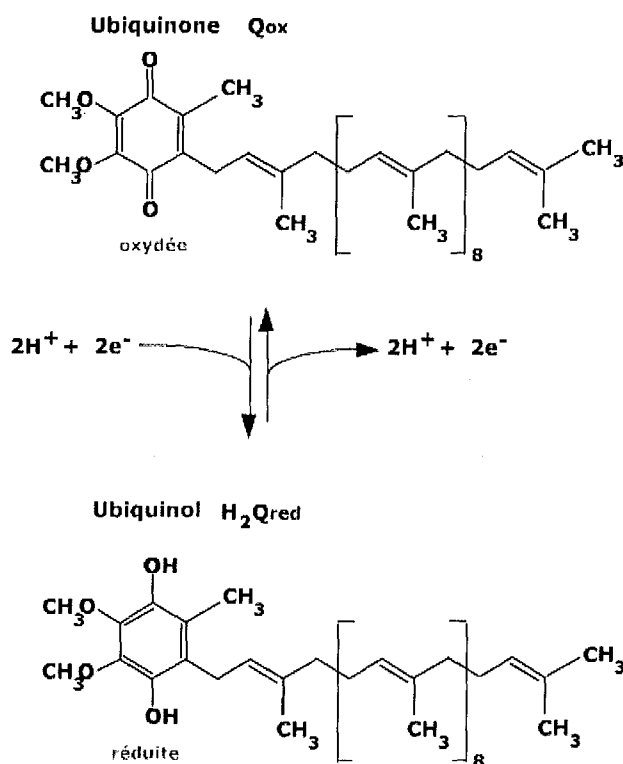


Figure 11 : Structures de l'ubiquinol (forme réduite) et de l'ubiquinone (forme oxydée).

Il a été longtemps suggéré que l'ubiquinone participait à la formation de FAO. Au contraire de cette fonction prooxydante, l'ubiquinone réduite de manière divalente (ubiquinol) est considérée comme antioxydante en contrôlant notamment la peroxydation des lipides, en recyclant l' α -tocophérol en sa forme réduite active (Kagan *et al.*, 1990) et en réduisant l' $O_2^{\cdot-}$ (Nishikimi *et al.*, 1980).

III. FAO et signalisation cellulaire : activation des voies de signalisation *via* l'oxydation de Cys et la formation de ponts disulfures

Il est maintenant, clairement admis que le stress oxydant module fortement de nombreuses voies de signalisation cellulaires et participe à la transduction du signal dans la cellule dans un compartiment donné ou vers d'autres compartiments (Suzuki *et al.*, 1997). Cette transduction du signal procède *via* la modulation par exemple de l'interaction protéine-protéine/ADN/ARN ou la modulation d'une activité enzymatique. Dans cette partie, je ne décrirai que les modèles de senseurs redox les plus étudiés chez les bactéries et chez les eucaryotes.

III. 1. Les systèmes OxyR et SoxR/S chez *E. coli*

Ces deux systèmes principaux de régulation de gènes codant notamment des protéines de résistance à un stress oxydant sont retrouvés uniquement chez les bactéries. Chez les eucaryotes, il n'y a pas d'homologue au système OxyR et SoxR/S.

III. 1. 1. OxyR

Le facteur de transcription OxyR active l'expression de nombreux gènes impliqués dans la défense antioxydante en réponse à une augmentation du taux intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (Christman *et al.*, 1989). Ces gènes sont par exemple *katG* (peroxydase), *ahpCF* (système alkylhydroxyperoxyde réductase), *oxyS* (un ARN régulateur), *dps* (une protéine de liaison à l'ADN), *fur* (un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la teneur en fer), *gorA* (une GSH réductase) et *grxA* (une Grx). Un mutant surexprimant OxyR présente une sensibilité diminuée à H₂O₂ (Christman *et al.*, 1985). Au contraire, une délétion du gène codant OxyR conduit à une sensibilité accrue à H₂O₂.

OxyR possède un motif de liaison à l'ADN et a la capacité d'interagir directement avec l'ARN polymérase. Dans les cellules, OxyR est présent sous deux formes en fonction des conditions physiologiques, oxydée sous forme pont disulfure (Cys199-Cys208) ou réduite. En cas de stress oxydant, il y a formation de pont disulfure et activation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (Figure 12A, p. 31). Le pont disulfure Cys199-Cys208 peut être réduit par le système GSH/Grx1 ou Trx/Trx réductase (Prinz *et al.*, 1997).

III. 1. 2. SoxR/S

Le facteur de transcription SoxR active uniquement le gène *soxS* en réponse à un stress oxydant causé par H_2O_2 , $NO\cdot$ ou $HOCl$. L'élévation du taux de SoxS conduit à l'expression de nombreux gènes comme *sodA* (SOD), *zwf* (glucose-6-phosphate déshydrogénase), *fpr* (NADPH flavodoxine oxydoréductase), *fld1* (flavodoxine 1), *fumc* (fumarase C), *acna* (aconitase), *nfo* (endonucléase IV) et *micf* (un ARN régulateur) (Dempfle, 1996). SoxR est sous forme homodimérique en solution et chaque monomère possède deux centres [2Fe-2S] coordinées par 4 Cys. SoxR a la capacité d'activer la transcription de *soxS* uniquement si le fer contenu dans le centre [2Fe-2S] est oxydé par exemple suite à une exposition à du paraquat ou de la ménadione, générateurs d' $O_2^{\cdot-}$ (Chander et Dempfle 2004) (Figure 12B page 31).

III. 2. Les protéines phosphatases (PTP) chez les eucaryotes

Les PTPs sont une famille d'enzymes importantes dans la transmission du signal de phosphorylation et sont impliquées par exemple dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Van der Geer *et al.*, 1994). La superfamille des PTPs est composée de 70 membres qui possèdent tous en commun un motif CX_5R au sein de leur site actif. La Cys du motif est la cible d'oxydants comme H_2O_2 qui peut l'oxyder en acide sulfénique, conduisant à la formation d'un intermédiaire pont disulfure ou sulfénylamide (Salmeen *et al.*, 2003) ce qui a pour conséquence une perte de leur activité phosphatase. Cette oxydation est réversée par le DTT, le GSH ou la Trx (Lee *et al.*, 1998). En effet, une stimulation de cellules de muscle de rat par le facteur de croissance PDGF conduit à une élévation transitoire de H_2O_2 . La réponse à cette élévation conduit à une phosphorylation des Tyr et une stimulation des protéines kinases. Ce résultat suggère un rôle de H_2O_2 en tant que molécule signal (Sundaresan *et al.*, 1995). Cette Cys peut également former un pont disulfure avec une Cys voisine du monomère résultant également à une perte de l'activité phosphatase (Barrett *et al.*, 1999). C'est le cas notamment de la famille des Cdc25, des PTEN (phosphatase et tensine homologue) et des LMW-PTPs.

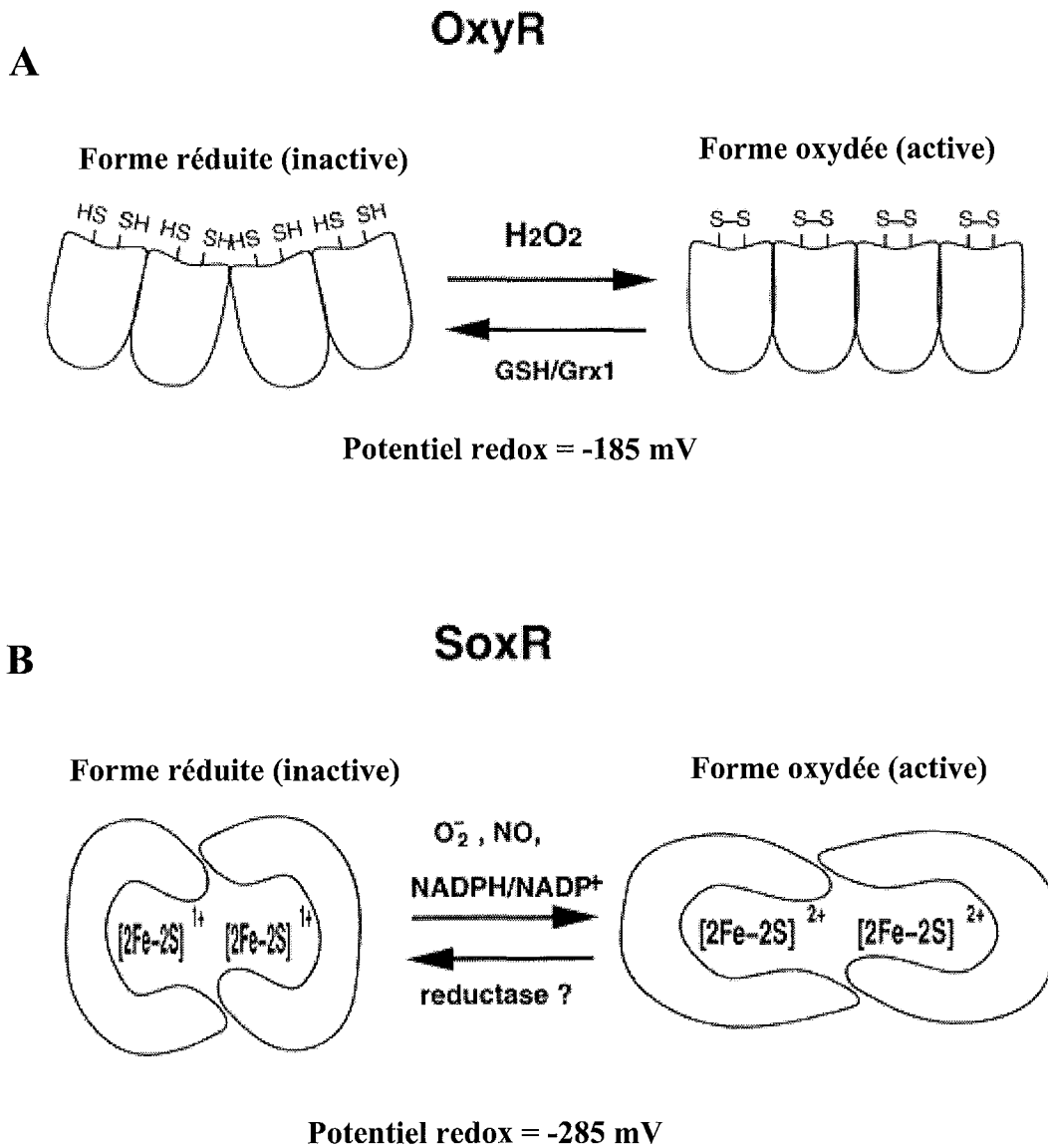


Figure 12 : Modèles d'activation de OxyR et de SoxR chez *E. coli* (d'après Zheng et Storz, 1999).

A) OxyR est une protéine tétramérique qui peut être oxydée sous forme de pont disulfure Cys199-Cys208 par H_2O_2 , de manière réversible. La formation du pont disulfure Cys199-Cys208 conduit à un réarrangement structural. Ce changement structural permet à OxyR d'interagir avec l'ADN et par la suite avec l'ARN polymérase conduisant à l'activation de la transcription.

B) SoxR est une protéine dimérique contenant un centre 2Fe-2S par monomère qui peut être oxydée par O_2^- par exemple. Le changement d'état redox induit une modification conformationnelle significative. Sous forme oxydée, SoxR a la capacité d'interagir avec l'ADN et d'activer la transcription de *soxS*.

IV. Action des FAO sur les biomolécules et réparation des dommages causés par les FAO

Toutes les FAO présentées précédemment peuvent réagir sur les biomolécules incluant les protéines, l'ADN, l'ARN, les lipides et les oses. Leur spécificité d'action est plus ou moins large selon la localisation de leur production, leur réactivité, leur concentration et leur stabilité.

IV. 1. Action sur l'ADN et réparation

Les FAO sont capables de causer une centaine de modifications différentes sur l'ADN. Ainsi, il peut se produire une cassure du brin *via* principalement l'attaque d'un radical sur le désoxyribose mais aussi de nombreuses modifications au niveau des bases puriques ou pyrimidiques et au niveau du ribose. Ces modifications peuvent entraîner la formation de pontages covalents ADN-ADN ou ADN-protéine (Imlay et Linn, 1988). OH[·] est la cause majeure de modification de l'ADN *via* sa réaction par exemple avec le C8 de la guanine pour former de la 8-oxo-guanine (Devasagayam *et al.*, 1991). L'ADN est également la cible de O₂^{*} qui est capable de convertir une guanine en thymine (Ribeiro *et al.*, 1994). La réactivité de HOBr lui permet de modifier un grand nombre de cibles. Par exemple, son action a été démontrée en tant que catalyseur de la bromination des bases nucléiques et de l'ADN double brin de thymus (Shen *et al.*, 2001).

Si l'ensemble de ces modifications n'est pas réparé, cela peut conduire à des mutations de l'ADN. De nombreux systèmes de réparation existent donc. Certains sont plus ou moins spécifiques de lésions faisant suite à un stress oxydant. Le système majeur est le système par excision de nucléotides (BER) dont une des enzymes clés est l'ADN-glycosylase qui clive la lésion N-glycosidique et génère donc un ADN avec un site abasique (Krokan *et al.*, 1997). Le nucléotide peut être directement remplacé après excision de celui-ci ou être remplacé après excision préalable d'un maximum de six nucléotides (Frosina *et al.*, 1996).

IV. 2. Action sur les lipides et réparation

Les lipides hydroperoxydés sont le produit principal d'oxydation des lipides par les FAO et ne concerne bien sûr que les lipides insaturés. Une FAO bien connue pour réagir avec les lipides est O₂^{*}. Il a été montré indirectement que O₂^{*} induit la peroxydation du linoléate,

cette peroxydation étant inhibée *via* l'utilisation du 2,5-diméthylfurane qui est un piègeur de O_2^* (Vargas *et al.*, 1998).

Plusieurs systèmes enzymatiques de réparation des lipides hydroperoxydés existent. Ces systèmes comme nous l'avons vus ne sont pas spécifiques des lipides mais peuvent aussi accepter H_2O_2 comme c'est le cas par exemple pour la famille de peroxydases : Prx ou Gpx. La famille des Gpx présente une certaine spécificité de substrat. Ainsi, la phospholipide hydroperoxyde Gpx réduit préférentiellement des hydroperoxydes de phospholipides alors que la Gpx sécrétée extracellulairement reconnaît plutôt les hydroperoxydes d'acides gras (Maiorino *et al.*, 1990).

IV. 3. Action sur les protéines et réparation

IV. 3. 1. Altération de la chaîne principale

La plupart des réactions sur la chaîne principale d'une protéine implique des FAO radicalaires qui réagissent beaucoup plus efficacement que les espèces non radicalaires. La réaction conduit à l'abstraction d'un atome d'hydrogène au niveau du carbone- α . Ce radical est stabilisé *via* la délocalisation d'électrons du groupement carbonyle et de l'azote voisins. Ce radical peut alors réagir avec, 1) l'oxygène moléculaire pour donner un radical peroxy et conduire à la fragmentation de la protéine (Davies, 1996) ou; 2) un autre carbone radicalaire pour former un pontage covalent intra ou intermoléculaire (Garrison *et al.*, 1962).

IV. 3. 2. Altération de la chaîne latérale

IV. 3. 2. 1. Résidus aliphatiques

Généralement, seules les FAO les plus réactives réagissent avec les résidus aliphatiques. Une des réactions les plus connues est la réaction de HOCl ou HOBr avec les résidus Lys ou Arg pour former les chloramines et les bromamines correspondantes. La SOD à Zn^{2+}/Cu^{2+} peut être ainsi chlorée au niveau de résidus Lys notamment (Auchère et Capeillere-Blandin, 2002). La décomposition de ces espèces réactives conduit à la formation de centres radicalaires nitrés et de groupes carbonyles (Hawkins *et al.*, 2003). Les espèces radicalaires peuvent générer des dimérisation *via* la formation de radicaux thyils (Bump et Brown, 1990), *via* la réaction avec des thiolates et des radicaux peroxydes, ou *via* la réaction

Etude bibliographique

avec l'oxygène moléculaire comme pour les espèces radicalaires formées sur le carbone- α de la chaîne principale.

D'autres acides aminés aliphatiques comme par exemple la Leu, la Val, la Pro ou l'Ile forment également majoritairement des radicaux entraînant les mêmes réactions que précédemment : dimérisation, hydroperoxydation.

IV. 3. 2. 2. Résidus aromatiques

La majorité des réactions des FAO avec les acides aminés aromatiques concerne des réactions d'addition. Par exemple, la Tyr peut être oxydée en radical phénoxy. Ce radical peut réagir avec d'autres espèces radicalaires pour former des pontages covalents intra ou intermoléculaires. Le radical phénoxy peut également réagir avec un atome d'hydrogène provenant d'une molécule donneuse (phénol, thiols, acide ascorbique) conduisant à la réparation de la lésion (Dean *et al.*, 1997). La réaction de la Tyr avec des espèces halogénées comme HOCl ou HOBr engendre la formation de chloroTyr ou de bromoTyr. C'est le cas de l'apolipoprotéine A-I qui est chlorée au niveau d'une de ses Tyr par HOCl (Bergt *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2004). La réaction avec des espèces nitrées peut engendrer la formation de nitrotyrosines. Ainsi, sur la fibronectine, le peroxinitrite par exemple, peut conduire à la formation d'une nitrotyrosine (Sato *et al.*, 2001) ou la formation de dityrosines *via* le passage par le radical phénoxy (Van der Vliet *et al.*, 1994).

Sur les acides aminés Phe et Trp, OH \cdot peut engendrer une hydroxylation (Dizdaroglu et Simic, 1980; Maskos *et al.*, 1992; Maskos *et al.*, 1992). C'est le cas plus particulièrement pour une Phe de l'insuline humaine qui subit une hydroxylation par OH \cdot (Olivares-Corichi *et al.*, 2005). D'autre part, il a été démontré que ONOOH en forte concentration, pouvait nitrer un Trp libre (Alvarez *et al.*, 1996). HOCl peut aussi modifier le résidu Trp comme montré pour le Trp du site actif de la métalloprotéinase-7 (Fu *et al.*, 2003).

IV. 3. 2. 3. Résidus soufrés

La Met et la Cys sont les deux acides aminés les plus sensibles à l'oxydation dans les protéines.

La réaction d'une Cys avec un radical forme un radical thiyl. Ce radical peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical hydroperoxyde ou alors former avec un autre radical Cys un dimère de Cys (cystine) ou avec un autre radical acide aminé par

exemple un autre sous produit (Wardman et von Sonntag, 1995). *In vivo*, un grand nombre de protéines ont été montrées être liées sous forme de pont disulfure intermoléculaire suite à un stress oxydant généré par le diamide (Brennan *et al.*, 2004). En présence de fortes concentrations en FAO, des états d'oxydation supplémentaires peuvent être atteints : acide sulfinique et acide sulfonique. Les résidus Cys peuvent être également nitrés par NO[•] ce qui jouerait un rôle important dans la transduction du signal cellulaire. Il a en effet la capacité de les modifier pour former des S-nitrosothiols (Simon *et al.*, 1993). Ces adduits nitrosylés peuvent se décomposer et redonner NO[•] et le thiol libre en présence de métal ou suite à une photolyse. Ce mécanisme de stockage et de transport jouerait un rôle essentiel en tant que vasodilatateur (Hogg *et al.*, 1996). Comme nous l'avons également vu dans le chapitre II. 2. 1. 1. , la Cys du GSH peut être oxydée et générer un adduit sulfonamide.

En ce qui concerne les résidus Met, la forme majoritaire d'oxydation *in vivo* est la méthionine sulfoxyde (MetSO). *In vitro*, le stade sulfone peut être atteint mais dans des conditions de température élevée et de pH bas. La chimie de l'oxydation des résidus Met ainsi que ses conséquences sur les biomolécules seront détaillées dans la partie II de l'Introduction qui concerne plus particulièrement mon projet de thèse.

IV. 3. 3. Altération des centres Fe/S

L'espèce la plus réactive et la plus spécifique vis-à-vis de la réaction avec les métalloprotéines à centre Fe/S est O₂^{•-}. C'est le cas par exemple de la peptide déformylase, une protéine à centre Fe/S, dans laquelle la réduction à un électron de la molécule d'oxygène conduisant à la formation d'un intermédiaire ferrique et un O₂^{•-} lié à Fe³⁺. O₂^{•-} peut soit diffuser dans le milieu extérieur soit oxyder une Cys coordinatrice du centre Fe/S en acide sulfonique. Il s'en suit une destruction du centre Fe/S et une inactivation irréversible de la peptide déformylase (Figure 13, p. 36) (Rajagopalan et Pei, 1998). O₂^{•-} a la possibilité aussi d'interagir directement avec les centres Fe/S des protéines Fe/S conduisant alors à la réduction de Fe³⁺. Le centre Fe/S de certaines protéines devient ainsi instable et il en résulte une libération de Fe²⁺ toxique dans la cellule. C'est le cas par exemple de la déshydroxy acide déshydratase d'*E. coli* qui pouvait être inactivée *in vitro* par oxydation de son centre [4Fe-4S], ce dernier participant à la catalyse (Flint *et al.*, 1993).

Etude bibliographique

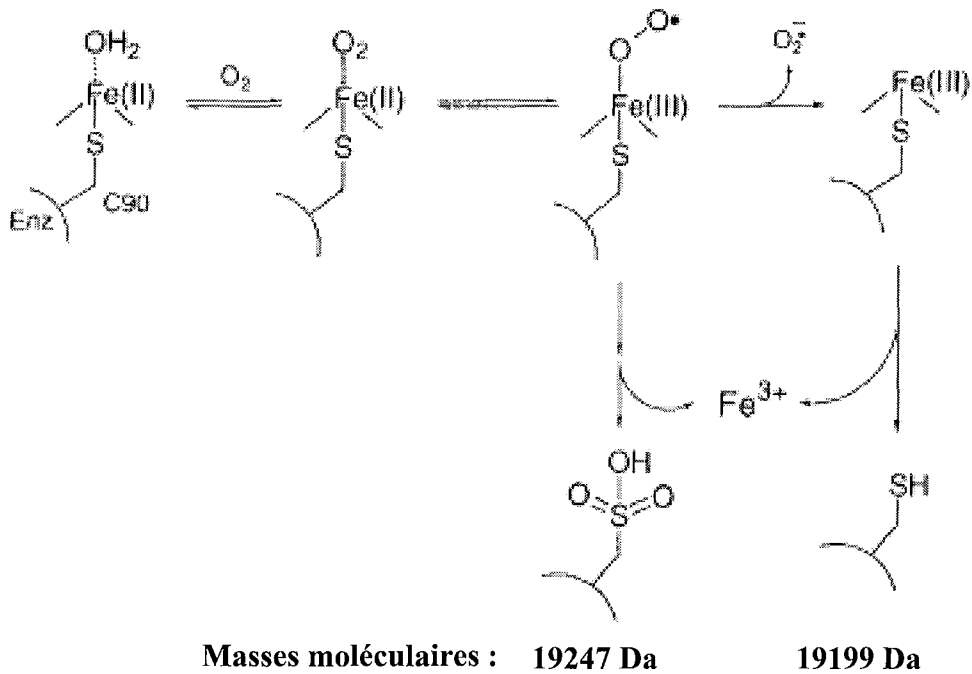


Figure 13 : Mécanisme d'inactivation de la peptide déformylase. La molécule d'oxygène subit une réduction à un électron et conduit à la formation d'un intermédiaire ferrique et un O_2^- lié à Fe^{3+} . O_2^- peut soit diffuser dans le milieu extérieur soit oxyder une Cys coordinatrice du centre Fer-Soufre en acide sulfonique (d'après Rajagopalan et Pei, 1998).

IV. 3. 4. Réparation des protéines

Parmi toutes les modifications des acides aminés citées précédemment, seules deux sont réversibles grâce à deux types d'activité enzymatique :

- l'activité disulfure réductase portée par la Trx, le GSH ou la Grx
- l'activité MetSO réductase (Msr) qui permet de réduire les résidus MetSO en Met, qu'ils soient libres ou intégrés dans une chaîne polypeptidique (Brot *et al.*, 1981). Le

chapitre suivant est consacré aux Msr, enzymes qui font l'objet de mon travail de thèse.

PARTIE II : Oxydation des Met dans les protéines, conséquences et réparation par les Msr

I. Introduction

La première caractérisation d'une activité de réduction des MetSO a été réalisée en utilisant une souche d'*E. coli* auxotrophe pour la Met et pouvant se développer sur un milieu supplémenté en MetSO (Ejiri *et al.*, 1979).

L'oxydation de la Met en MetSO conduit à la formation de deux isomères (*R* et *S*) au niveau de l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde. Ces deux isomères de la MetSO, sous forme libre ou incluse dans les protéines, sont réduits spécifiquement par deux classes d'enzymes structurellement distinctes : la classe des MsrA réduit spécifiquement l'isomère *S* alors que la classe des MsrB réduit spécifiquement l'isomère *R* (Figure 14).

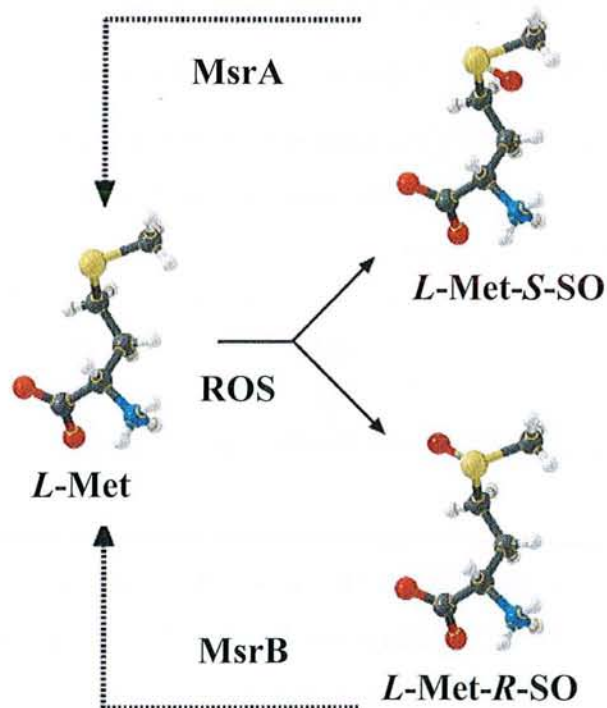


Figure 14 : Représentation schématique de l'oxydation de la L-Met en L-Met-S-SO et en L-Met-R-SO et réduction de ces isomères respectivement par la classe des MsrA et des MsrB.

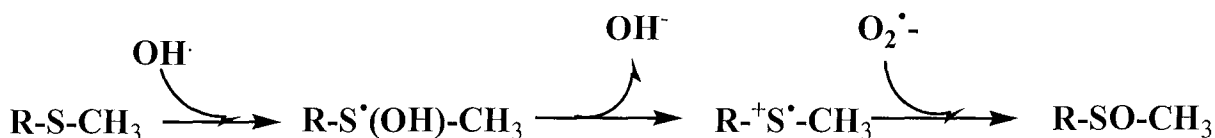
Etude bibliographique

Lorsque j'ai débuté ma thèse au laboratoire, seule la classe des MsrA avait été caractérisée au niveau biochimique, enzymatique et structural. La classe des MsrB, quant à elle, n'a été mise en évidence que fin 2001 par l'équipe du Pr F. Barras du laboratoire de chimie bactérienne UPR 9043-CNRS de Marseille (Grimaud *et al.*, 2001). Il est à noter que d'autres systèmes enzymatiques de réduction de la MetSO ont été caractérisés mais ceux-ci ne réduisent pas les MetSO incluses dans les protéines. Dans ce chapitre consacré aux Msr, je présenterai l'état des connaissances, 1) au niveau de l'oxydation des Met par les FAO, 2) sur les conséquences de l'oxydation *in vitro* au niveau de quelques cibles protéiques et; 3) sur les deux classes de Msr.

II. Réaction de la Met avec les FAO

Le groupement thioéther de la Met est une cible privilégiée de la plupart des FAO qui l'oxydent en MetSO. En fonction de la FAO considérée, la vitesse de la réaction est plus ou moins rapide.

Le mécanisme d'oxydation par OH^\cdot procède comme décrit dans le schéma ci-dessous *via* une réaction d'addition pour donner un intermédiaire radicalaire hydroxy sulfuranyl ($\text{R-S}^\cdot(\text{OH})\text{-CH}_3$). Cet intermédiaire peut conduire à la génération de MetSO. Le mécanisme consiste en l'arrachement de OH^- de l'intermédiaire conduisant à la formation d'un adduit radical cation. Cet adduit peut réagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ pour donner de la MetSO (Hiller *et al.*, 1981; Schoneich *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1998).



L'exposition de la glycophorine à O_3 en solution aqueuse provoque l'oxydation spécifique de résidus Met en MetSO (Banerjee et Mudd, 1992). Le mécanisme de la réaction n'est pas encore élucidé mais pourrait impliquer la formation d'un atome de O_2^* (Kanofsky et Sima, 1991).

ONOOH réagit rapidement avec la Met libre pour donner à la fois de la MetSO et de l'éthylène (Pryor *et al.*, 1994). Ce processus d'oxydation peut s'effectuer suivant 3 voies, 1) décomposition homolytique du ONOOH en OH^\cdot et en NO_2^\cdot puis réaction de ces deux FAO

avec leur cible Met, 2) réaction directe du ONOOH *via* la formation préalable d'un adduit $R-S^+(OH)-R$ et relargage de NO_2^- . Cet adduit se déprotone alors et forme l'adduit sulfoxyde et; 3) addition de l'anion $ONOO^-$ sur l'atome de soufre et décomposition de cette espèce en sulfoxyde. Il est à noter qu'en présence de CO_2 , un adduit $ONOOCO_2^-$ se forme qui peut réagir avec la Met (Tien *et al.*, 1999).

Enfin, de nombreux exemples d'oxydation de protéines par H_2O_2 ont été étudiés (Levine *et al.*, 2000). Cet oxydant, à transfert de deux électrons, conduit à la formation d'un adduit $R-S^+-(OH)-R$ qui se déprotone rapidement pour former l'adduit sulfoxyde.

Des alkylperoxydes peuvent également initier la formation de MetSO dans les protéines comme le tBuOOH (Keck, 1996). Une autre source d'oxydation de la Met dans les protéines peut provenir des peroxydes de lipides (Mohsenin et Gee, 1989).

III. Conséquences de l'oxydation des Met en MetSO dans les protéines

L'oxydation des Met en MetSO constitue un mécanisme de modification post-traductionnel non enzymatique des protéines. Cette modification est décrite comme étant impliquée dans l'étape de reconnaissance des protéines non fonctionnelles à dégrader ou dans des mécanismes de régulation de la fonction de certaines protéines. L'oxydation des résidus Met en MetSO peut également conduire à une modulation voire une perte de la fonction de la protéine. De plus, l'oxydation des résidus Met peut jouer un rôle de protection au niveau cellulaire en piègeant les FAO, diminuant ainsi la concentration intracellulaire de ces entités.

III. 1. Première étape vers une voie de dégradation des protéines

Suite à un stress oxydant, les cellules doivent rétablir l'homéostasie cellulaire en accélérant l'élimination des protéines oxydées : cette élimination est assurée par le système protéasome.

Il existe dans les cellules de mammifères deux voies de dégradation des protéines : la première étant la dégradation par les protéases lysosomales et la deuxième étant la dégradation par les complexes protéasomiques, ces derniers jouant un rôle majeur dans l'élimination des protéines oxydées en conditions de stress (Reinheckel *et al.*, 1998). Deux types de protéasomes sont présents dans les cellules. D'une part, le protéasome 26S, qui est constitué du protéasome 20S et d'un chapeau 19S, reconnaît les protéines endommagées après

Etude bibliographique

ubiquitination de celles-ci et d'autre part le protéasome 20S. Ce dernier est un complexe multiprotéique de 700 KDa avec une cavité interne permettant la séquestration des protéines à protéolyser (Grune *et al.*, 1995). Le protéasome 20S n'utilise pas la voie de l'ubiquitine contrairement au protéasome 26S (Grune *et al.*, 2001) (Figure 15).

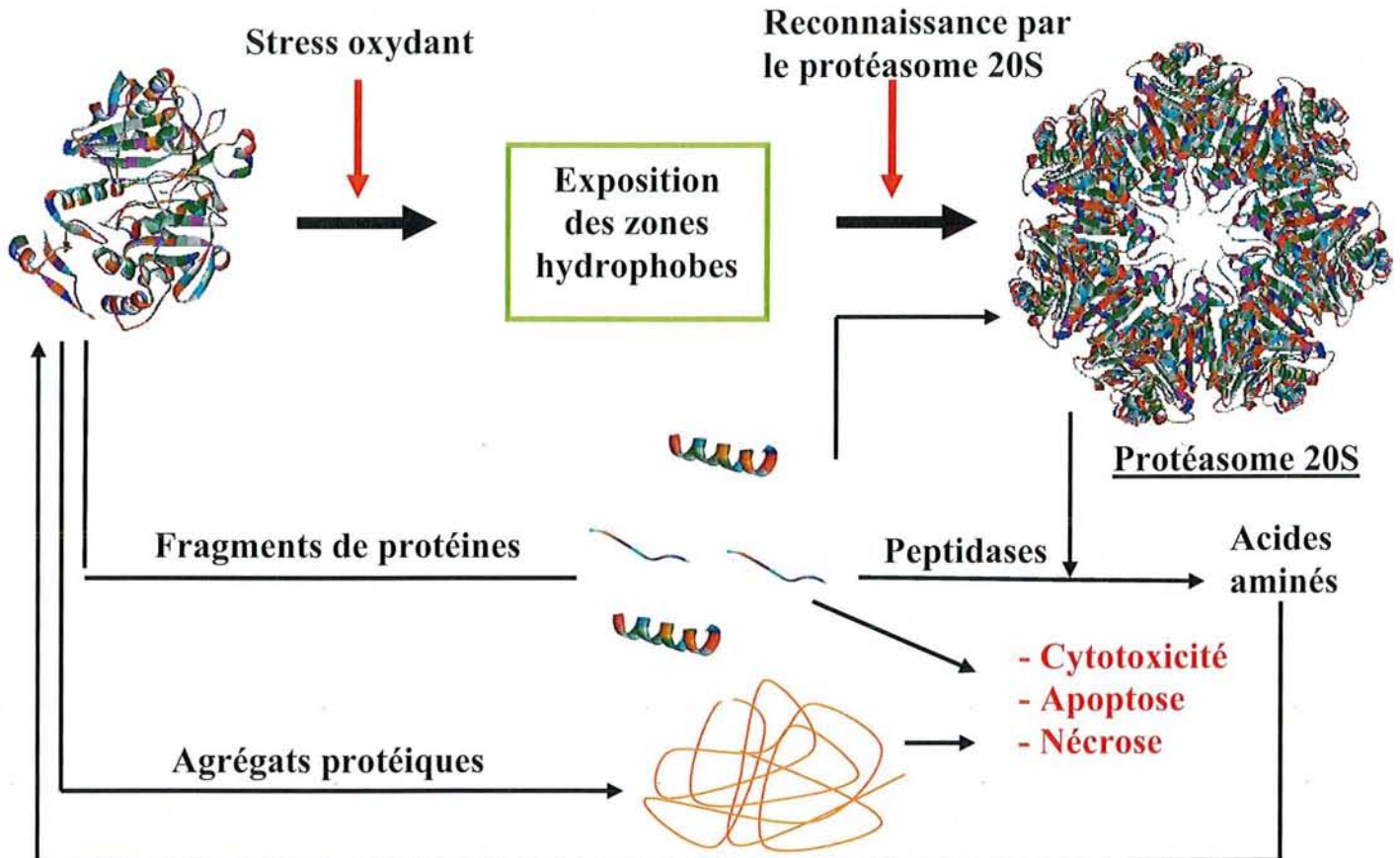


Figure 15 : Représentation schématique de la voie de dégradation par le protéasome 20S de protéines modifiées suite à un stress oxydant. L'oxydation des Met en MetSO peut conduire à une perturbation de la structure tridimensionnelle de la protéine incluant une exposition de ses zones hydrophobes. La protéine modifiée est alors reconnue par le protéasome 20S puis dégradée (d'après Davies, 2001).

La dégradation protéasomique est basée sur une reconnaissance spécifique des zones hydrophobes des protéines. Or, la MetSO, du fait de son caractère plus hydrophile, peut conduire à une modification locale de son environnement, perturber la structure tridimensionnelle de la protéine et induire une augmentation de l'exposition des zones hydrophobes avec comme conséquence une dégradation de la protéine par le protéasome (Giulivi *et al.*, 1994).

Pour la calmoduline, il n'a pas été montré de corrélation entre le changement d'hydrophobicité de la protéine suite à l'oxydation de ses résidus Met et une meilleure reconnaissance par le protéasome 20S. Une dénaturation partielle semble donc être suffisante

pour entraîner la reconnaissance et le clivage par le protéasome dans sa cavité interne (Ferrington *et al.*, 2001).

Un stress oxydant sévère, dû par exemple à une réaction inflammatoire, peut entraîner une agrégation des protéines, qui résistent alors à la protéolyse et se fixent sur le protéasome comme inhibiteur irréversible. Ce mécanisme d'inhibition expliquerait l'accumulation de protéines oxydées observée chez les sujets âgés (Bulteau *et al.*, 2000).

Il est à noter que d'autres systèmes d'élimination des protéines directement liés à un stress oxydant existent (Bota *et al.*, 2002). C'est le cas par exemple de la protéine Lon. Cette protéine ATP-dépendante est une protéase qui dégrade préférentiellement les protéines oxydées (Boches et Goldberg, 1982; Goldberg et Boches, 1982). La protéase Lon pourrait être impliquée dans les processus de vieillissement cellulaire. En effet, le taux d'expression de cette protéase diminue en fonction de l'âge et pourrait être responsable de l'accumulation de protéines oxydées non fonctionnelles dans les cellules (Bota et Davies, 2002).

III. 2. Modulation de la fonction des protéines

L'oxydation d'un ou de plusieurs résidus Met peut entraîner, selon la localisation de ces résidus, une perturbation de la conformation locale d'un site actif ou d'un site de fixation d'un ligand avec comme conséquence possible une modulation de la fonction de la protéine. De nombreuses protéines sont la cible des FAO. Dans ce chapitre, je ne décrirai que les exemples les plus représentatifs de modification de ces protéines *in vitro* qui, pour la plupart, conduisent à des effets majeurs au niveau des fonctions cellulaires.

III. 2. 1. Les canaux ioniques

L'oxydation d'un certain nombre de protéines est corrélée avec une perte de l'homéostasie de calcium. C'est le cas notamment de la calmoduline qui présente au niveau de ses résidus Met (Figure 16, p. 42) un taux anormalement élevé de MetSO chez des rats âgés (Michaelis *et al.*, 1996). La calmoduline joue un rôle dans la transduction du signal cellulaire, notamment dans le cas des canaux à Ca^{2+} voltage-dépendant *via* une interaction directe avec les canaux. L'oxydation de plusieurs résidus Met entraînerait une diminution de sa capacité à activer les ATPases membranaires Ca^{2+} -dépendantes. Cette diminution a été attribuée à une modification de la structure globale de la calmoduline due à la présence de résidus Met

Etude bibliographique

oxydés (Gao *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998). En effet, la calmoduline oxydée se lie toujours fortement au canal mais forme un complexe non productif ne permettant plus à la calmoduline de transmettre son signal cellulaire (Gao *et al.*, 2001).

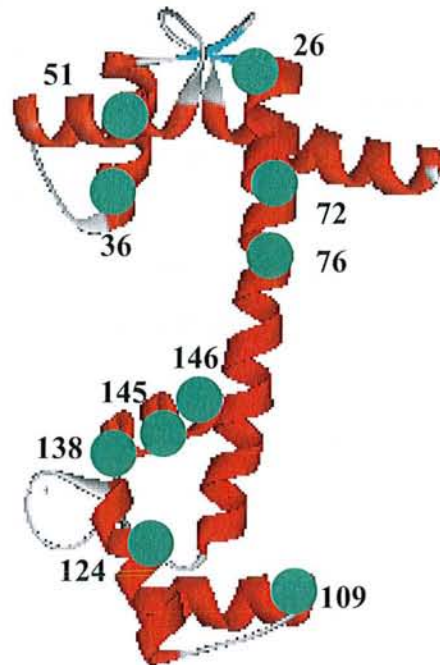


Figure 16 : Structure tridimensionnelle simplifiée de la calmoduline. Les résidus Met oxydables en MetSO sont numérotés (d'après Gao *et al.*, 1998).

Les canaux à K^+ voltage-dépendant s'ouvrent en réponse à une dépolarisation membranaire et jouent des rôles divers comme dans la neurosécrétion (Lingle *et al.*, 1996). Les propriétés d'ouverture/fermeture du canal peuvent être modulées par l'oxydation des résidus Met en MetSO. En effet, Ciorba *et al.* ont montré que l'oxydation du résidu Met3 d'une protéine du canal par NO^* entraîne une diminution de son affinité pour sa protéine inhibitrice et donc conduit à l'activation continue du canal (Ciorba *et al.*, 1999).

III. 2. 2. L' α -synucléine : implication dans la maladie de Parkinson

Les symptômes de la maladie de Parkinson sont associés à des troubles neurodégénératifs et une non maîtrise des mouvements des membres (Goedert, 1997; Goedert, 2001; Goedert, 2001). Une des causes de cette maladie multifactorielle étroitement associée au stress oxydant dans le cerveau est liée à une petite protéine présynaptique de 14KDa :

l' α -synucléine qui est présente *in vitro* sous forme fibrillaire. Sa structure primaire comporte quatre Met qui sont oxydables par H_2O_2 *in vitro*. Les conséquences de cette oxydation *in vitro* sont une inhibition du degré de fibrillation de l' α -synucléine (Yamin *et al.*, 2003) et une agrégation de celle-ci similairement à l' α -synucléine trouvée *in vivo* chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson (Hokenson *et al.*, 2004).

III. 2. 3. Les inhibiteurs de protéase

L' α -2-macroglobuline, antiprotéase homotétramérique, présente une sensibilité à l'oxydation qui se traduit par l'oxydation de plusieurs résidus Met. Huit résidus sont aisément oxydables sans qu'aucune modification de l'état oligomérique ou de l'activité antiprotéase ne soit observée. Par contre, une exposition prolongée à la chloramine oxyde six résidus Met supplémentaires et un résidu Trp conduisant à une dissociation en homodimères oxydés incapables d'assurer une fonction inhibitrice (Reddy *et al.*, 1994).

L'inhibiteur α -2-antiplasmine, l'antithrombine III et l'inhibiteur de protéine C font partie de la famille des inhibiteurs de type SERPIN. Ils inhibent respectivement la plasmine, la thrombine et l'élastase. Leur activité inhibitrice est diminuée suite à l'oxydation d'un ou de plusieurs résidus Met conservé ce qui conduit à une diminution de leur affinité vis-à-vis de leur cible (Stief *et al.*, 1988; Stief et Heimburger, 1988).

III. 2. 4. Autres exemples de modulation de l'activité

L'oxydation *in vitro* d'une Met présente près du site actif de la lipoxgénase de réticulocyte, par autooxydation par le produit de réaction : l'hydroperoxyde d'acide linoléique, conduit à son inactivation (Rapoport *et al.*, 1984).

La protéine HMG-D, composante de la chromatine, joue un rôle dans l'accessibilité de facteurs de transcription à l'ADN. Elle est présente durant la phase embryonnaire chez *Drosophila melanogaster* (Wagner *et al.*, 1992). *In vitro*, après purification en conditions aérobies, HMG-D présente une oxydation au niveau d'un de ses résidus Met qui joue un rôle clef dans l'interaction protéine-ADN. Cette oxydation sélective du résidu Met13 diminue l'affinité de HMG-D pour l'ADN et permettrait *in vivo* la régulation de l'interaction (Dow *et al.*, 1997).

Etude bibliographique

Récemment, il a été montré que l'activateur des cérébrosides sulfates (CSAct), petite glycoprotéine soluble présente une perte de sa fonction activatrice suite à l'oxydation d'un résidu Met *in vitro*. CSAct joue un rôle important dans le métabolisme des sphingolipides et une perte de fonction de cette protéine conduit à une accumulation de sulfatides, composés très toxiques (Whitelegge *et al.*, 2000).

L'hémoglobine est également sensible à une oxydation de ses résidus Met à l'interface entre les sous-unités. Sa conformation est maintenue alors que ses propriétés de fixation de l'oxygène sont altérées. C'est ainsi que la forme oxydée de l'hémoglobine a une affinité plus élevée pour l'oxygène et présente une absence de coopérativité pour la fixation de l'oxygène (Frelinger et Zull, 1984).

Des études menées *in vitro* sur l'hormone de croissance (hGH) et l'hormone chorionique somatomamotropine (hCS) humaines ont été effectuées afin de montrer l'implication de l'oxydation de résidus Met sur la conformation et l'affinité de certains récepteurs des deux hormones. Elles présentent une forte identité au niveau de leur structure primaire. hGH possède trois Met et hCS en possède trois supplémentaires. Toutes les Met ne sont pas oxydables mais celles qui sont exposées sont facilement oxydables. Cette oxydation n'entraîne pas de modification majeure de la conformation des deux hormones. Par contre, alors que l'oxydation de deux résidus Met exposés pour hGH ne diminue pas l'affinité pour le récepteur lactogénique, hCS présente une forte diminution de son affinité pour celui-ci (Teh *et al.*, 1987).

Sur le facteur cellulaire de croissance hsSCF, impliqué dans la maturation des globules rouges, une oxydation *in vitro* des Met par H₂O₂, en conditions acides, provoque une modification locale de la structure avec comme conséquence une inhibition de la dimérisation et une diminution de l'activité biologique de 40 à 60% (Hsu *et al.*, 1996).

La subtilisine subit également l'action des FAO sur ses résidus Met : l'oxydation *in vitro* d'un résidu Met du site actif a comme conséquence une diminution de l'affinité de la protéase pour le substrat (Bott *et al.*, 1988).

III. 3. Rôle antioxydant

Le fait que les résidus Met soient exposés en surface des protéines pourrait permettre leur oxydation sans modification significative de la fonction de la protéine. Dans ce cas, l'oxydation jouerait un rôle en tant que piège des FAO.

Ainsi, l'exposition prolongée de l' α -2-macroglobuline à un environnement oxydant conduit, comme déjà dit p. 43, à l'oxydation en plus de ses résidus Met, d'un de ses résidus Trp et à une perte de son activité antiprotéase. Il a été proposé que certains résidus Met serviraient d'antioxydant, protégeant ainsi le Trp (Reddy *et al.*, 1994).

Les propriétés antioxydantes des résidus Met ont été mises en évidence *in vitro* sur la glutamine synthétase (Levine *et al.*, 1999). Le taux de Met oxydées en MetSO (8 au maximum sur 16 Met) augmente suite à une exposition à des concentrations croissantes de H₂O₂. Malgré cette oxydation, la protéine conserve son activité γ glutamyl transférase, Mn²⁺-dépendante. L'examen de la structure tridimensionnelle montre que les Met oxydables se situent dans une zone exposée autour du site actif et fonctionneraient comme un piège à FAO protégeant les acides aminés sensibles à l'oxydation au niveau du site actif.

Enfin, ce rôle en tant qu'antioxydant a été démontré sur la protéine du prion. La fonction biologique précise de la protéine du prion n'est pas clairement définie hormis son rôle postulé en tant qu'antioxydant ou de transducteur du signal cellulaire. Elle comporte plusieurs Met qui sont aisément oxydables *in vitro* par H₂O₂. Les auteurs postulent un rôle primordial des Met de la protéine du prion en tant que piège des FAO (Wong *et al.*, 1999).

IV. Rôle physiologique des Msr

La MsrA est décrite comme étant impliquée dans la réparation des dommages causés par le stress oxydant, dans des mécanismes de régulation et dans la virulence de bactéries pathogènes.

IV. 1. Rôle de réparation et de régulation

IV. 1. 1. La protéine ribosomale L12

Cette protéine homodimérique ubiquitaire joue un rôle essentiel dans le recrutement des différents facteurs permettant l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction. L'oxydation de trois de ses Met conduit à la dissociation de l'homodimère et provoque une forte diminution de son affinité avec la sous-unité 50S du ribosome, plus précisément avec la protéine L12 (Caldwell *et al.*, 1978). La réparation de L12 oxydée peut être effectuée par la MsrA. La protéine L12 est le premier substrat de la MsrA à avoir été caractérisé (Brot *et al.*, 1981).

IV. 1. 2. Les canaux ioniques

La première étude *in vivo* mettant en évidence le rôle régulateur de la MsrA concerne la modulation de l'inactivation des canaux à K^+ voltage-dépendant *via* la restauration de la capacité du canal à fixer une protéine inhibitrice (Ciorba *et al.*, 1997). Ainsi, le cycle d'oxydation et de réduction physiologique du canal par la MsrA pourrait jouer un rôle important dans la régulation du rythme cardiaque et de l'excitabilité cellulaire et plus généralement dans la transduction du signal cellulaire.

La MsrA interviendrait dans le maintien de la fonction activatrice des ATPases membranaires Ca^{2+} -dépendantes. Ainsi, *in vitro*, l'incubation de la calmoduline oxydée avec la MsrA permet la restauration partielle de la capacité de la calmoduline d'érythrocyte à activer les canaux à Ca^{2+} . Cette réduction enzymatique conduit à une restructuration partielle de la calmoduline (Sun *et al.*, 1999). Cette réactivation partielle de la calmoduline serait due à la réduction uniquement de l'isomère *S* de la MetSO par la MsrA. Les auteurs suggèrent un possible rôle de régulateur de la MsrA dans la fonction de modulation des canaux à Ca^{2+} et plus généralement dans l'homéostasie du Ca^{2+} , dans des conditions de stress.

IV. 1. 3. L'apolipoprotéine A-I

Les lipoprotéines de haute densité (HDL), qui sont impliquées dans le transport du cholestérol, sont trouvées dans le plasma. Le transport du cholestérol extra-hépatique

excédentaire et son acheminement vers le foie afin d'être éliminé, vaut aux HDL des propriétés antiathérogéniques (Jian *et al.*, 1998). Les HDL peuvent également jouer un rôle important dans le transport et l'élimination des lipides oxydés (Bowry *et al.*, 1992). Les HDL sont composées des apolipoprotéines A-I et A-II. L'oxydation spécifique de deux résidus Met sur l'apolipoprotéine A-1, suite à une exposition aux radicaux peroxydes, conduit à une incapacité des lipides à se fixer sur l'apolipoprotéine (Anantharamaiah *et al.*, 1988). L'incubation avec la MsrA permet à l'apolipoprotéine A-I de réverser ces deux modifications et de retrouver ses propriétés de fixation aux lipides et sa fonction de transport du cholestérol (Sigalov et Stern, 2001).

IV. 1. 4. La protéase de HIV-II

Le virus HIV-II code une protéase homodimérique à Asp, essentielle pour la production de virus infectieux. L'exposition de cette protéase *in vitro* à H₂O₂ conduit à l'oxydation de deux Met en MetSO avec comme conséquence une perte d'activité de la protéine. L'activité peut être restaurée à hauteur de 40% après incubation de la protéase oxydée avec la MsrA qui réduit uniquement le résidu MetSO en position 95 localisé à l'interface des deux dimères (Davis *et al.*, 2000). Cette Met, conservée, pourrait être importante dans la régulation de l'activité protéase et donc dans la régulation du cycle infectieux du virus.

IV. 1. 5. Les protéines de choc thermique (Hsp)

Hsp16.3 chez *M. tuberculosis* forme un nonamère composé de trimère de trimère qui est trouvée majoritairement au niveau membranaire et est exprimée durant la phase stationnaire de culture *in vitro*. Lors d'une infection dans un macrophage par exemple, Hsp16.3 est une des protéines exprimée majoritairement. Des études ont montré que l'expression de cette protéine est essentielle à la survie de la bactérie dans la cellule hôte. Chaque monomère contient trois résidus Met qui sont les seuls résidus sensibles à une oxydation par H₂O₂. La sulfoxydation conduit à une forte diminution de son activité chaperone. Ce phénomène est montré être réversé après incubation avec la MsrA (Abulimiti *et al.*, 2003).

Localisée dans les chloroplastes, Hsp21 a la particularité de posséder une extrémité N-terminale riche en résidus Met au niveau d'une hélice- α amphipathique

Etude bibliographique

(Chen et Vierling, 1991) et sensibles à l'oxydation. Cette hélice aurait pour rôle de reconnaître les zones hydrophobes des protéines dénaturées. L'ensemble des résidus Met est aisément oxydable en MetSO. Il s'en suit une perte d'activité chaperone et une modification de la conformation de la protéine (Gustavsson *et al.*, 1999; Harndahl *et al.*, 2001). Cette oxydation est réversée *in vitro* par incubation avec la MsrA. La protéine recouvre alors l'ensemble de ses fonctions physiologiques (Gustavsson *et al.*, 2002).

IV. 1. 6. La protéine Ffh, composante de la particule de reconnaissance SRP

Cette protéine ubiquitaire qui contient un domaine riche en résidus Met (domaine M) fait partie du complexe SRP. Chez *E. coli*, ce complexe est également constitué du petit ARN 4,5S qui contient notamment un site de fixation pour le domaine M. Son rôle cellulaire est de se fixer sur la partie N-terminale des protéines en cours de synthèse au niveau du ribosome. Cette fixation, en synergie avec l'ARN 4,5S permet de décrocher la protéine du ribosome une fois sa synthèse terminée. Des études *in vitro* réalisées chez *E. coli* montrent que l'oxydation par H₂O₂ de Ffh sur les Met du domaine M détruit sa capacité à se fixer à l'ARN 4,5S et donc d'assurer son rôle physiologique. *In vivo*, un mutant d'*E. coli* n'exprimant plus de MsrA et de MsrB synthétise une protéine Ffh plus oxydée au niveau de ses résidus Met en comparaison de la souche sauvage. Cette souche mutée nécessite d'ailleurs un fort taux de synthèse de Ffh pour se développer normalement. Cette oxydation peut être réparée *in vitro* par les Msr en incubant Ffh oxydée et la MsrA et la MsrB d'*E. coli*, restaurant ainsi sa capacité à se fixer à l'ARN 4,5S (Ezraty *et al.*, 2004).

IV. 1. 7. L'inhibiteur de protéase plasminogène

C'est un inhibiteur de la famille des SERPIN qui a pour fonction de réguler la fibrinolyse. Son exposition à la chloramine T oxyde une partie de ses résidus Met de l'inhibiteur. Il en résulte une forte diminution de son affinité vis à vis de sa cible protéique. *In vitro*, une incubation avec la MsrA restaure 90% de son pouvoir inhibiteur (Lawrence et Loskutoff, 1986).

IV. 1. 8. La protéine chaperone GroEL

Cette protéine chaperone, présente chez *E. coli*, permet aux protéines nouvellement synthétisées de se structurer correctement mais aussi d'aider à la renaturation de protéines dénaturées suite à un stress. Elle est sensible à l'oxydation de ses résidus Met. GroEL est insensible aux oxydants comme NO[•] ou H₂O₂. Par contre, elle est sensible aux oxydants générés par les phagocytes comme ONOOH ou HOCl, conduisant à l'oxydation d'au moins douze Met et à l'abolition de l'activité chaperone de GroEL. *In vitro*, l'incubation avec la MsrA ou la MsrB permet la réactivation de la protéine.

IV. 2. **Résistance au stress oxydant**

Il a été montré que la présence de la MsrA *in vivo* augmente la capacité des cellules à résister à un stress oxydant. Ainsi, une souche d'*E. coli* dans laquelle le gène codant la MsrA a été inactivé, présente une plus grande sensibilité à un stress oxydant causé par H₂O₂ si elle est cultivée en milieu solide (Rahman *et al.*, 1994).

D'autre part, des souches de *S. cerevisiae* ne produisant plus de MsrA, se développent normalement dans des conditions optimales de culture. Par contre, elles présentent une sensibilité accrue à H₂O₂ et un taux de MetSO, libre ou incorporée dans les protéines, plus élevé avec comme conséquence une perturbation de la fonction de nombreuses protéines (Moskovitz *et al.*, 1997). Ces mêmes souches, transformées avec un plasmide codant la MsrA de *S. cerevisiae*, montrent en comparaison avec la souche sauvage, un meilleur taux de croissance, un taux de MetSO libre et incorporée dans les protéines plus faible, ainsi qu'un taux de survie meilleur quand elles sont exposées aux agents oxydants de type H₂O₂, paraquat ou 2-amidinopropane. De plus, des lymphocytes T, transfectés par la MsrA de *Bos. taurus*, présentent un taux de survie supérieur, suite à une exposition à H₂O₂, en comparaison avec la souche sauvage (Moskovitz *et al.*, 1998).

Un mutant n'exprimant plus d'activité MsrA chez la souris présente une sensibilité accrue à un stress oxydant généré par une hyperoxie (exposition à 100% d'oxygène). Ce mutant possède également la particularité de posséder une plus grande concentration de protéines oxydées en conditions de stress oxydant (Moskovitz *et al.*, 2001).

Etude bibliographique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les RNS agissent en tant qu'oxydant des Met. Une souche d'*E. coli* n'exprimant plus l'activité MsrA, présente une sensibilité accrue à NO'. Cette sensibilité se traduit sur milieu solide en conditions aérobies par une diminution du taux de survie d'un facteur 10^3 - 10^4 en comparaison d'une souche d'*E. coli* transformée avec un plasmide exprimant la MsrA d'*E. coli* ou de *M. tuberculosis*. Par contre, les conditions anaérobies ne permettent pas au glutathion nitrosylé et au nitrite de réagir avec des produits du métabolisme aérobie (O_2^- , H_2O_2 , OH^{\cdot}). Dans ces conditions, aucun des deux oxydants n'a d'effet bactéricide (St John *et al.*, 2001).

IV. 3. Rôle dans la virulence des bactéries pathogènes

IV. 3. 1. MsrA : enzyme impliquée dans l'interaction hôte-pathogène ?

La reconnaissance et l'adhésion cellulaire sur les cellules eucaryotes *via* des macromolécules exposées à la surface des bactéries pathogènes sont des étapes critiques dans la colonisation et l'invasion tissulaire. Dans le but d'identifier la nature des ligands présents à la surface cellulaire d'une souche de *Streptococcus pneumoniae*, un mutant déficient dans l'export des protéines extramembranaires et incapable d'adhérer à des cellules de poumon a été analysé. Un des gènes interrompu chez ces mutants code la MsrA. Les auteurs ont testé les propriétés d'une souche d'*E. coli* n'exprimant plus la MsrA, au niveau de son adhérence à des cellules érythrocytaires par la technique d'hémagglutination. Cette souche d'*E. coli* hémagglutine huit fois moins vite et cette diminution corrèle avec la diminution de l'expression des fimbriae de type I. L'introduction d'un plasmide codant la MsrA dans cette même souche mutante, restaure une vitesse d'hémagglutination normale (Wizemann *et al.*, 1996).

L'étape de reconnaissance hôte-pathogène induit l'expression de tout un ensemble de gènes. Chez l'hôte, une réponse de défense est mise en place générant un grand nombre de FAO à activité anti-bactérienne (Baker *et al.*, 1995). Un mutant de *Erwinia chrysanthemii* dans lequel le gène *msrA* a été inactivé montre, 1) une sensibilité accrue à un stress oxydant, 2) une diminution de sa mobilité sur des surfaces solides, 3) une diminution de sa virulence envers des feuilles de chicorée et; 4) une invasion non systématique après inoculation à la plante *Saintpaulia ionantha* (Hassouni *et al.*, 1999). L'hypothèse est que la MsrA aurait un rôle de protection vis-à-vis des dommages causés sur les protéines par les FAO générées par

la cellule hôte. L'absence d'activité MsrA serait un facteur limitant dans le développement de la bactérie pathogène en diminuant de façon drastique la mobilité de la bactérie dans des conditions environnementales non propices à son développement.

Mycoplasma genitalium est un microorganisme dont le génome est très petit. Un mutant déficient en activité MsrA présente une cytoadhérence aux érythrocytes de mouton diminuée. De plus, ce mutant est hypersensible à H₂O₂ et est incapable de se développer après inoculation chez des hamsters. La protéine extramembranaire impliquée dans l'adhérence à la cellule hôte P140 contient 13 Met, la plupart exposées à sa surface. Un des effets de l'interruption du gène codant la MsrA serait une augmentation du taux d'oxydation de la protéine extramembranaire, la rendant non fonctionnelle (Dhandayuthapani *et al.*, 2001).

Enfin, les bactéries pathogènes du genre *Neisseria*, comme *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* possèdent une protéine multidomaine appelée PilB qui est suggérée jouer un rôle dans leur virulence. Plusieurs études antérieures tendaient à démontrer que PilB était impliquée en tant que régulateur transcriptionnel et agissait en *trans* sur le promoteur des gènes des pilines pour jouer un rôle antagoniste sur la synthèse des pilines (Taha *et al.*, 1988; Taha et Marchal, 1990; Taha *et al.*, 1991). Des études récentes infirment les résultats précédents : PilB n'aurait aucun rôle dans l'expression des pilines. En effet, une souche n'exprimant plus PilB n'est pas affectée au niveau de sa piliation, de la production de pilines, de l'adhérence et de la quantité d'ARN messager correspondant (Skaar *et al.*, 2002).

IV. 3. 2. Rôle dans la résistance à un stress généré par la cellule hôte

La résistance croissante aux antibiotiques de la famille des β -lactames de la souche de *Staphylococcus aureus* entraîne des problèmes d'infections nosocomiales. De nombreuses études ont été menées dans le but d'identifier les gènes responsables de la résistance à ces antibiotiques. Neuf protéines sont produites en quantité élevée en réponse à un stress généré par des antibiotiques comme l'oxacilline, la vancomycine, la céphalotonine ou la bacitracine. Une de ces protéines est la MsrA (Singh *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001). Le génome de *S. aureus* contient trois gènes pouvant coder la MsrA et un gène codant la MsrB. Le gène codant MsrA1 fait partie d'un opéron incluant le gène codant la MsrB. Les séquences codantes des MsrA2 et MsrA3 sont localisées dans des ORF indépendantes. Un mutant ne pouvant produire MsrA1, présente une sensibilité accrue à H₂O₂. L'analyse de la contribution de la résistance à un stress oxydant d'une souche de *S. aureus* Δ *msrA1* et/ou Δ *msrA2* attribue un rôle majeur à MsrA1 dû essentiellement à une expression plus élevée de l'activité MsrA1. Par

Etude bibliographique

contre, ces mutants ne sont pas plus sensibles à l'oxacilline. Cette particularité pourrait s'expliquer par le taux de MsrB qui est plus élevé quand le gène codant la MsrA1 est disrupté. Cette diminution de la résistance à un stress oxydant constitue un désavantage certain lors d'une infection par cette bactérie en réponse à la défense générée par l'hôte (Singh et Moskovitz, 2003).

Un mutant de *Mycobacterium smegmatis* n'exprimant plus MsrA, présente une réduction de son taux de survie dans des macrophages. Les auteurs ont comparé la localisation de l'oxydase NADPH-dépendante et de la nitrite oxyde synthase de l'hôte qui génèrent respectivement O_2^- et NO . Chose surprenante, le recrutement de ces deux enzymes de l'hôte infecté par la bactérie pathogène est plus rapide en absence d'expression de l'activité MsrA comparé à la forme sauvage de *M. smegmatis*. Les auteurs spéculent donc un rôle de l'activité MsrA dans le ralentissement de la mise en place des défenses de l'hôte (Douglas *et al.*, 2004).

IV. 4. Implication dans le vieillissement cellulaire et dans les pathologies humaines

IV. 4. 1 Les Msr : des enzymes « anti-âge »

Si on compare le taux de protéines oxydées au niveau de leurs résidus MetSO au niveau du foie et des reins de jeunes rats avec des rats de 26 mois d'âge, le taux est supérieur chez les rats plus âgés. On peut d'ailleurs noter une diminution globale très significative de l'activité Msr de 50-60%. Cette diminution de l'activité chez les rats âgés corrèle avec la diminution du taux d'ARN messagers. Par contre, cette diminution en relation avec l'âge n'est pas une généralité pour tous les tissus. Ainsi dans le cerveau, l'activité Msr ne diminue pas avec l'âge (Petropoulos *et al.*, 2001).

L'implication des Msr dans le ralentissement du vieillissement cellulaire a été démontrée dans plusieurs modèles eucaryotes comme la souris, la drosophile et la levure. Chez la souris, l'inactivation des deux allèles du gène *msrA* provoque une diminution de l'espérance de vie de 50%. L'inactivation conjuguée des gènes codant la MsrA et la MsrB accentue la diminution de l'espérance de vie par rapport à l'inactivation uniquement des deux allèles du gène codant la MsrA (Moskovitz *et al.*, 2001).

Chez la levure, la délétion du gène *msrA* diminue le taux de division de 25% alors que la délétion du gène *msrB* n'a pas d'effet significatif. Par contre, la délétion des deux gènes a un effet synergique. En revanche, la surexpression de l'activité MsrA augmente sensiblement

la durée de vie, contrairement à la surexpression de MsrB qui n'a pas d'effet. Ces résultats suggèrent une certaine spécialisation de fonction entre les MsrA et les MsrB (Koc *et al.*, 2004).

La surexpression de la MsrA chez la drosophile, préférentiellement au niveau du système nerveux, augmente de 70-80% leur longévité. La demande en oxygène du système nerveux étant forte, on comprend aisément l'impact que peut avoir la surexpression de MsrA dans des organes fortement exposés aux FAO. Par contre, une surexpression plus localisée au niveau du système visuel n'a pas d'effets significatifs sur l'espérance de vie (Ruan *et al.*, 2002).

III. 4. 2. Les maladies humaines

La pathologie de la maladie d'Alzheimer est étroitement associée au stress oxydant. Une oxydation anormalement élevée des différents composants cellulaires est caractéristique de cette maladie (Beal, 1994). Le cerveau est un organe très exposé au stress oxydant et doit donc posséder en contrepartie un système de défense antioxydant efficace. Une des molécules très étudiée en relation avec la maladie d'Alzheimer est le peptide A β . Dans certaines conditions, A β possède des propriétés d'agrégation et devient toxique pour la cellule (Walsh *et al.*, 2002). Le peptide contient dans sa séquence une Met35 en position C-terminale oxydable *in vivo* en conditions de stress oxydant. L'oxydation de cette Met 35 est suggérée jouer un rôle dans le processus d'agrégation. Un taux anormalement élevé de A β oxydé est détecté dans les sujets atteints par la maladie. De plus, il a été montré qu'il y a une activité MsrA plus faible dans toutes les régions du cerveau étudiées en comparaison avec des sujets sains. Le taux de transcription du gène *msrA* ne varie pas entre les deux populations, ce qui signifierait que la baisse d'activité est liée à une modification post-traductionnelle de la MsrA par les FAO ou alors à une baisse d'efficacité de la traduction (Gabbita *et al.*, 1999). La baisse d'activité MsrA dans le cerveau aurait comme conséquence une diminution des défenses antioxydantes et donc une augmentation corrélée du taux de protéines oxydées, dont le peptide A β oxydé au niveau de son résidu Met.

L' α_1 -antitrypsine, inhibiteur de protéase est une glycoprotéine de 52 KDa. Sa fonction majeure est de protéger la matrice alvéolaire des poumons de la destruction par l'élastase de neutrophile. Cette protéase à sérine est en effet capable de protéolyser un grand nombre de composants cellulaires dont l'élastine. Suite à l'oxydation de deux de ses Met, une réduction de son activité inhibitrice est observée. Ceci conduit à une protéolyse continue de l'élastine

Etude bibliographique

pouvant aller jusqu'à l'emphysème pulmonaire (Taggart *et al.*, 2000). *In vivo*, il a été montré un lien entre les dommages causés par la fumée de cigarette qui est génératrice de FAO et un taux anormalement élevé d' α_1 -antitrypsine oxydée chez les fumeurs (Wong et Travis, 1980). Depuis longtemps, l' α_1 -antitrypsine canine est connue pour être un substrat de la MsrA, *in vitro*. Une activité inhibitrice "normale" peut alors être retrouvée (Abrams *et al.*, 1981). La MsrA jouerait donc un rôle important dans la prévention de l'emphysème pulmonaire.

La cataracte, qui conduit à une opacité du cristallin de l'œil, entraîne une perte de l'acuité visuelle. Ceci peut être étroitement lié au stress oxydant. Le cristallin de jeunes sujets contient une faible proportion de protéines oxydées au niveau de leurs résidus Met. Ce taux de protéines oxydées augmente proportionnellement avec l'âge. Les sujets atteints de cataracte ont environ 45% des protéines oxydées sur leur résidus Met contrairement à des sujets sains de la même catégorie d'âge (Truscott et Augusteyn, 1977; Garner et Spector, 1980). La MsrA, en relation avec l'augmentation du taux de Met chez les sujets malades semble jouer un rôle clef de protection des cellules du cristallin chez l'homme. Une augmentation de l'activité MsrA protège les cellules contre un stress oxydant alors qu'une absence d'activité suite à une inactivation, rend les cellules du cristallin moins résistantes au stress oxydant (Kantorow *et al.*, 2004).

V. Distribution tissulaire et localisation subcellulaire des Msr

V. 1. Distribution tissulaire

L'expression de MsrA a été étudiée dans différents tissus chez la souris *via* l'utilisation de techniques immunocytochimiques et d'anticorps anti-MsrA. Son expression a été détectée dans tous les tissus étudiés : le foie, les poumons, les reins, la rétine, le cerveau, le cœur et les macrophages. Une expression élevée est détectée dans les cellules de l'épithélium pigmenté de rétine dont une fonction importante est d'éliminer les FAO qui y sont présentes en forte concentration. Il est à noter que ces cellules expriment également la catalase en grande quantité. Dans les reins, la MsrA est plus spécifiquement exprimée dans la medulla. Les auteurs ont même montré que selon la localisation du neurone dans le cerveau, la MsrA est plus ou moins exprimée (Moskovitz *et al.*, 1996). Chez l'homme, des études montrent une expression similaire dans ces tissus (Kuschel *et al.*, 1999). Il semble donc qu'un tissu fortement exposé à un stress oxydant exprime une quantité plus importante de MsrA.

Pour les MsrB, la protéine h-CBS1 ou MsrB2 est aussi exprimée dans tous les tissus étudiés plus particulièrement dans le cœur, les muscles squelettiques, le foie et les reins. Dans le cerveau, son expression est moindre en comparaison des autres tissus étudiés (Jung *et al.*, 2002). En 1999, une équipe de chercheurs avait montré, sans avoir connaissance de la fonction MsrB de h-CBS1 que l'expression de celle-ci augmentait dans des cellules oculaires exposées à un stress oxydant. Une forte expression avait déjà été montrée dans les muscles squelettiques (Huang *et al.*, 1999). MsrA et MsrB sont fortement exprimées dans les reins et le foie suggérant donc un rôle important de ces deux enzymes dans la détoxification de ces organes.

V. 2. Localisation subcellulaire

Les premières études, montrant une spécificité de localisation subcellulaire de la MsrA, ont été menées sur la plante *Brassica napus*. La présence d'une séquence signal N-terminale de 50 acides aminés permet une localisation chloroplastique, plus précisément au niveau de la fraction stromatique (Sadanandom *et al.*, 1996). Chez la plante *A. thaliana*, deux gènes codent deux isoformes de la MsrA. Une isoforme est localisée dans le cytoplasme et l'autre dans le chloroplaste. L'analyse des banques de données au niveau ADN ou protéique montre l'existence potentielle d'au moins deux MsrA chloroplastiques et trois MsrA cytosoliques (Sadanandom *et al.*, 2000). La multiplicité et la régulation différente de ces gènes pourrait être bénéfique pour la plante lui permettant une adaptation à des conditions environnementales différentes.

Chez les mammifères, la situation est moins complexe : un seul gène code la MsrA (Figure 17, p. 56). La présence d'une séquence signal N-terminale de 23 acides aminés permet sa localisation mitochondriale chez la souris et le rat (Hansel *et al.*, 2002). Elle peut également être localisée dans le cytosol ou le noyau, ce peptide signal pouvant être clivé avant import dans la mitochondrie (Vougier *et al.*, 2003).

Récemment, des études ont été menées afin de localiser les MsrB au niveau subcellulaire chez la souris *via* la technique de fluorescence en utilisant des protéines fusionnées à la GFP. Trois isoformes de MsrB chez les mammifères sont produites à partir de trois ORF distinctes : MsrB1 ou SelR se situe dans le cytoplasme ou le noyau, h-CBS1 ou MsrB2 est localisée dans les mitochondries grâce à un peptide signal. Pour MsrB3, une séquence signal située en C-terminal la localise au niveau du réticulum endoplasmique. (Kim et Gladyshev, 2004). Chaque compartiment cellulaire est donc protégé par une MsrB.

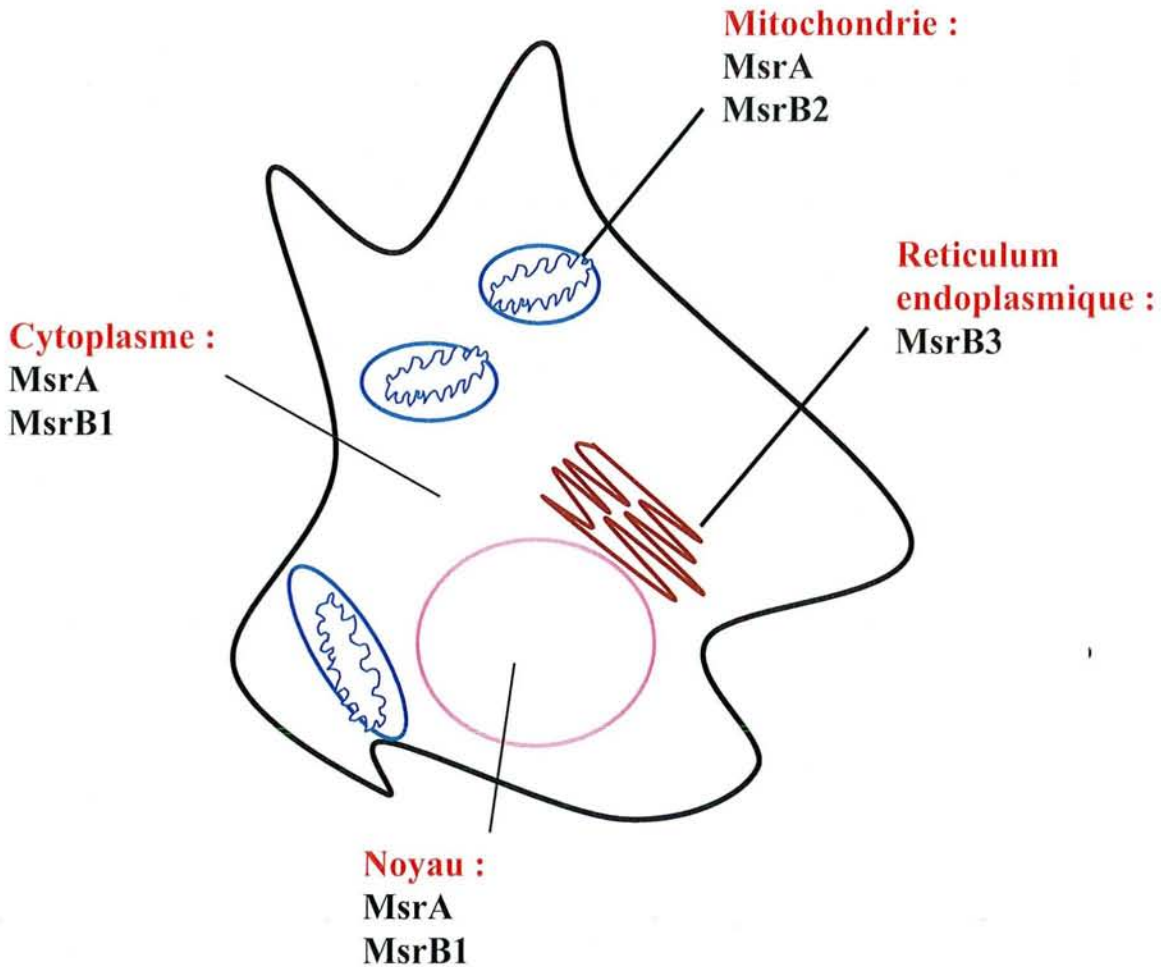


Figure 17 : Schéma représentant une cellule de mammifère avec la compartimentation subcellulaire des différents Msr. L'activité MsrA est exprimée à la fois dans le cytoplasme, le noyau et la mitochondrie. L'activité MsrB se localise dans les mitochondries (MsrB2), le réticulum endoplasmique (MsrB3), le cytoplasme (MsrB1) et le noyau (MsrB1) (d'après Hansel *et al.*, 2005).

Une situation différente est observée chez *N. gonnohoreae* qui est la seule bactérie pour laquelle une localisation des activités Msr a été étudiée. L'activité Msr est présente au sein d'un polypeptide multidomaine appelé PilB dans lequel les activités MsrA et MsrB sont fusionnées. PilB possède également un domaine N-terminal de fonction inconnue avec une séquence peptide signal. Celui-ci permet le transport de PilB dans le périplasme de la bactérie. Une protéine cytoplasmique composée uniquement de la fusion des domaines MsrA-MsrB, suite à un processus de réinitiation interne de traduction est aussi générée. Les auteurs ont montré un rôle de PilB dans le périplasme comme première barrière de défense suite à une exposition à H₂O₂ (Skaar *et al.*, 2002).

VI. Propriétés des MsrA et des MsrB

Des études menées *in vivo* ont montré que la présence du réducteur Trx était indispensable à l'activité Msr dans *E. coli* et *S. cerevisiae*. En effet, une souche auxotrophe pour la Met dont le gène *trxA* ou *trxB* (TrxB étant le réducteur physiologique de la Trx), avait été inactivé, est incapable de se développer sur un milieu de culture minimum supplémenté en MetSO (Russel et Model, 1986; Lin, 1999). *In vitro*, la Trx peut être remplacée par un réducteur artificiel comme le DTT (Brot et Weissbach, 1991; Grimaud *et al.*, 2001; Olry *et al.*, 2002).

VI. 1. Spécificité de substrat

Plusieurs études ont montré que la MsrA reconnaît aussi bien les MetSO libres que celles intégrées dans un polypeptide. D'autre part, il a été démontré une reconnaissance stéréospécifique de l'isomère *S* de la fonction sulfoxyde.

En effet, des études portant sur la MsrA de *S. cerevisiae*, qui réduit les isomères *D* et *L* de la MetSO montrent une reconnaissance stéréosélective de la *D,L*-Met-*S*-SO. De plus, la présence d'un excès de l'isomère *R* par rapport à l'isomère *S* ne semble pas affecter la réduction de l'isomère *S*, suggérant que l'isomère *R* n'entre pas en compétition avec l'isomère *S* (Moskovitz *et al.*, 2000).

La spécificité de substrat de la classe des MsrB a été démontrée. D'une part, l'oxydation des huit résidus Met de la calmoduline en MetSO est réversée entièrement par incubation simultanée de la MsrA et de la MsrB alors que seulement quatre résidus en moyenne sont réduits après incubation uniquement avec MsrA ou MsrB (Grimaud *et al.*, 2001). Ces résultats suggéraient fortement une spécificité complémentaire de MsrA et de MsrB. Comme je vais vous le présenter dans la partie Résultats, la MsrB de *N. meningitidis* présente effectivement une spécificité vis-à-vis de l'isomère *R*. Ceci a pu être montré en utilisant de la *L*-Met-*R*-SO et de la *L*-Met-*S*-SO (Olry *et al.*, 2002). Enfin, des études ont également démontré la spécificité de substrat vis-à-vis de l'isomère *R* de la MsrB à sélénocys (SelR) de souris (Kryukov *et al.*, 2002) et de la MsrB de *S. aureus* (Moskovitz *et al.*, 2002).

VI. 2. Mécanisme catalytique

Les MsrA et les MsrB jusqu'à présent étudiées, présentent un même mécanisme catalytique (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002) (Figure 18, p. 59). Des études effectuées au Laboratoire ont montré qu'il s'agit d'un mécanisme de type ping-pong pour les MsrA (Boschi-Muller *et al.*, 2001). Ainsi, dans un premier temps, la MetSO est réduite avec le relargage d'une mole de Met par mole d'enzyme. L'enzyme oxydée est ensuite régénérée par la Trx. Plus précisément, notre équipe a montré que le mécanisme peut se décomposer en au moins trois étapes (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002; Antoine *et al.*, 2003; Olry *et al.*, 2004).

Dans une première étape, la Cys catalytique réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde. Ceci conduit à la formation d'un état de transition dont le réarrangement engendre la libération d'une molécule de Met avec la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys catalytique. Cette première étape est très rapide. Lors de la deuxième étape, la Cys dite de régénération, attaque l'intermédiaire acide sulfénique entraînant ainsi la formation d'un pont disulfure intramoléculaire et la libération d'une molécule d'eau. La vitesse de formation de ce pont disulfure est limitée par celle de formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Ces deux étapes ne sont pas cinétiquement limitantes dans le processus global, l'étape cinétiquement limitante étant associée à la troisième étape. Celle-ci consiste en la régénération de l'enzyme sous forme active *via* la réduction du pont disulfure intramoléculaire par la Trx.

VI. 3. Structure tridimensionnelle

Bien que les MsrA et les MsrB présentent un même mécanisme catalytique, ces deux protéines n'ont pas d'identité au niveau de leur structure primaire et ont des structures tridimensionnelles différentes.

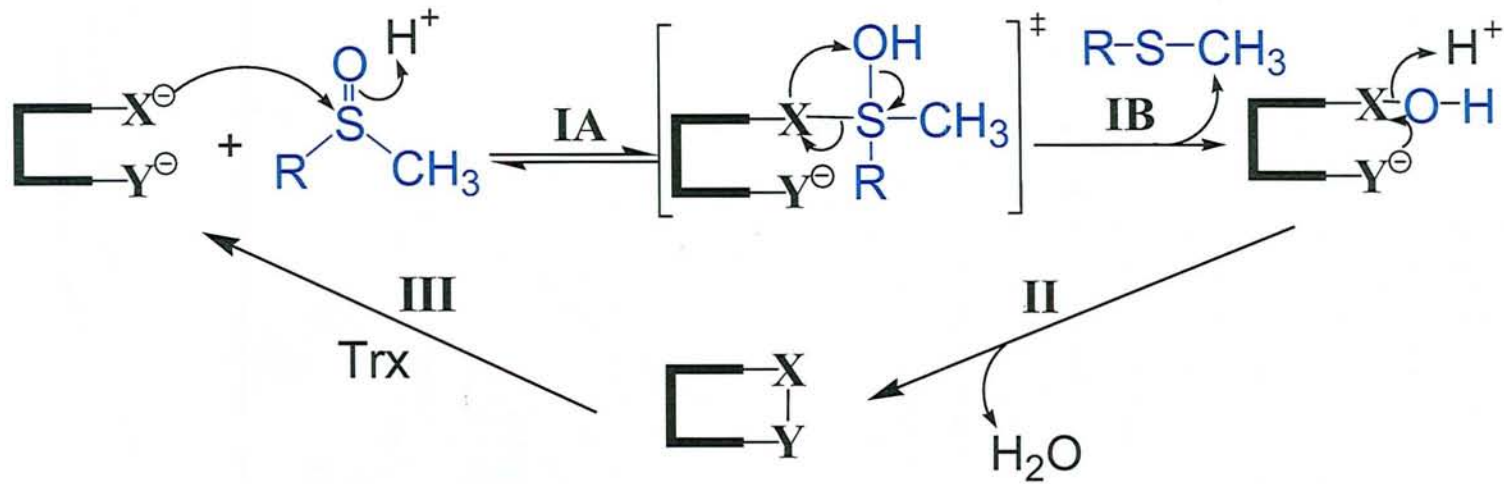


Figure 18 : Mécanisme catalytique proposé pour les Msr à deux Cys essentielles (cas des Msr de *N. meningitidis*) (d'après Olry *et al.*, 2002).

L'attaque nucléophile de la Cys X catalytique sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat conduit à la formation d'un "état de transition" (étape IA). La migration sigmatropique 1,3 du groupement hydroxyle de cet "état de transition" permet la libération d'une molécule de Met et la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la CysX (étape IB). Une catalyse acide doit permettre 1) d'augmenter le caractère électrophile du soufre du sulfoxyde et donc de permettre l'attaque du thiolate de la CysX et, 2) favoriser le réarrangement sigmatropique 1,3. L'étape II conduit à la formation du pont disulfure CysX/CysY *via* l'attaque de la CysY sur l'atome de soufre de l'intermédiaire acide sulfénique, le départ du groupement OH⁻ doit être favorisé par une catalyse acide assistée. Dans l'étape III, le pont disulfure CysX-CysY est réduit par Trx (dans le cas de la MsrA d'*E. coli* une troisième CysZ attaque le pont disulfure CysX/CysY formant un nouveau pont Cys Y/Cys Z alors réduit par la Trx). RSOCH₃ et RSCH₃ représentent respectivement la MetSO et la Met. Pour la MsrA de *Bacillus subtilis*, CysX = Cys51 et CysY = Cys54. Pour la MsrA de *N. meningitidis*, CysX = Cys51 et CysY = Cys198. Pour la MsrA d'*E. coli*, CysX = Cys51, CysY = Cys198 et CysZ = Cys206. Pour la MsrB de *N. meningitidis*, CysX = Cys117 et CysY = Cys63. Pour la MsrB de *X. campestris*, CysX = Cys117 et CysY = Cys31.

VI. 3. 1. MsrA

Actuellement les structures tridimensionnelles des MsrA d'*E. coli*, de *B. taurus* et de *M. tuberculosis* ont été obtenues par diffraction aux rayons X (Tête-Favier *et al.*, 2000; Lowther *et al.*; 2000; Taylor *et al.*, 2003) (Figure 19). Elles possèdent un repliement qui ne présente aucune similarité avec le repliement de protéines retrouvées dans les banques de données structurales.

Les MsrA sont des enzymes monomériques de 170 à 211 acides aminés ne présentant entre elles que des différences structurales mineures. Leur structure tridimensionnelle est composée :

- 1) d'une partie centrale de 140 acides aminés appelée corenzyme correspondant aux acides aminés 43 à 194 et qui contient 4 hélices- α , 8 brins- β ainsi que des coudes- β . C'est dans cette partie que se situe le site actif contenant la Cys51 qui se trouve positionnée à l'extrémité N-terminale de l'hélice- α_1 . Cette partie corenzyme est suffisante pour catalyser la réduction de la MetSO en présence de DTT (Boschi-Muller *et al.*, 2001).

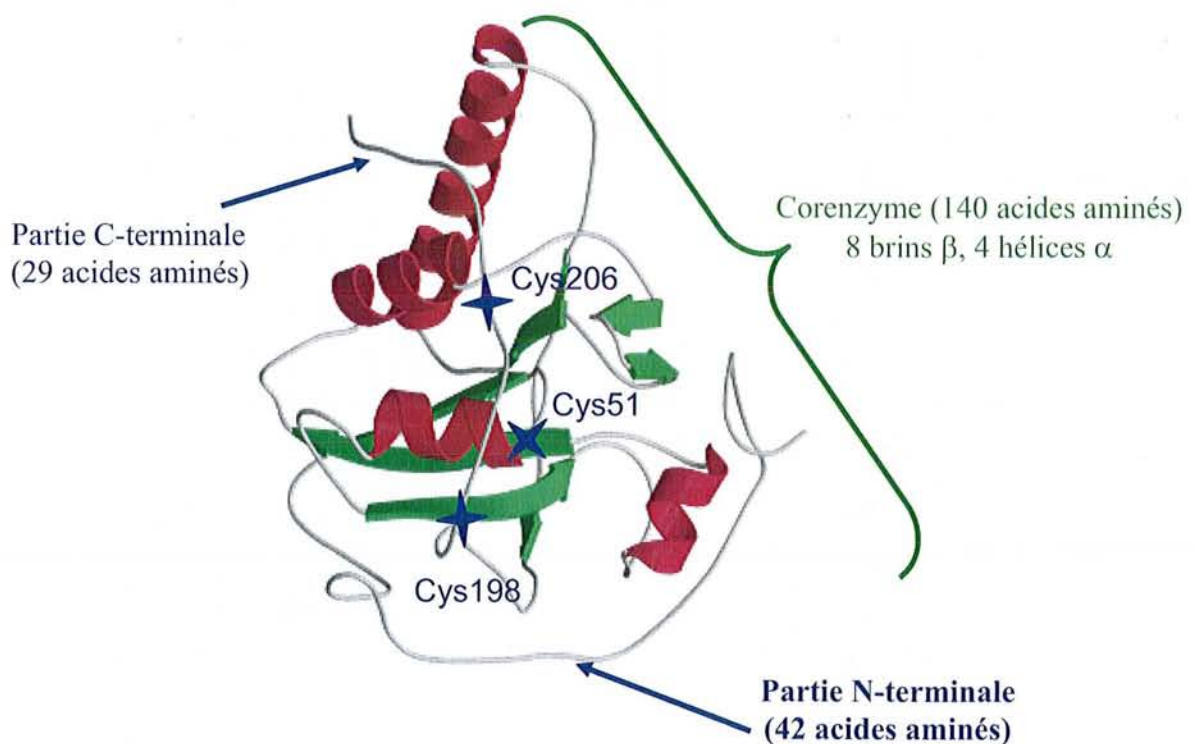


Figure 19 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la MsrA d'*E. coli* (d'après Tête-Favier *et al.*, 2000). La position des trois Cys (51, 198 et 206), impliquées dans le mécanisme, est indiquée par une étoile bleue. Les structures secondaires en hélices- α sont représentées en rouge et celles en brins- β sont représentées en vert. La molécule de cacodylate liée covalamment à la Cys51 n'est pas représentée.

Deux éléments structuraux distinguent les trois structures. Le premier concerne une hélice- α supplémentaire qui connecte les brins- β_2 et β_3 . Dans la MsrA de *M. tuberculosis*, 4 résidus sont absents dans cette région ce qui amène à une structuration en boucle. La seconde différence significative concerne les résidus compris entre l'Ala159 et l'Arg167. Alors que pour les MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus*, ils sont situés à la fin de l'hélice- α_3 , la MsrA de *M. tuberculosis* a une hélice- α_3 raccourcie interrompue par un coude.

- 2) d'une extrémité N-terminale d'une quarantaine d'acides aminés ne possédant pas de d'hélice- α et de brin- β mais qui est stabilisée par un grand nombre de liaisons hydrogène et de contacts de Van der Waals avec le corezyme. Pour l'instant, aucun rôle structural n'a été attribué à cette extrémité, sa délétion n'entraînant pas de modification de l'activité. D'ailleurs, en inspectant les alignements de séquences, un grand nombre de MsrA ne possède pas cette extrémité N-terminale. C'est le cas des MsrA de *B. subtilis* et *M. tuberculosis* qui ont été montrées être aussi actives.

- 3) d'une extrémité C-terminale sans élément de structure secondaire qui montre des différences significatives au niveau de la structure primaire. Cette partie n'interagit pas avec le corezyme et semble flexible. Pour la MsrA d'*E. coli*, elle est composée de 29 acides aminés. Elle est observable uniquement parce qu'il existe dans le cristal un pont disulfure entre la Cys206 et un résidu Cys d'un autre monomère de l'unité asymétrique, composée de trois monomères de MsrA, qui semble la stabiliser. Pour la MsrA de *B. taurus*, la Cys198 est liée *via* une molécule de DTT à la Cys51.

Dans les structures tridimensionnelles, les distances observées entre les thiols des Cys51/198 et Cys198/206 (uniquement pour les MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus*) sont incompatibles avec la formation d'un pont disulfure. Ceci implique que cette partie doit être flexible pour permettre la formation des ponts disulfures. Ceci est en accord avec le fait qu'aucune densité électronique n'est clairement visible au niveau de cette partie C-terminale pour la MsrA d'*E. coli* (pour le monomère dans l'unité cristalline pour lequel la partie C-terminale n'est pas stabilisée par un pont disulfure) et qu'elle est composée de nombreux résidus Gly (Tête-Favier *et al.*, 2000).

Le site actif des MsrA est très évasé et se situe en surface de la protéine lui permettant d'accepter des substrats de taille variable. Le site actif est composé d'un grand nombre de résidus aromatiques et de résidus permettant de former des liaisons hydrogène. Bien que la structure tridimensionnelle d'un complexe enzyme-substrat ne soit pas disponible, le site actif des trois structures décrites est occupé par une molécule pouvant mimer soit un état de

transition ou un intermédiaire dans la MsrA d'*E. coli* (Figure 20), soit le complexe Michaélien enzyme-substrat dans les MsrA de *B. taurus* (Figure 21) et de *M. tuberculosis* (Figure 22, p. 63).

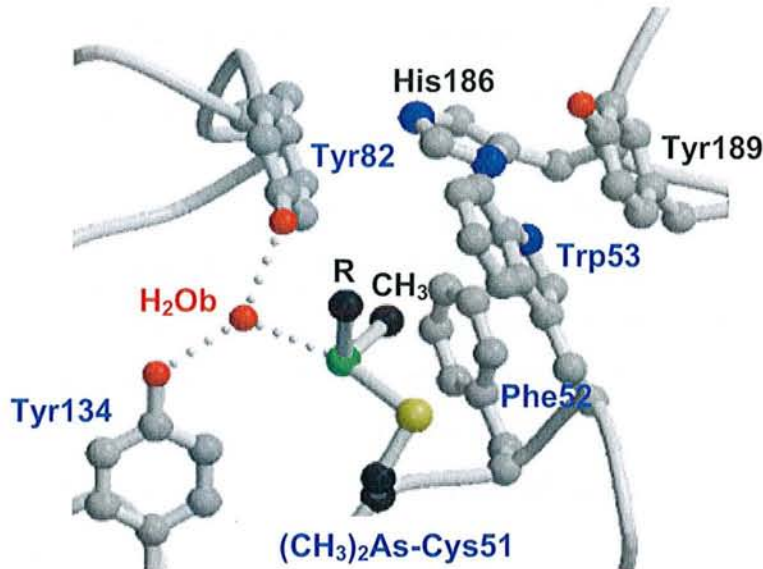


Figure 20: Représentation de la structure du site actif de la MsrA d'*E. coli* (d'après Tête-Favier *et al.*, 2000). Le site actif de la forme cristallisée est présent avec la Cys51 catalytique sous la forme d'un adduit diméthyl arsenate. Les chaînes latérales des résidus invariants Glu94, Tyr82, Tyr134, Phe52, Trp53, His186 et Tyr189 présents autour de la chaîne latérale de la Cys51 catalytique sont représentés. R et CH₃ de l'adduit diméthyl arsenate représentent respectivement la chaîne latérale et le groupement méthyle de la Met-S-SO.

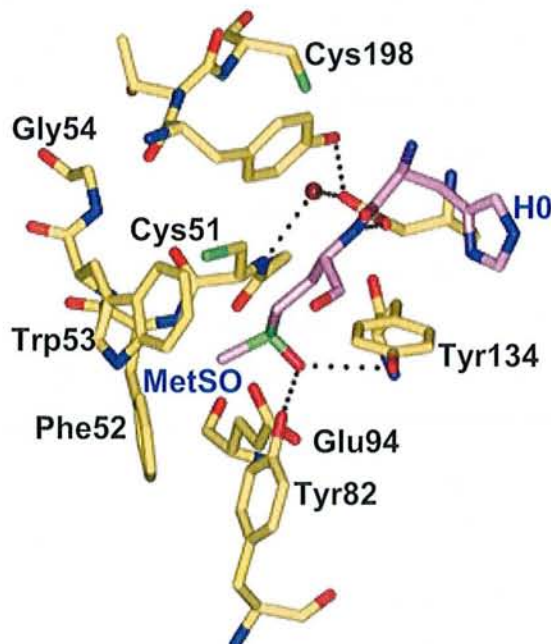


Figure 21: Représentation de la structure du site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* dans lequel une MetSO est modélisée en remplacement d'une Met (d'après Taylor *et al.*, 2003). Le dipeptide His-MetSO est représenté en violet, les acides aminés du site actif en jaune. La molécule d'H₂O est représentée en rouge foncé. Les traits pointillés représentent les liaisons hydrogène potentielles.

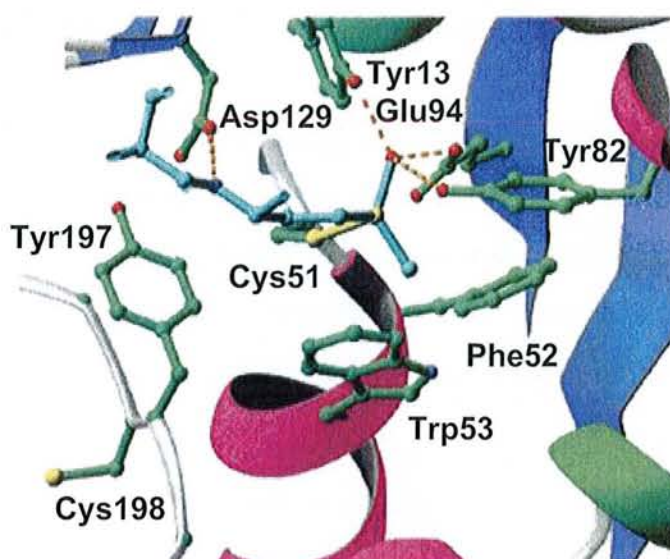


Figure 22: Représentation de la structure du site actif de la MsrA de *B. taurus* dans lequel un substrat sulfoxyde est modélisé (d'après Lowther *et al.*, 2000). A partir de la molécule de DTT, qui pontre dans la structure 3D les Cys51 et Cys198 du même monomère, la chaîne latérale d'une MetSO a été modélisée (représentée en bleu). Les chaînes latérales des acides aminés du site actif sont représentées en vert (Cys51, Trp53, Phe52, Tyr82, Tyr134, Asp129, Glu94). Les traits pointillés représentent les liaisons hydrogène potentielles.

De l'examen de l'ensemble de ces structures, ainsi que celui des résidus conservés dans les MsrA, il ressort que, 1) le groupement méthyle de la MetSO doit être localisé dans une poche hydrophobe constituée des résidus conservés Phe52 et Trp53 (le Trp53 étant lui-même stabilisé par des interactions de type « stacking » et liaisons hydrogène respectivement avec les résidus Tyr189 et His186), 2) un des oxygènes du résidu Asp129 forme une liaison hydrogène avec le groupement NH du squelette du substrat MetSO, l'autre oxygène faisant une liaison hydrogène avec le résidu conservé Tyr197, 3) le noyau aromatique du résidu Tyr197 forme une interaction de type H- π avec la liaison peptidique entre le groupement NH de la MetSO et le groupement CO du résidu adjacent et; 4) les résidus Tyr134, Tyr82 et Glu94 forment une interaction de type liaison hydrogène avec un atome d'oxygène qui pourrait mimer l'oxygène de la MetSO ou celui de l'intermédiaire acide sulfénique.

VI. 3. 2. MsrB

Deux structures obtenues par diffraction aux rayons X ont été résolues : celles des MsrB de *N. gonorrhoeae* et de *N. meningitidis*. Ces MsrB constituent le domaine C-terminal

Etude bibliographique

de la protéine PilB (Lowther *et al.*, 2002; Kauffmann *et al.*, 2002; Kauffmann, résultats non publiés).

Les MsrB de *N. gonorrhoeae* et de *N. meningitidis* sont des enzymes monomériques de 146 acides aminés. Elles présentent une structure tridimensionnelle totalement différente de celle des MsrA avec un repliement essentiellement de type- β . Le cœur de l'enzyme MsrB est formé de deux feuillets β antiparallèles twistés, composés respectivement de 3 et 5 brins. Ces feuillets β sont flanqués de trois hélices α et de cinq hélices- 3_{10} (Figure 23).

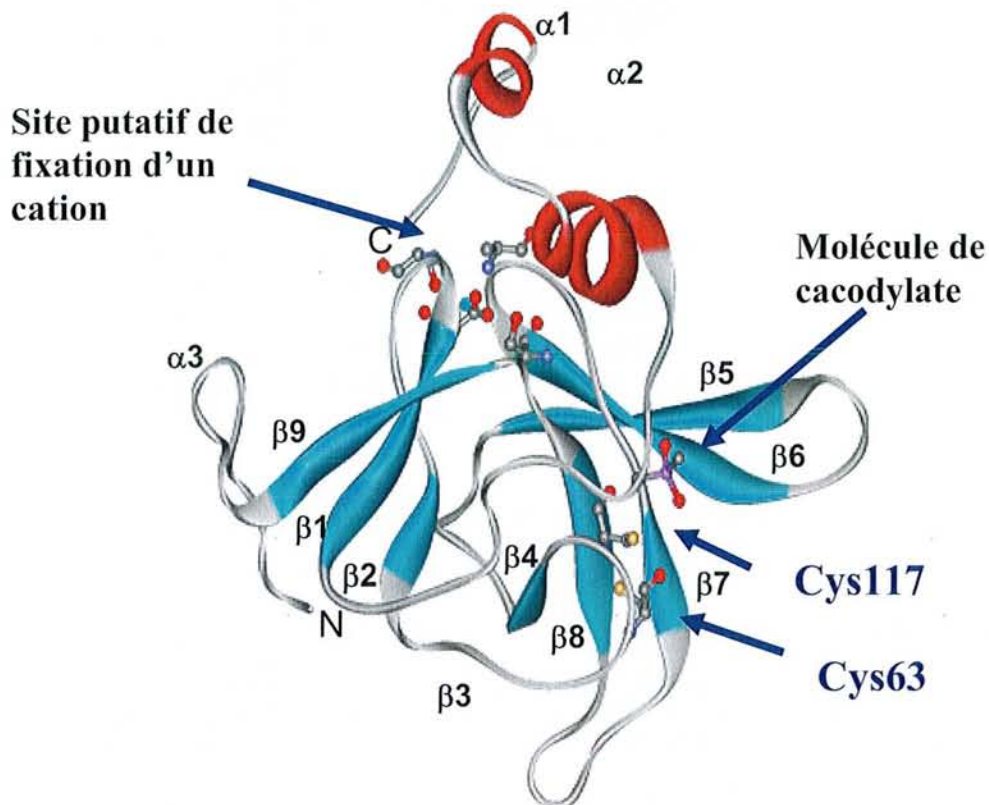


Figure 23: Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (d'après Lowther *et al.*, 2002). La position de la Cys catalytique 117 impliquée dans le mécanisme est indiquée par une flèche. Les hélices- α sont représentées en rouge et les brins- β sont représentés en bleu. Les chaînes latérales des résidus équivalents aux résidus Cys, permettant la fixation d'un métal dans les MsrB à métal, sont également représentées. La position du métal est ici occupée par une molécule d'eau représentée en bleu. La molécule de cacodylate présente dans le site actif mimerait le substrat MetSO. Pour la MsrB de *N. meningitidis*, le site actif n'est pas occupé par une molécule de cacodylate mais le positionnement des résidus reste le même.

Le brin- β_8 sous-tend la Cys catalytique 117. La Cys63 impliquée dans le recyclage de l'activité réductase se trouve positionnée dans une boucle entre β_3 et β_4 . La distance de 3,2 Å entre son atome de soufre et celui de la Cys117 est compatible avec la formation du pont disulfure intramoléculaire. La localisation en surface du site actif de la MsrB et en particulier

des Cys117 et Cys63, doit permettre une bonne accessibilité du site actif au substrat et du pont disulfure Cys117-Cys63 à la Trx. Contrairement aux MsrA, le site actif des MsrB contient peu d'acides aminés aromatiques conservés excepté le Trp65 (Figure 24).

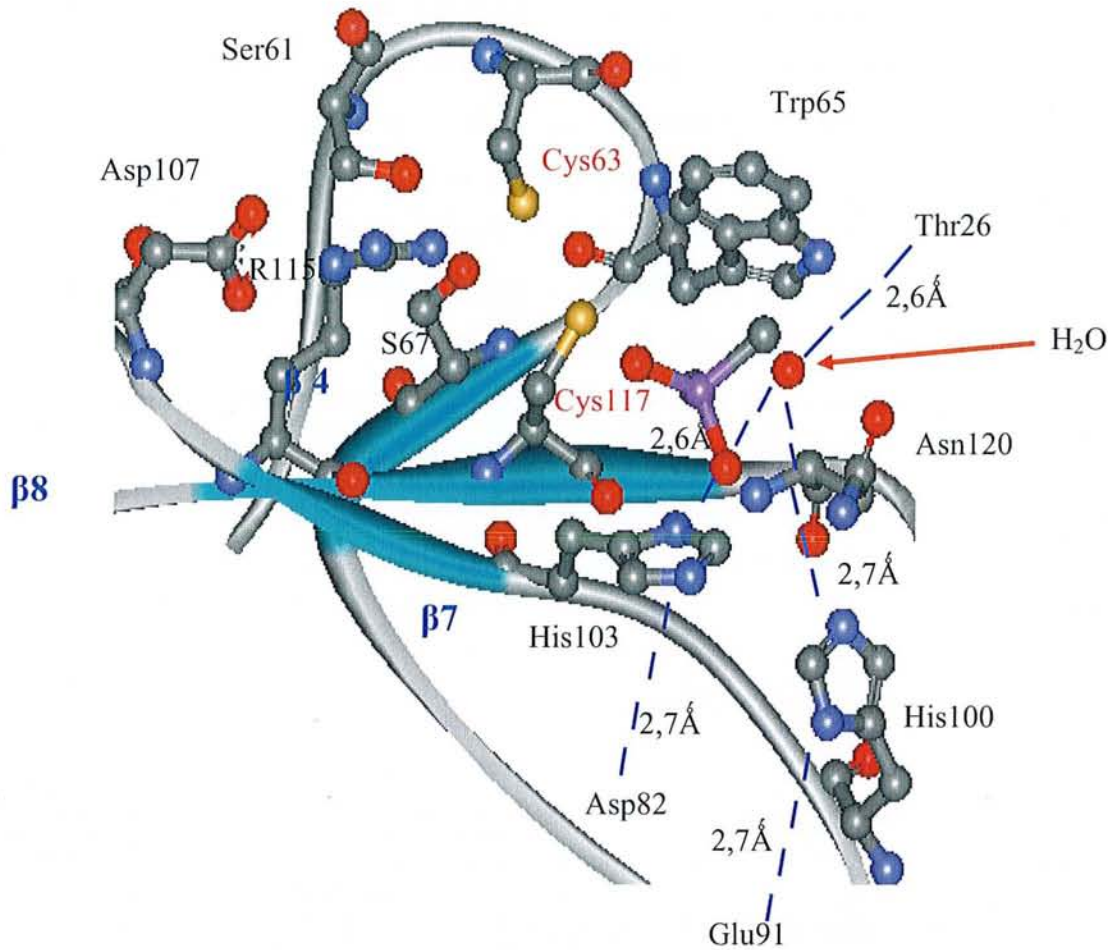


Figure 24 : Représentation de la structure du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (d'après Lowther *et al.*, 2002). Les résidus Thr26, Asp82, Glu91, ne sont pas représentés pour plus de clarté. Le résidu Asp82 est en interaction *via* une liaison hydrogène avec l'azote ϵ de l'His103, qui elle-même établit une liaison hydrogène *via* son azote δ avec un des oxygènes du cacodylate. Le résidu Glu91 établit une liaison hydrogène *via* son azote ϵ avec une molécule d'eau présente au sein du site actif.

L'inspection de la structure du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* révèle la présence d'une molécule de cacodylate non liée covalamment qui provient du milieu de cristallisation. Elle pourrait être un bon modèle mimant le substrat MetSO fixé dans le site actif. C'est ainsi que les auteurs postulent que l'oxygène du cacodylate établit une interaction de type liaison hydrogène avec le résidu invariant His103 qui, lui-même, établit une liaison hydrogène avec le résidu invariant Asp82. Cette interaction pourrait mimer une interaction

Etude bibliographique

entre l'oxygène du sulfoxyde de la MetSO et l'His103. L'un des deux groupements méthyles du cacodylate est localisé dans une poche hydrophobe formée de la chaîne principale de la Cys63 et de la chaîne latérale du Trp65, résidu également invariant. Ce méthyle pourrait en fait représenter le positionnement du méthyle de la MetSO. De plus, un réseau d'interactions décrit entre les résidus Asp107, Arg115 et Cys117 aurait pour rôle d'abaisser le pK_{app} de cette dernière, favorisant ainsi l'attaque du thiolate sur le sulfoxyde de la MetSO. Enfin, il est à noter qu'une molécule d'eau est visualisée dans le site actif. Elle est en interaction avec l'His100 qui elle-même est en interaction avec le résidu Glu91.

Contrairement à la classe des MsrA, les MsrB sont décrites présenter quelques similitudes structurales avec deux autres protéines : Mss4 et TCTP et ce malgré des structures primaires différentes. L'inspection des structures tridimensionnelles révèle l'existence de deux boucles situées à l'opposé du site actif. Cette partie est superposable à une partie de la structure tridimensionnelle des enzymes de type Mss4 (impliquées dans la régulation de la protéine Rab qui est un facteur d'échange GTP/GDP) (Zhu *et al.*, 2001) qui fixe le Zn^{2+} via deux signatures CXXC (Yu et Schreiber, 1995).

VI. 4. Sous classes de Msr

VI. 4. 1. MsrA

L'examen, par alignement, des structures primaires des MsrA biochimiquement caractérisées et actives ainsi que des séquences putatives extraites des banques de données, couplé aux données existantes concernant le mécanisme et la structure des MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus*, a permis de proposer l'existence de plusieurs sous-classes de MsrA en fonction de la présence ou de l'absence des Cys de recyclage 198 et/ou 206 et/ou 54. L'ensemble de ces sous-classes est détaillé en se basant sur la numérotation de la MsrA d' *E. coli* (Figure 25, p. 67).

- La première sous-classe est représentée par les MsrA d'*E. coli* et de *B. taurus*, avec une longueur d'environ 220 acides aminés et la présence des Cys198 et 206 impliquées dans la régénération de la Cys51. La Cys51 est présente dans le motif conservé ⁵¹CysPheTrpGly⁵⁴, alors que la Cys198 est présente dans le motif ¹⁹⁶GlyTyrCysGly¹⁹⁹. Une séquence riche en glycines sépare la Cys198 et la Cys206. L'ensemble des structures primaires de cette sous-classe possède la partie N-terminale.

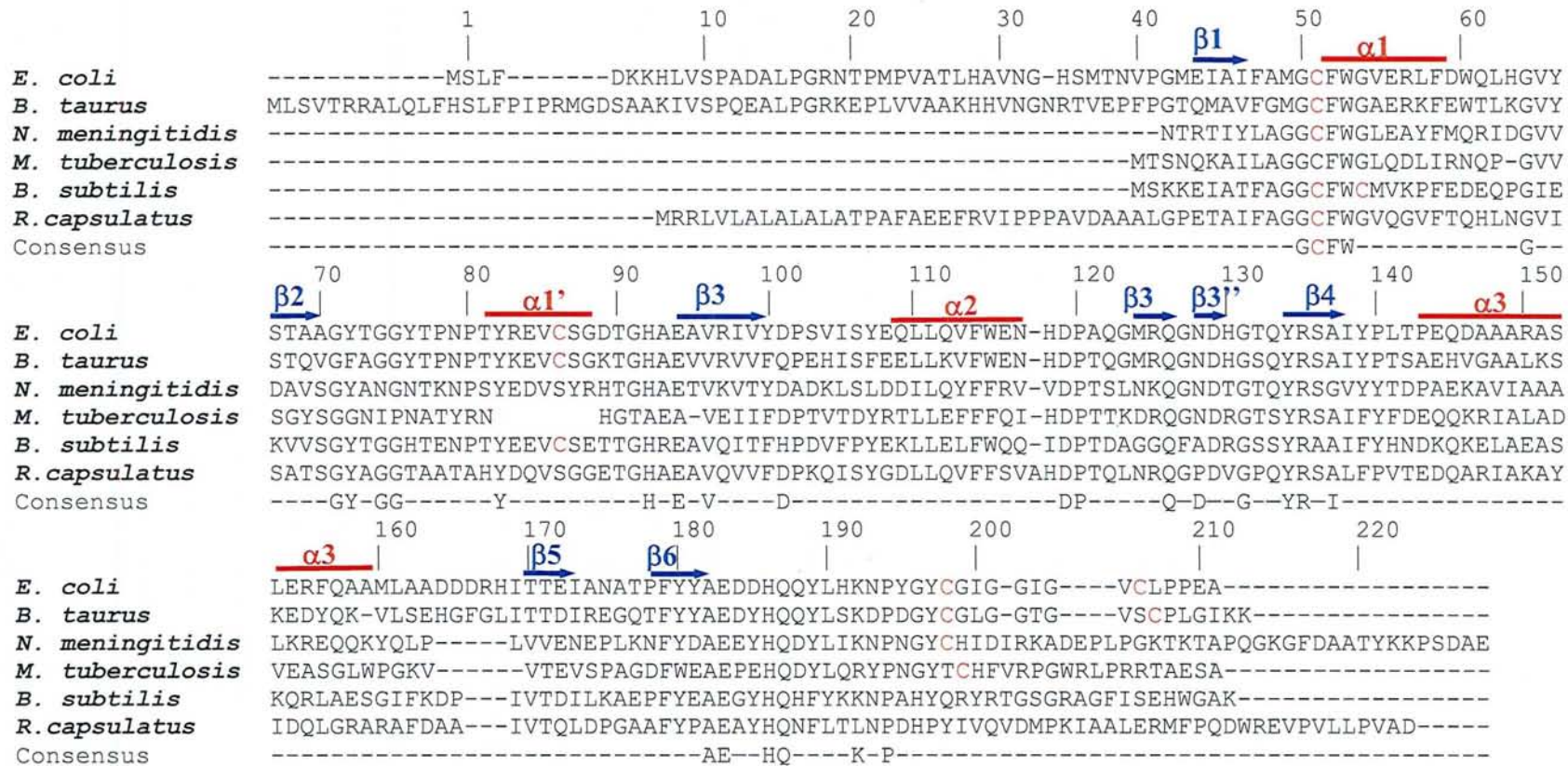


Figure 25 : Alignement des séquences des MsrA d'*E. coli*, *B. taurus*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*, *B. subtilis* et *R. capsulatus*. Ces enzymes sont représentatives d'une des trois sous-classes de MsrA, qui diffèrent par la position et le nombre des résidus Cys impliqués dans le mécanisme de recyclage (*E. coli* et *B. taurus*: Cys51/Cys198/Cys206, *N. meningitidis* : Cys51/Cys198; *B. subtilis* : Cys51/Cys54; *R. capsulatus* : Cys51). La numérotation utilisée est basée sur celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme d'*E. coli* (Tête-Favier *et al.*, 2000): les hélices- α sont indiquées par des traits rouges, les brins- β par des flèches bleues. Les résidus Cys sont indiqués en couleur rouge. La séquence consensus présente des résidus conservés à plus de 90 % dans les séquences de MsrA putatives extraites des banques génomiques (génomomes entièrement séquencés).

Etude bibliographique

- La deuxième sous-classe diffère de la première par l'absence de la Cys206. C'est le cas par exemple des MsrA de *N. meningitidis* et de *M. tuberculosis*. La Cys51 est aussi dans le motif ⁵¹CysPheTrpGly⁵⁴ excepté pour la MsrA de *Treponema pallidum* pour laquelle la Gly54 est remplacée par une sérine. Pour la Cys198, deux cas se présentent : soit elle est présente dans un motif ¹⁹⁶GlyTyrCysHis¹⁹⁹ soit, dû à l'insertion de résidus entre la Tyr197 et la Cys198, elle est présente dans un motif : ¹⁹⁶GlyTyrCysHis¹⁹⁹ comme c'est le cas pour la MsrA de *M. tuberculosis*.

- Une autre sous-classe est représentée par l'enzyme de *B. subtilis* qui ne possède ni la Cys206 ni la Cys198 mais un résidu Cys supplémentaire en position 54. Le motif dans lequel se trouve la Cys 51 est donc ⁵¹CysPheTrpCys⁵⁴.

- La MsrA putative de *R. capsulatus* qui ne possède que la Cys51, pourrait constituer une quatrième sous-classe. Il est à noter qu'aucune étude n'a pour l'instant montré l'existence d'une activité Msr portée par cette protéine. Si c'est le cas, l'unique présence de la Cys51 implique l'intervention d'un mécanisme de régénération de l'activité réductase différent.

VI. 4. 2. MsrB

Au niveau des MsrB, plusieurs sous-classes peuvent aussi être définies en fonction du mécanisme de recyclage de la Cys catalytique. Toutes possèdent la Cys117 catalytique comprise dans un motif ¹¹⁶TyrCysIle/ValAsn¹¹⁸ (Figure 26, p. 69).

- La première sous-classe qui représente 60% des MsrB putatives est représentée par la MsrB de *N. meningitidis* qui possède comme nous l'avons vu précédemment une Cys de recyclage en position 63 dans un motif conservé ⁶³CysGlyTrpPro⁶⁶ qui intervient dans l'étape de recyclage de l'activité MsrB en formant un pont disulfure intramoléculaire Cys117-Cys63.

- Une deuxième sous-classe (5% des MsrB) est représentée par la MsrB biochimiquement caractérisée et active de *X. campestris* dans laquelle la Cys63 est absente et est remplacée par une Cys en position 31 (Neiers *et al.*, 2004). Il est à noter que si on admet que la structure la MsrB de *X. campestris* est superposable à celle de la MsrB de *N. meningitidis*, la distance entre la Cys117 et la position 31 n'est pas compatible avec la formation d'un pont disulfure dans la MsrB de *X. campestris*, sauf réorganisation conformationnelle locale importante.

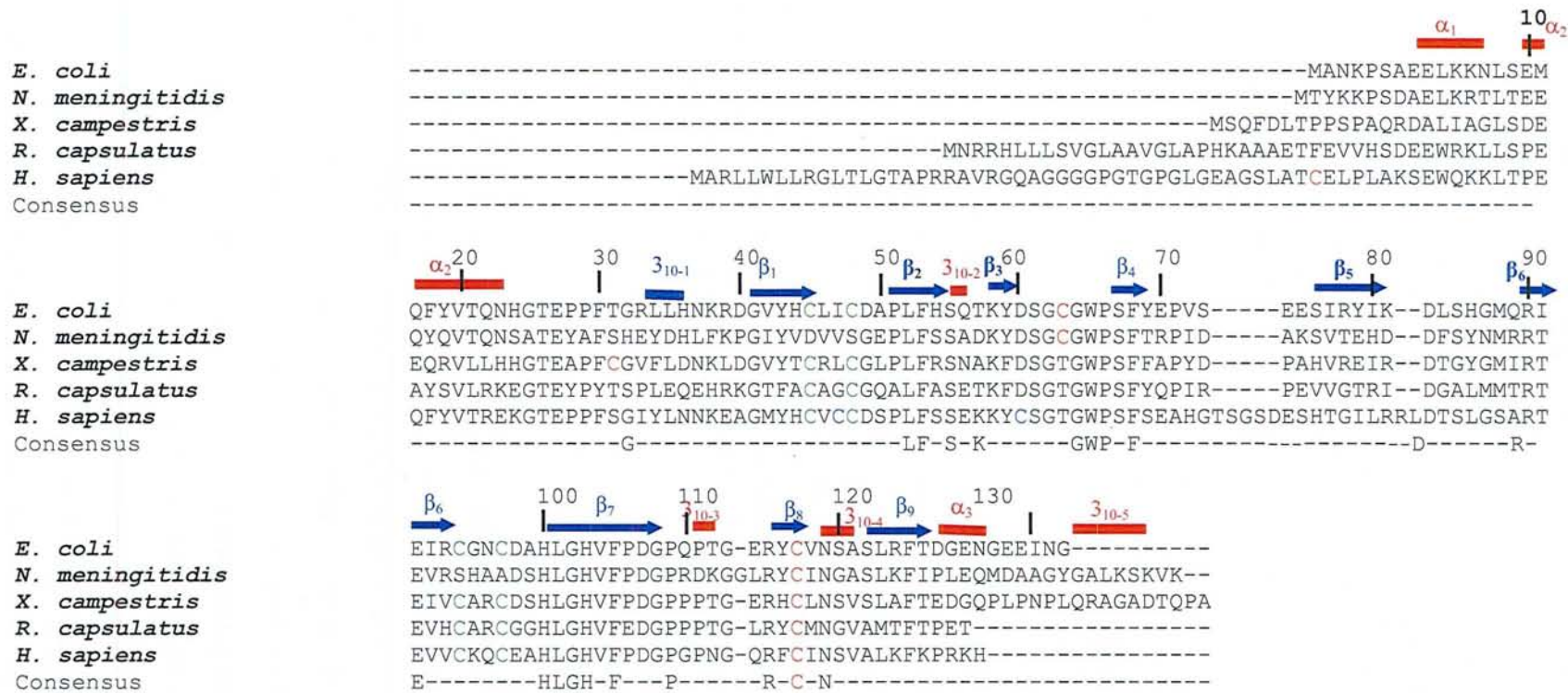


Figure 26 : Alignement des séquences des MsrB de *E. coli*, *N. meningitidis*, *X. campestris*, *R. capsulatus* et *H. sapiens*. Les MsrB peuvent être divisées en trois sous-classes selon le nombre et la position de Cys impliquées dans le mécanisme de recyclage : 1 Cys63 (cas de *N. meningitidis* et *E. coli*) ou 1 Cys60 (cas de *H. sapiens*), aucune Cys (cas de *R. capsulatus*), 1 Cys32 (cas de *X. campestris*). Parmi les MsrB, certaines possèdent 4 Cys supplémentaires, impliquées dans la fixation d'un métal (cas de *E. coli*, *R. capsulatus* et *H. sapiens*). La protéine humaine SELX est un cas particulier où la Cys catalytique est remplacée par un résidu sélénocys (U). La numérotation utilisée est celle de l'enzyme d'*E. coli*. Les structures secondaires indiquées sont celles correspondant à l'enzyme de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.*, 2002) : les hélices- α sont indiquées par des traits rouges, les brins- β par des flèches bleues. Les résidus Cys impliqués dans la chélation d'un ion métallique sont indiqués en vert, les Cys impliquées dans le mécanisme catalytique sont indiquées en rouge, les autres Cys sont indiquées en bleu. La séquence consensus présente les résidus conservés à plus de 90 % dans les séquences de MsrB putatives extraites des banques génomiques (génomés entièrement séquencés).

Etude bibliographique

- La troisième sous-classe, dont fait partie la MsrB de *R. capsulatus*, et qui représente 30% des MsrB ne possède pas de Cys de recyclage. Ceci implique donc, comme pour la MsrA de *R. capsulatus* un mécanisme de régénération de l'activité réductase différent *via* la réduction directe de l'acide sulfénique (elle peut éventuellement être remplacée par une sélénocystéine). Il est à noter que chez les mammifères la protéine à activité MsrB SEL ne possède pas une Cys en position 117 mais une sélénocystéine. C'est le cas de la MsrB humaine SELX ou de souris SELR (Kryukov *et al.*, 2002).

A l'intérieur de ces sous-classes, on peut noter la présence, comme c'est le cas pour la MsrB d'*E. coli*, de *X. campestris*, humaine, murine ou de *R. capsulatus*, de deux motifs ⁴⁵CXXC⁴⁸ et ⁹⁴CXXC⁹⁷ qui permettent la fixation d'un métal de type Zn²⁺ (Kryukov *et al.*, 2002; Neiers *et al.*, 2004).

VII. Organisation génomique des Msr

Les MsrA et MsrB, de par leur stéréospécificité inverse vis-à-vis de la MetSO, permettent une réduction complète des MetSO et donc de régénérer 100% des Met oxydées. D'autre part, la régénération de l'activité réductase nécessite l'intervention d'un réducteur. La complémentarité fonctionnelle des MsrA et MsrB ainsi que la nécessité pour cette famille d'enzymes d'être régénérée *via* un réducteur a peut-être conduit certains organismes à privilégier une organisation génomique particulière, comme nous allons le voir dans ce chapitre (Figure 27, p. 72).

VII. 1 Chez les bactéries

Comme dans beaucoup de bactéries, les gènes *msrA* et *msrB* chez *E. coli* constituent deux unités transcriptionnelles distinctes. Dans le cas de *B. subtilis*, ils sont localisés dans un même opéron. Le nombre de copies varie selon l'organisme considéré. Cette multiplicité pourrait refléter la nécessité pour la bactérie d'exprimer telle ou telle Msr en fonction de conditions environnementales différentes. Une fusion de gènes *msrA-msrB* est ainsi retrouvée chez *S. aureus* mais la multiplicité des gènes codant la MsrB fait que deux sur les trois sont codés dans une unité transcriptionnelle indépendante. *Vibrio cholerae* comporte plusieurs copies de gènes *msrA* et *msrB*, certains des gènes *msr* codent pour des ORF indépendantes et d'autres pas. Dans le cas d'*Helicobacter pylori*, une seule ORF conduit à l'expression d'une

protéine fusionnée MsrA-MsrB. Pour *N. meningitidis*, cette organisation est retrouvée hormis la présence d'une séquence supplémentaire en 5' codant un domaine pouvant participer à la régénération des activités Msr de PilB (Wu *et al.*, 2005). Cependant, dans la majorité des cas, les deux protéines sont traduites à partir d'ORF indépendantes. L'interrogation des banques de données protéiques des génomes bactériens actuellement séquencés montre que certaines bactéries possèdent uniquement un gène codant MsrA ou alors, dans de rares cas aucun gène *msrA* ou *msrB* n'est semble-t-il présent comme dans la bactérie intracellulaire *Chlamydiae muridarum*.

VII. 2 Chez les *archaea*

Une organisation moins complexe est retrouvée chez les *archaea*. Aucune fusion de gène *msr* n'est observée et généralement, les deux gènes *msrA* et *msrB* codent des ORF indépendantes. Dans la majorité des cas, les *archaea* dont les génomes sont connus ne possèdent aucun des deux gènes. C'est le cas par exemple de *Aeropyrum pernix* ou *Archaeoglobus fulgidus*. Ces *archaea* se développent dans des conditions extrêmes à des températures où l'oxygène est peu présent. On pouvait donc supposer que la teneur en FAO étant très faible, exprimer une activité Msr pour ces *archaea*, ne serait pas nécessaire.

Cependant, dans quelques cas d'*archaea* et de bactéries hyperthermophiles, aucun des gènes *msr* n'est présent sans qu'il y ait de corrélation avec le caractère aérobie ou non de l'organisme (Kumar *et al.*, 2002).

VII. 3 Chez les eucaryotes

Comme pour les *archaea*, l'organisation génomique chez les eucaryotes est moins complexe avec des Msr traduites à partir d'ORF indépendantes. Chez les mammifères, en général trois gènes différents codent les MsrB (cas de *H. sapiens*) contrairement à la MsrA qui n'est codée que par un seul gène. Chez des eucaryotes comme, *D. melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*, les gènes *msrA* et *msrB* ne sont présents qu'en une seule copie.

Organisme	Présence <i>msrA</i>	Présence <i>msrB</i>	Organisation génomique
Bactéries			
<i>Escherichia coli</i>	+	+	
<i>B. subtilis</i>	+	+	
<i>S. aureus</i>	+	+	
<i>V. cholerae</i>	+	+	
<i>H. pylori</i>	+	+	
<i>N. meningitidis</i>	+	+	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	+	-	
<i>C. muridarum</i>	-	-	
Archae			
<i>Halobacterium sp</i>	+	+	
<i>Sulfolobus sulfuriticus</i>	+	-	
<i>A. pernix</i>	-	-	
Eucaryotes			
<i>H. sapiens</i>	+	+	

Figure 27 : Représentation des différentes organisations génomiques des gènes *msrA* et *msrB*. Les traits de couleur rouge et bleu représentent, respectivement, les ORF correspondant aux gènes *msrA* et *msrB*. Le trait de couleur verte représente la partie codant le domaine N-terminal du gène de *pilb*, qui a été montré, récemment par notre équipe, participer au recyclage des activités Msr (d'après Wu *et al.*, 2005).

OBJECTIFS

Mon projet initial concernait la caractérisation fonctionnelle de deux domaines de la protéine PilB *N. meningitidis*. Comme décrit dans la partie Introduction, PilB est composée de trois domaines : un domaine central apparenté aux MsrA et des domaines N- et C-terminaux qui étaient de fonction inconnue lorsque ce projet a démarré en 2000. Le fait que les domaines soient fusionnés suggérait un rôle potentiel en synergie, éventuellement dans la régénération de l'activité MsrA. La stratégie retenue pour étudier ces trois domaines a été de les produire en tant qu'entités indépendantes. Dans ce cadre, je me suis intéressé plus particulièrement au domaine central et au domaine C-terminal. Au niveau du domaine MsrA, se posait notamment la question de savoir quel était le mécanisme de régénération de l'activité réductase. En effet, seul le mécanisme de la MsrA d'*E. coli* était connu, qui impliquait la formation de deux ponts disulfures successifs entre les Cys51-Cys198 puis Cys198-Cys206 comme cela a été décrit dans la partie Introduction. Or, la Cys206 n'est pas présente dans la MsrA de *N. meningitidis*. Parallèlement à mon travail, l'équipe du Pr F. Barras à Marseille avait mis en évidence l'existence chez *E. coli* d'une MsrB, qui était homologue en séquence au domaine C-terminal de PilB (Grimaud *et al.*, 2001). Ceci suggérait que ce domaine portait une activité MsrB. La découverte de cette nouvelle activité MsrB posait la question du mécanisme catalytique de cette nouvelle classe de Msr qui ne présente aucune identité de structure primaire avec la classe des MsrA. En particulier, ce mécanisme implique-t-il comme pour les MsrA, la chimie de l'acide sulfénique et le recyclage de l'activité réductase passe-t-il par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire, suivi de sa réduction par la Trx ?

A la suite de ces travaux, mon projet s'est ensuite orienté vers l'étude des MsrB au niveau catalyse, spécificité structurale et relations structure-fonction. L'alignement des structures primaires des MsrB putatives disponibles dans les banques génomiques montre qu'elles présentent entre elles un taux d'identité toujours supérieur à 30% et permet d'identifier plusieurs résidus conservés, pouvant intervenir dans la reconnaissance structurale et/ou dans la catalyse. L'étude du rôle des différents acides aminés conservés a été débutée. Dans ce cadre, je me suis consacré plus particulièrement à l'étude de ceux potentiellement impliqués dans la catalyse. Les MsrA et MsrB ne présentant aucune identité de séquence, les structures tridimensionnelles des MsrA et des MsrB devraient être probablement différentes. Nous avons donc entrepris, en collaboration avec les équipes de Biocristallographie dirigée par le Dr A. Aubry (UMR 7036 CNRS-UHP, Nancy I) et de RMN des protéines dirigée par le

Objectifs

Dr M. T. Cung (UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy I), la détermination de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. meningitidis*.

Le fait que les études de Grimaud *et al.* (Grimaud *et al.*, 2001) avaient montré que l'activité MsrB était également Trx-dépendante suggérait qu'il existait une reconnaissance entre les MsrB et la Trx. Or, assez peu d'informations sont actuellement disponibles sur les interactions spécifiques entre la Trx et ses cibles. Pour aborder cette problématique, il était nécessaire de connaître préalablement quelle était la Cys dans le pont disulfure intramoléculaire des MsrB qui formait un intermédiaire avec la Trx. Cette étude a été menée *via* une collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique dirigé par la Dr A. Van Dorsselaer (UMR 7509 CNRS-ULP, Strasbourg).

Enfin, l'examen des alignements de structures primaires des MsrB montrait la présence, pour environ 50% d'entre elles, de deux motifs CXXC potentiellement impliqués dans la coordination d'un métal. Nous avons entrepris d'étudier le rôle de ce site putatif de fixation du métal. Pour cela, une étude comparative des propriétés catalytiques et structurales des MsrB d'*E. coli* (qui possède les deux motifs CXXC) et de *N. meningitidis* (qui ne possède pas ces deux motifs) et dans laquelle on a introduit les deux motifs CXXC, a été entreprise.

Résultats

PARTIE I :

Mécanisme catalytique et stéréospécificité des Msr de PilB de *N. meningitidis*

Publication n° 1:

**A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani,
A. Van Dorsselaer and G. Branlant. (2002).**

Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of
PILB from *Neisseria meningitidis*.
J. Biol. Chem., **277**, 12016-22.

La protéine PilB est composée de 533 acides aminés incluant la séquence peptide signal. C'est une protéine à trois domaines : un domaine N-terminal d'environ 140 acides aminés avec une signature CXXC qui était de fonction inconnue lorsque j'ai débuté ma thèse, un domaine central d'environ 200 acides aminés homologue aux MsrA et un domaine C-terminal d'environ 180 acides aminés homologue aux MsrB. L'alignement de la séquence du domaine MsrA avec les séquences des MsrA disponibles dans les banques montrait la présence de deux résidus Cys, un en position équivalente à la Cys51 catalytique de la MsrA d'*E. coli*, l'autre en position équivalente à la Cys198 de recyclage (Figure 28). Ceci suggérait que le mécanisme de la MsrA de *N. meningitidis* devait être similaire à celui précédemment décrit pour la MsrA d'*E. coli*, mais avec formation d'un seul pont disulfure entre les Cys51 et 198, réductible par la Trx.



Figure 28 : Alignement des séquences protéiques de PilB *N. meningitidis*, de la MsrA et de la MsrB d'*E. coli*. Les séquences ont été alignées via l'utilisation du logiciel Bioedit. Les numérotations des acides aminés sont basées sur la numérotation de la séquence de la MsrA d'*E. coli* pour le domaine central de PilB (numérotation rose) et de la MsrB d'*E. coli* pour le domaine C-terminal (numérotation verte). Les résidus Cys sont indiqués en rouge et les résidus conservés $\geq 90\%$ sont indiqués en bleu. Les étoiles rouges indiquent la position des résidus Cys impliqués dans le mécanisme catalytique (positions 51, 198 et 206 pour MsrA, et 117 et 63 pour MsrB).

Le fait que les études de Grimaud *et al.* (Grimaud *et al.*, 2001) avaient montré que l'activité MsrB était également dépendante de la Trx suggérait un mécanisme des MsrB semblable à celui des MsrA avec passage par un intermédiaire acide sulfénique suivie d'un pont disulfure. La comparaison des séquences des différentes MsrB putatives disponibles dans les banques montrait la conservation d'un résidu Cys, en position équivalente à la Cys117 de la MsrB d'*E. coli* prise comme référence pour la numérotation. C'est sur cette Cys que devait se former l'intermédiaire acide sulfénique. La MsrB de *N. meningitidis* possède en plus une seconde Cys en position équivalente 63 (60% des MsrB), qui pouvait intervenir dans le mécanisme de recyclage.

La stratégie utilisée pour étudier le mécanisme et la spécificité de substrat de ces deux Msr de *N. meningitidis* a été de produire par une approche d'ingénierie protéique chaque domaine séparément sous forme soluble.

I. Mécanisme catalytique des Msr de *N. meningitidis*

Nous avons montré que ces deux Msr présentent un mécanisme de réduction du sulfoxyde de la MetSO *via* la Cys catalytique, passant par un intermédiaire acide sulfénique similaire à ce qui avait été décrit pour la MsrA d'*E. coli* (Boschi-Muller *et al.*, 2000). Ce mécanisme implique deux résidus Cys : la Cys catalytique (position 51 pour la MsrA et 117 pour la MsrB) et une Cys de recyclage (position 198 pour la MsrA et 63 pour la MsrB) (Figure 28, p. 75).

Pour les deux enzymes, en absence de réducteur, une mole de Met est formée par mole d'enzyme avec une perte concomitante de deux groupements thiols. Ce résultat suggère un mécanisme passant par la formation d'un pont disulfure entre la Cys catalytique et la Cys de recyclage. Une mole de Met par mole d'enzyme est également formée avec le mutant protéique Ser de la Cys de recyclage avec la perte concomitante d'un groupement thiol, alors qu'aucune formation de Met est observée avec le mutant protéique Ser de la Cys catalytique. L'ensemble de ces résultats suggère la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys catalytique et la régénération de la Cys catalytique par un processus à deux étapes incluant, 1) la formation d'un pont disulfure avec la Cys de recyclage et; 2) la réduction de ce pont disulfure par la Trx.

La présence de l'intermédiaire acide sulfénique a été prouvée sur les mutants protéiques MsrA et MsrB de la Cys de recyclage en utilisant des agents chimiques spécifiques de la fonction acide sulfénique : le 3-carboxy 4-nitro benzèthiol (TNB⁻) et la dimédone. Ce résultat constitue, pour la classe des MsrB, la première mise en évidence d'un mécanisme catalytique, impliquant la chimie de l'acide sulfénique. Le fait que le mécanisme passe par cet intermédiaire pour l'ensemble des Msr caractérisées à ce jour, montre la généralité de la chimie de l'acide sulfénique dans le mécanisme de réduction d'un sulfoxyde par un thiol. Ce mécanisme original est maintenant définitivement admis par la communauté scientifique. Il confirme l'importance de la chimie de l'acide sulfénique associée au stress oxydant tant au niveau des processus de détoxication des entités peroxydes que dans la transmission de messages de transduction ou dans le contrôle transcriptionnel *via* des facteurs de transcription.

En présence de Trx, une activité de recyclage est observée avec les Msr sauvages mais pas avec les mutants protéiques Ser de la Cys de recyclage. Ceci montre que, 1) la régénération de la Cys catalytique passe par la formation d'un pont disulfure avec la Cys de recyclage, qui est ensuite réduit par la Trx et; 2) l'intermédiaire acide sulfénique formé sur la Cys catalytique n'est pas réductible par la Trx. Ce résultat est en accord avec le fait que généralement un acide sulfénique dans un site actif n'est pas réductible par la Trx, excepté deux cas cités dans la littérature qui sont les protéines BCP et Prx1p (Jeong *et al.*, 2000; Pedrajas *et al.*, 2000). Ceci peut s'expliquer soit par une non-accessibilité de l'acide sulfénique présent dans le site actif des Msr, soit plus probablement par la formation de complexes non productifs entre les mutants protéiques Ser de la Cys de recyclage et la Trx.

II. Spécificité de substrat des Msr de *N. meningitidis*

La stratégie choisie a consisté à déterminer les constantes catalytiques à l'état stationnaire et à saturation en Trx, des deux Msr de *N. meningitidis* en présence de différents substrats sulfoxydes, synthétisés en grande partie par le groupe de chimie des peptides dirigé par le Dr M. Marraud (UMR 7568 CNRS-INPL).

Tout d'abord, pour étudier la stéréospécificité de substrat des Msr, les substrats utilisés ont été les quatre diastéréoisomères de MetSO en mélange ou purs. Nous avons ainsi montré que les MsrA et les MsrB présentent une stéréosélectivité inverse vis-à-vis de la configuration

Résultats Partie I

de la fonction sulfoxyde. En effet, un mélange de *D,L*-Met-*R,S*-SO est totalement réduit par une protéine fusion contenant les domaines MsrA et MsrB. Au contraire, seulement 50% du mélange est réduit en présence de MsrA ou de MsrB. De plus, seuls les isomères *S* de *L*-MetSO et *D*-MetSO sont totalement réduits par MsrA, alors que MsrB ne réduit que les isomères *R* de *L*-MetSO et *D*-MetSO. Ces résultats confortaient les résultats obtenus par Grimaud *et al.* sur la calmoduline oxydée avec la MsrB d'*E. coli* (Grimaud *et al.*, 2001), et montraient que les MsrB sont stéréospécifiques de l'isomère *R* de la fonction sulfoxyde de la MetSO alors que la MsrA est stéréospécifique de l'isomère *S*. *In vivo*, cette énantiosélectivité présente un grand avantage puisqu'elle permet une complète régénération des Met.

D'autre part, des analogues de MetSO ont été utilisés afin de voir l'influence de la présence ou non des groupements amine et carboxylate libres portés par le C α (Tableau 2, p. 79). La détermination des constantes catalytiques pour les isomères de MetSO qui sont substrats montre que la configuration du C α n'est pas déterminante pour la reconnaissance Msr/substrat des deux Msr (le K_M est diminué d'un facteur 3 entre les isomères *D* et *L* pour la MsrA, et 6 fois pour la MsrB). Par contre, l'efficacité catalytique des MsrB est au moins 60 fois plus faible que celle des MsrA en présence de MetSO ($k_{cat}/K_M = 1200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la MsrA contre $19 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la MsrB). Elle est nettement augmentée pour les deux Msr en présence d'un substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe, qui mime une MetSO incluse dans une chaîne peptidique, par un effet K_M uniquement (facteur 7 pour MsrA et 32 pour MsrB). Ces résultats suggèrent que les sites actifs des MsrA et MsrB sont mieux adaptés pour reconnaître des MetSO incluses dans un polypeptide que des MetSO libres. Il est à noter qu'il serait nécessaire de déterminer l'ensemble des constantes catalytiques à l'état préstationnaire. En effet, l'étape réductase n'étant pas globalement cinétiquement limitante, les valeurs de K_M trouvées des substrats ne sont pas représentatives de l'affinité dans la première étape (au niveau de cette dernière, les constantes d'affinité apparentes seront plus élevées) (voir partie II).

L'étude de la MsrB a été complétée par l'utilisation d'analogues modifiés sur la chaîne latérale afin de voir l'influence, 1) de la longueur de la chaîne latérale de la MetSO (substrat Cys-méthyl et Met-éthyl) et; 2) de la présence de la fonction sulfoxyde (substrat non oxydé). Les paramètres cinétiques obtenus pour la MsrB de *N. meningitidis* sont présentés dans le tableau 2, p. 79. Le fait que, 1) l'isomère, qui n'est pas substrat, n'est pas inhibiteur, et donc qu'il ne se fixe pas dans le site actif, 2) la Met, même en large excès, n'est pas inhibitrice, et donc ne se fixe pas, 3) la substitution du groupement méthyle terminal de la chaîne latérale de

la MetSO par un groupement éthyle plus encombrant (un groupement CH₂ supplémentaire) entraîne une forte augmentation du K_M et; 4) l'analogue Cys-éthyle sulfoxyde a une affinité plus faible que la MetSO suggère fortement que, a) la structure des sites actifs des MsrA et MsrB sont différents, b) la présence de l'oxygène est essentielle à la fixation du substrat, c) la présence d'au moins 2 carbones entre le C α et le soufre est nécessaire à une bonne reconnaissance et; d) il doit exister une poche hydrophobe sélective pour la reconnaissance du groupement méthyle terminal de la chaîne latérale de la MetSO. Des résultats similaires à ceux-ci ont été obtenus avec la MsrA d'*E. coli*.

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} / K_M (M ⁻¹ · s ⁻¹)
<i>L</i> -Met- <i>R</i> -SO (R' = CH ₂ -CH ₂ -SO-CH ₃)	0,36	19	19 ± 6
Ac- <i>L</i> -Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	0,46	1,2	380 ± 60
<i>L</i> -Gly- <i>L</i> -Met- <i>R,S</i> -SO- <i>L</i> -Gly	0,29	1,0	290 ± 60
<i>L</i> -Ethionine- <i>R,S</i> -SO (R' = CH ₂ -CH ₂ -SO-CH ₂ -CH ₃)	N. D	> 150	N. D
<i>L</i> -Cystéine- <i>R,S</i> -SO (R' = CH ₂ -SO-CH ₃)	N. D	> 150	N. D

Tableau 2 : Paramètres cinétiques déterminés à l'état stationnaire pour la MsrB de *N. meningitidis* sauvage en présence du système couplé Trx/Trx réductase/NADPH pour différents analogues de substrat de la MetSO. Les mesures ont été réalisées à une température constante de 25°C dans le tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. La concentration en MsrB varie de 2 à 6 μM selon le substrat considéré. Les concentrations en Trx, Trx réductase, et NADPH sont respectivement de 200 μM, 2,56 μM et 30 mM. Les paramètres cinétiques ont été obtenus après ajustement selon l'équation de Michaelis-Menten. N. D = non déterminé.

III. Publication n° 1: A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorselaer and G. Branlant. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, **277, 12016-22.**

Characterization of the Methionine Sulfoxide Reductase Activities of PILB, a Probable Virulence Factor from *Neisseria meningitidis**

Received for publication, December 24, 2001, and in revised form, January 24, 2002
Published, JBC Papers in Press, January 25, 2002, DOI 10.1074/jbc.M112350200

Alexandre Olry‡, Sandrine Boschi-Muller‡, Michel Marraud§, Sarah Sanglier-Cianferani¶, Alain Van Dorsselear¶, and Guy Branlant‡¶

From the ‡UMR CNRS-UHP 7567, Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Blvd. des Aiguillettes, BP 239, Vandoeuvre-les-Nancy 54506, France, §UMR CNRS-INPL 7568, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, Groupe ENSIC, 1 rue Granville, BP 451, Nancy 54001, France, and ¶UMR CNRS-ULP 7509, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Université Louis Pasteur, 25 rue Becquerel, Strasbourg 67087, France

PILB has been described as being involved in the virulence of bacteria of *Neisseria* genus. The PILB protein is composed of three subdomains. In the present study, the central subdomain (PILB-MsrA), the C terminus subdomain (PILB-MsrB), and the fused subdomain (PILB-MsrA/MsrB) of *N. meningitidis* were produced as folded entities. The central subdomain shows a methionine sulfoxide reductase A (MsrA) activity, whereas PILB-MsrB displays a methionine sulfoxide reductase B (MsrB) activity. The catalytic mechanism of PILB-MsrB can be divided into two steps: 1) an attack of the Cys-494 on the sulfur atom of the sulfoxide substrate, leading to formation of a sulfenic acid intermediate and release of 1 mol of methionine/mol of enzyme and 2) a regeneration of Cys-494 via formation of an intradisulfide bond with Cys-439 followed by reduction with thioredoxin. The study also shows that 1) MsrA and MsrB display opposite stereoselectivities toward the sulfoxide function; 2) the active sites of both Msrs, particularly MsrB, are rather adapted for binding protein-bound MetSO more efficiently than free MetSO; 3) the carbon C α is not a determining factor for efficient binding to both Msrs; and 4) the presence of the sulfoxide function is a prerequisite for binding to Msrs. The fact that the two Msrs exhibit opposite stereoselectivities argues for a structure of the active site of MsrBs different from that of MsrAs. This is further supported by the absence of sequence homology between the two Msrs in particular around the cysteine that is involved in formation of the sulfenic acid derivative. The fact that the catalytic mechanism takes place through formation of a sulfenic acid intermediate for both Msrs supports the idea that sulfenic acid chemistry is a general feature in the reduction of sulfoxides by thiois.

Escherichia coli, *Streptococcus pneumoniae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Mycoplasma genitalium*, and *Neisseria gonorrhoeae* (1–4). Inspection of the alignment of the corresponding protein sequences shows that all possess in common a sequence that displays an MsrA activity. This MsrA activity has now been well characterized at the structural level (5, 6) and the enzymatic level (7). In particular, a sulfenic acid intermediate has been shown to be formed on Cys-51 of *E. coli* MsrA during the reduction of the sulfoxide function of methionine sulfoxide (MetSO). The active site can be represented as an open basin in which Cys-51, located at the N terminus of an α -helix, is accessible. Compared with the *E. coli* MsrA, the MsrAs from *S. pneumoniae* and from *N. meningitidis* or *N. gonorrhoeae* (called PILB) contain, in addition, an extension at the C terminus and at the C and N termini, respectively. This raised the question of the role of these extensions, in particular of the C-terminal extension. Sequence comparisons of the C-extension of PILB show amino acid identities with open reading frames of which no function has been assigned until recently. These sequences are detected in all kingdoms. Recently, the functions of the *E. coli* ortholog YeaA and an open reading frame downstream from the *msrA* gene from *Staphylococcus aureus*, which both have at least 50% amino acid identities with the C-subdomain of PILB, has been determined and shown to display a new Msr activity, called MsrB (8, 9).

The fact that the MsrB activity of YeaA is thioredoxin-dependent (8) indicates that at least a Cys residue is involved in the catalytic mechanism. Inspection of the amino acid sequences shows that two Cys are often conserved in putative MsrBs (see Fig. 1). One Cys, Cys-439, which is located in a CGWP(S/A)F motif is at least 50% conserved. The second one, Cys-494, which is included in an RYC(I/V/M)N motif is almost conserved.

In the present study, we show that in addition to an MsrA activity that is displayed by the central subdomain, called PILB-MsrA, the C terminus of PILB, called PILB-MsrB, possesses a thioredoxin-dependent MsrB activity. The catalytic mechanism of PILB-MsrB is shown to proceed via the sulfenic acid chemistry. The role of Cys-439 and Cys-494 has been demonstrated. The stereoselectivity in the reduction of the sulfoxide function and the catalytic parameters of the two subdomains have also been determined. The results are in favor of a structure of the active site of MsrBs different from that of the MsrAs.

Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA)¹ activity is described as being involved in the virulence of the pathogens

* This work was supported by the Center National de la Recherche Scientifique ("Programme Physique et Chimie du Vivant 2000"), the University Henry Poincaré, Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grants ARC No. 5436 and 4393), and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-83-91-20-97; Fax: 33-3-83-91-20-93; E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

¹ The abbreviations used are: Msr, MsrA, and MsrB, methionine sulfoxide reductase, methionine sulfoxide reductase A, and methionine sulfoxide reductase B, respectively; dimedone, 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione; DTT, dithiothreitol; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzo-

ate; MetSO, methionine sulfoxide; Pht, phthalyl; TNB⁻, thionitrobenzoate (3-carboxy-4-nitrobenzenthio); HPLC, high pressure liquid chromatography.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructions, Site-directed Mutageneses, Production, and Purification of Wild-type and Mutant *N. meningitidis* PILB—Plasmids pSKPILBMsra, pSKPILBMsrb, and pSKPILBMsraMsrb, designed for PILB-Msra, PILB-Msrb, and PILB-Msra/Msrb production, respectively, were obtained by cloning internal fragments of the PILB open reading frame synthesized by PCR (sequences of oligonucleotides not shown) using *N. meningitidis* Z2491 genomic DNA, kindly provided by Dr. M. K. Taha, into the plasmid pDB125KSNN² between the *Nde*I and *Sac*I sites. Site-directed mutageneses were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

The *E. coli* strain used for all Msr productions was HB101 (supE44, hsdS20 (r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1) transformed with the plasmidic construction containing the coding sequence under the *lac* promoter.

For PILB-Msrs purification, cells were harvested by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) containing 20 mM dithiothreitol (DTT) and sonicated. The Msrs were then precipitated at 40, 50, and 60% ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) saturation for PILB-Msra/Msrb, PILB-Msra, and PILB-Msrb, respectively. The contaminating proteins were removed by applying the enzymatic solutions onto exclusion size chromatography on ACA 54 resin at pH 8 (buffer A). Purified fractions were then pooled and applied onto a Q-Sepharose column equilibrated with buffer A, followed by a linear gradient of KCl (0–0.4 M) using a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences). The PILB-Msra/Msrb was eluted at 100 mM KCl, whereas the PILB-Msra and PILB-Msrb passed through. PILB-Msra and PILB-Msrb were further purified on phenyl-Sepharose (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A, containing 1 M (NH₄)₂SO₄. PILB-Msrs were eluted with a linear gradient from 1 to 0 M in buffer A.

At this stage, wild-type PILB-Msra/Msrb and wild-type and mutant PILB-Msras and PILB-Msrb were pure as checked by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gel (10) followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses.

Purified enzymes were stored at -20 °C in the presence of 50 mM DTT and 60% (NH₄)₂SO₄. Under these conditions, the enzymes were stable for several weeks. Their molecular concentration was determined spectrophotometrically, using theoretical extinction coefficients at 280 nm deduced from the method of Scopes (11) (*i.e.* 26,200 M⁻¹·cm⁻¹ for wild-type and mutant PILB-Msras, 17,330 M⁻¹·cm⁻¹ for wild-type and mutant PILB-Msrb, and 42,300 M⁻¹·cm⁻¹ for wild-type PILB-Msra/Msrb).

Preparation of L-Met-S-SO, L-Met-R-SO, D-Met-S-SO, D-Met-R-SO, L-Met-R,S-SO-NHMe, Ac-L-Met-R,S-SO, and Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe—The L-Met-S-SO and D-Met-R-SO enantiomers were prepared according to Holland *et al.* (12). L- and D-methionine were treated with phthalic (Pht) anhydride using the method of Bose (13) to give Pht-L-Met-OH and Pht-D-Met-OH in 90–95% yields, respectively. Oxidation of Pht-L-Met-OH and Pht-D-Met-OH was carried out in methanol with H₂O₂ and afforded the sulfoxide in a nearly equimolar (*S/R*)-composition as revealed by the split C¹³ proton singlet in CDCl₃/Me₂SO-*d*₆ 4:1 (2.487 ppm for the heterochiral and 2.483 ppm for the homochiral diastereomers). Both Pht-L-Met-S-SO and Pht-D-Met-R-SO enantiomers were obtained by crystallization from methanol. The absolute configuration of the isomer *R* was confirmed by x-ray diffraction on single crystals.³ The phthalic protecting group was eliminated with hydrazine hydrate in ethanol, and the L-Met-S-SO and D-Met-R-SO enantiomers were recovered by precipitation from water with acetone.

On the other hand, it was not possible by crystallization to obtain Pht-L-Met-R-SO and Pht-D-Met-S-SO enantiomers in a pure form. In both cases, the resulting sulfoxides were found to contain about 25% of the other isomer. Therefore, L-Met-R-SO and D-Met-S-SO were isolated from the L-Met-R,S-SO and D-Met-R,S-SO diastereomers by consuming the other isomer by enzymatic reduction with PILB-Msra and PILB-Msrb, respectively. The experimental conditions were 100 mM DTT, 500 μM Msr, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8, and the reaction mixtures were incubated overnight at 25 °C. Each MetSO isomer was then separated from Met on a 25-cm sephasil C18 reverse phase column on an ÄKTA explorer system (Amersham Biosciences) equilibrated with H₂O/trifluoroacetic acid 0.1% buffer in the presence of 10% acetonitrile. Met was eluted isocratically after MetSO. The fractions corresponding to each sulfoxide isomer were pooled and concentrated in order to eliminate acetonitrile and trifluoroacetic acid.

L-Met-R,S-SO-NHMe and Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe were classically prepared (14) from *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-Met-OH via the mixed anhydride with Me₂CHCH₂OCOCi/NEt(CHMe₂)₂ and MeNH₂. Treatment of the resulting *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-Met-NHMe with 3 N HCl in EtOAc gave L-Met-NHMe, which was acetylated with AcCl/CHMe₂ into Ac-L-Met-NHMe. Oxidation of L-Met-NHMe and Ac-L-Met-NHMe with H₂O₂ in methanol (12) resulted in L-Met-R,S-SO-NHMe and Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. Ac-L-Met-R,S-SO was purchased from Bachem.

Quantification of the Free Cysteine Content with 5,5'-Dithiobis(2-nitro)benzoate (DTNB)—Cysteine content was determined using DTNB under non-denaturing (buffer A) and denaturing conditions (final concentration of 1% SDS in buffer A), either in the absence or in the presence of 150 mM DL-Met-R,S-SO without the addition of any exogenous reducing system as previously described by Boschi-Muller *et al.* (7).

Determination of Msr Activity in the Presence of DTT—Msrs activities were determined with DL-Met-R,S-SO as a substrate at a concentration of 150 mM. The reaction mixture also contained 10 mM DTT and 5 μM wild-type PILB-Msra/Msrb or wild-type or mutant PILB-Msra or PILB-Msrb in buffer A.

Initial rate measurements were carried out at 25 °C by following the appearance of free methionine measured by HPLC. To do so, aliquots of the reaction mixture were removed at different times of incubation up to 2.5 min, and the reaction was stopped by the addition of trifluoroacetic acid to a final concentration of 1%. In each aliquot, the quantity of Met formed was measured as previously described by Boschi-Muller *et al.* (7).

Enzyme Kinetics in the Presence of Thioredoxin—The ability of wild-type and mutant PILB-Msras and PILB-Msrb and of wild-type PILB-Msra/Msrb to reduce substrates was assayed in the presence of 1.28 μM *E. coli* thioredoxin reductase, 0.3 mM NADPH, and various concentrations of *E. coli* thioredoxin in buffer A.

Thioredoxin and thioredoxin reductase from *E. coli* were prepared following experimental procedures already published (15, 16).

Initial rate measurements were carried out at 25 °C on a Kontron Uvikon 933 spectrophotometer by following the decrease of the absorbance at 340 nm. The initial rate data were fitted to the Michaelis-Menten relationship using least squares analysis to determine *k*_{cat} and *K*_m. All *K*_m values were determined at saturating concentrations of the other substrate.

Stoichiometry of Met Formation in the Absence of a Regenerating System—The reaction mixture, containing 150 mM DL-Met-R,S-SO and a 100–500 μM concentration of wild-type or mutant PILB-Msra or PILB-Msrb or wild-type PILB-Msra/Msrb, was incubated at 25 °C for 10 min in buffer A. Then the Met formed was quantified as previously described by Boschi-Muller *et al.* (7).

Characterization of the Sulfenic Acid Intermediate—The sulfenic acid intermediate was characterized spectrophotometrically by using thionitrobenzoate (TNB⁻) under non-denaturing conditions and by mass spectrometry analyses after modification (or no modification) with 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (dimedone).

For spectrophotometric characterization, TNB⁻ was prepared by reducing the corresponding disulfide using the procedure of Silver (17). Progress curves of TNB⁻ disappearance for wild-type and mutant PILB-Msras and PILB-Msrb were recorded at 412 nm in buffer A. Enzyme concentrations were 7.35 and 14.7 μM, and the TNB⁻ concentration was 60 μM. The amount of TNB⁻ consumed was calculated using an extinction coefficient at 412 nm of 13,600 M⁻¹·cm⁻¹.

For spectrometric characterization, analyses were performed for wild-type and mutant PILB-Msras and PILB-Msrb, either after modification or not by D,L-Met-R,S-SO and dimedone. All of the modification reactions were performed in buffer A in the presence of 20 μM enzyme. D,L-Met-R,S-SO was added at a concentration of 150 mM, and the mixture was incubated 10 min at 25 °C. Then dimedone at a concentration of 20 mM was added, and the mixture was incubated overnight in the dark at room temperature. Mass spectrometric measurements were performed on a LCT electrospray time-of-flight mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). For mass analysis in denaturing conditions, Msr samples were diluted to 10 μM in a 1:1 water/acetonitrile mixture (v/v) containing 1% formic acid. Samples were continuously infused into the ion source at a flow rate of 5 μl/min. Spectra were recorded in the positive ion mode in the mass range 400–4000 *m/z*, after calibration of the instrument with a solution of horse heart myoglobin (Sigma) diluted to 2 μM in the 1:1 water/acetonitrile (1% formic acid) mixture.

² S. Marchal, personal communication.

³ C. Didierjean, unpublished results.

Msr Activities of PILB from *N. meningitidis*

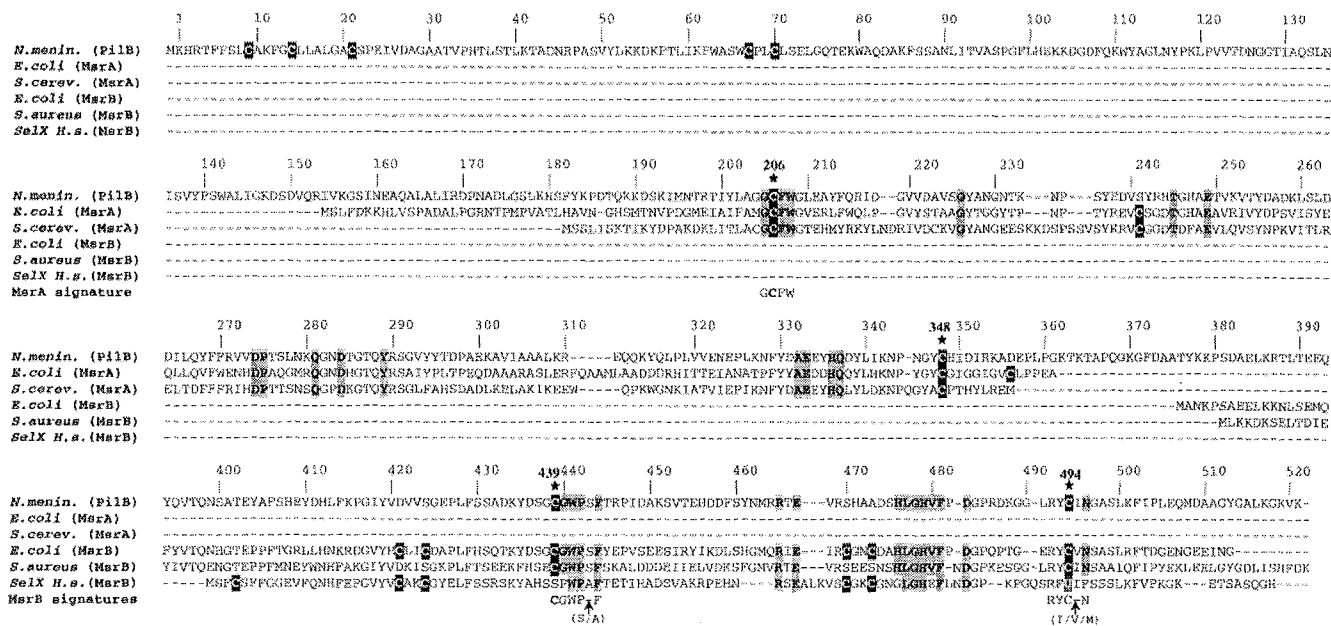


FIG. 1. Sequence alignment of *N. meningitidis* PILB, *E. coli*, and *S. cerevisiae* MsrAs and *E. coli*, *S. aureus*, and *Homo sapiens* MsrBs. The sequences of PILB from *N. meningitidis* (*N. meningitidis*), of MsrAs from *E. coli* and *S. cerevisiae* (*S. cerev.*), and of the MsrBs from *E. coli*, *S. aureus*, and *H. sapiens* (*selX H.s.*) were aligned with Bioedit software. The numbering of amino acid residues indicated is based on the numbering of the *N. meningitidis* PILB sequence. The cysteine residues are shown in white on black boxes, and conserved residues in all putative Msr sequences ($\geq 90\%$ in 35 MsrA sequences and in 64 MsrB sequences) are shown in black on gray boxes. Black stars indicate the positions of the four catalytic Cys residues of *N. meningitidis* MsrA (Cys-205 and Cys-348) and MsrB (Cys-439 and Cys-494). Sequence signatures around Cys-205 (at least 90% invariant), around Cys-439 (at least 50% invariant), and around Cys-494 (at least 90% invariant) are also indicated below the alignment.

RESULTS AND DISCUSSION

Justification of the Truncations on PILB

PILB contains 522 amino acids and is composed of three subdomains. The N-subdomain is suggested to encode a disulfide oxidoreductase. The central subdomain is an ortholog to *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* MsrAs, whereas the C-subdomain displays high sequence similarities to *E. coli* and *S. aureus* MsrBs (Fig. 1).

Truncation after the N-subdomain—Sequence comparisons show that at least two MsrAs from *S. pneumoniae* and *Bacillus subtilis* (Pedant code gi_14972133 and gi_2634588) and one recently produced by truncation of the N terminus of *E. coli* MsrA (18) have an N terminus starting from the position corresponding to amino acid 196 of PILB. All three MsrAs were shown to be active (1, 18, 19). Thus, truncation was done after position 194 of PILB. The PILB-MsrA/MsrB protein (amino acids 195–521) was produced in a soluble form.

Truncations between MsrA and MsrB Subdomains on PILB
Truncated at the N-subdomain—Two plasmidic constructs were used to produce soluble MsrA and MsrB subdomains. In the first construct, the truncation was done after position 388 of PILB which corresponds to the N terminus of putative MsrB from *Klebsiella pneumoniae* (Pedant code b_kpn.contig523orf8). In this case, the PILB-MsrA (amino acids 195–388) was produced in a soluble form, whereas the truncated form corresponding to the MsrB subdomain (amino acids 390–521) was not soluble. Thus, to obtain a soluble form of the MsrB subdomain, another construct was used, where truncation was done after position 375 of PILB, which corresponds to the N terminus of the putative *Sinorhizobium meliloti* MsrB (NCBI accession number AE007290.1) and of the *E. coli* MsrB (8). In this case, PILB-MsrB was produced in a soluble form (amino acids 376–521). Such a result suggests that both Msrs fold independently within PILB. This is also consistent with the fact that the two genes are often located at different positions on chromosomal DNAs.

Biochemical Properties of MsrA, MsrB, and MsrA/MsrB Subdomains of PILB

Truncated PILB variants and their mutants were overexpressed in an *E. coli* strain using the corresponding DNA sequences under the *lac* promoter. All forms of PILB variants were obtained pure as judged by SDS-PAGE gels and mass spectrometry analyses.

DTNB reagent revealed four Cys for PILB-MsrA/MsrB and two Cys for both PILB-MsrA and PILB-MsrB under denaturing conditions (Table I). These results are in agreement with the PILB DNA sequence that indicates four Cys at positions 206 and 348 in PILB-MsrA and at positions 439 and 494 in PILB-MsrB. Under native conditions, all of the Cys were also reactive regardless of the subdomains. This shows that 1) both Cys of the MsrA subdomain are easily accessible, similar to what is described for *E. coli* MsrA; 2) both Cys of the MsrB subdomain are also accessible; and 3) the accessibility in PILB-MsrA/MsrB of each couple of Cys within each domain is not significantly altered by the presence of the second subdomain. This again supports an independent folding of each subdomain.

Stoichiometry of Methionine Formation and Thioredoxin Recycling Activity

The PILB-MsrA Subdomain—Stoichiometry of methionine formation was determined in the absence of reductant (Table II). One mol of methionine was formed with a loss of two thiols, which is in agreement with formation of a disulfide bond between Cys-206 and Cys-348. One mol of methionine was also formed with mutant C348S with a loss of one thiol, whereas no methionine was formed with mutant C206S. In the presence of thioredoxin, a recycling activity was observed with PILB-MsrA wild type but not with the mutants (Table II). Together, these results are in agreement with formation of a sulfenic acid on Cys-206 and regeneration of Cys-206 via formation of an internal disulfide bond with Cys-348 followed by its reduction by

TABLE I

Free sulfhydryl content of wild-type and Cys to Ser mutants of *N. meningitidis* PILB-MsrA and PILB-MsrB and PILB-MsrA/MsrB wild type

The values indicated represent the average of two independent measurements of at least two enzyme concentrations (S.D. range 10%). Cysteine content was determined spectrophotometrically using DTNB under non-denaturing and denaturing conditions (10% SDS), in the absence or in the presence of 150 mM DL-Met-R,S-SO without any regenerating system (see "Experimental Procedures"). Data presented in the table are those obtained under non-denaturing conditions. Data obtained under denaturing conditions are identical but are not presented for reasons of clarity of the table.

Enzyme	No. of Cys	No. of Cys measured			
		Without DL-Met-R,S-SO	With DL-Met-R,S-SO	Decrease in free thiols ^a	
				Calculated	Theoretical
<i>mol Cys/mol enzyme</i>					
PILB-MsrA	2	1.9	0.1	1.8	2
C206S PILB-MsrA	1	1.0	1.0	0	0
C348S PILB-MsrA	1	0.9	0	0.9	1
PILB-MsrB	2	2.0	0.1	1.9	2
C439S PILB-MsrB	1	1.0	0.1	0.9	1
C494S PILB-MsrB	1	1.0	1.0	0	0
PILB-MsrA/MsrB	4	4.0	0.4	3.6	4

^a The difference in the number of free cysteine thiols upon treatment with DL-Met-R,S-SO versus no treatment.

TABLE II

Stoichiometry of Met formed in the absence of regenerating system and enzymatic activity with DTT or thioredoxin as reductant

The values indicated represent the average of three independent measurements of at least two enzyme concentrations (S.D. range 10%). The quantity of Met formed for stoichiometry determination was determined by HPLC, after reaction with 150 mM DL-Met-R,S-SO without any regenerating system as described under "Experimental Procedures." The activities of wild-type and mutant enzymes were assayed with 150 mM DL-Met-R,S-SO, 10 mM DTT, and 5 μM enzyme or with 150 mM DL-Met-R,S-SO, 200 μM thioredoxin, 1.28 μM thioredoxin reductase, and 0.5–5.0 μM enzyme as described under "Experimental Procedures." NA, no activity ($<6 \cdot 10^{-2}$ μmol/min/μmol).

Enzyme	Stoichiometry	Activity with DTT		Activity with thioredoxin
	<i>mol Met formed/mol enzyme</i>	<i>μmol Met formed/min/μmol enzyme</i>		<i>μmol Met formed/min/μmol enzyme</i>
PILB-MsrA	0.9	3		220
C206S PILB-MsrA	0	NA		NA
C348S PILB-MsrA	0.9	37		NA
PILB-MsrB	1.0	3		12
C439S PILB-MsrB	1.0	36		NA
C494S PILB-MsrB	0	NA		NA
PILB-MsrA/MsrB	1.8	4.2		170

thioredoxin. This is a situation similar to that described for *E. coli* MsrA except that the Cys-206–Cys-348 bond (equivalent to the Cys-51–Cys-198 bond in *E. coli* MsrA) is reducible by thioredoxin in PILB-MsrA, whereas only the Cys-198–Cys-206 bond is reducible in *E. coli* MsrA. Such a difference remains to be explained. Further evidence of the formation of a sulfenic acid comes from the use of TNB⁻ and dimedone, which are specific reagents for sulfenic acid. In the case of mutant C348S, in which no disulfide bond can be formed, a decrease of the absorbance at 410 nm by 1 eq of TNB⁻/mol was observed when the mutant was first incubated with MetSO and then treated with an excess of TNB⁻ (Table III). Incubation of mutant C348S with MetSO and a subsequent addition of dimedone led to an increased mass of 138 Da. This increase is that expected if a covalent adduct is formed with dimedone.

The PILB-MsrB and MsrA/MsrB Subdomains—One mol of methionine per mol of PILB-MsrB was formed in the absence of reductant. Moreover, the loss of thiols was in agreement with formation of a disulfide bond between Cys-439 and Cys-494 (Table I). To investigate the role of Cys-439 and Cys-494, mutations of these residues into Ser were done. Substituting Ser for Cys-494 abolished any activity, whereas the mutant C439S showed a reductase activity with a stoichiometry of 1 mol of methionine in the absence of DTT (Table II). When the mutant C439S was incubated with MetSO in the absence of DTT and then treated with TNB⁻, a decrease of the absorbance at 410 nm equivalent to that of 1 mol of TNB⁻ was observed. Moreover, when the mutant was incubated under the same conditions and then subsequently treated with dimedone, a mass increase of 154 Da was observed instead of the expected value of 138 Da. This difference of 16 Da remains to be explained. A possibility is that, under the experimental conditions used, the

sulfide that is formed on MsrB can be easily oxidized into sulfoxide (Table III). In the presence of thioredoxin, a recycling activity was observed with wild-type PILB-MsrB but not with the mutants (Table II). Altogether, these results show that 1) the C-terminal subdomain of PILB displays an Msr activity; 2) the mechanism involves formation of a sulfenic acid intermediate; 3) the essential Cys involved in reduction of MetSO and in formation of the sulfenic acid derivative is Cys-494; and 4) the regeneration of Cys-494 is done via formation of a disulfide bond with Cys-439 followed by its reduction by thioredoxin. This mechanism is reminiscent of that described for MsrA from *E. coli* except that only one intradisulfide bond is formed in MsrB of PILB for regenerating the active Cys-494. The fact that no thioredoxin-recycling process was observed in mutant C439S indicates that, similar to MsrA and more generally to all mechanisms where a sulfenic acid is formed except for the BCP protein and Prx1p (20, 21), the sulfenic acid intermediate formed in MsrB cannot be reduced via a double displacement mechanism involving formation of a disulfide bridge between Cys-494 and Cys-32 of thioredoxin followed by formation of a disulfide bond between Cys-32 and Cys-35 of thioredoxin and release of Cys-494. The fact that an efficient recycling activity was observed on mutant C439S with DTT as a reductant (Table II) indicates that DTT can easily attack the sulfenic acid intermediate on Cys-494 in contrast to thioredoxin. Thus, this supports a nonaccessibility of the sulfenic acid within the active site of PILB-MsrB to thioredoxin. In this context, knowledge of the three-dimensional structure of MsrB under the sulfenic acid intermediate state will be informative.

When PILB-MsrA/MsrB was tested in the absence of reductant, 2 mol of methionine per mol of subdomain were formed with a loss of four thiols (Tables I and II). These results indicate

TABLE III

Characterization of the sulfenic acid intermediates by electrospray mass spectrometry analyses and spectrophotometric titration with TNB⁻

The values indicated for spectrophotometric titration with TNB⁻ represent the average of two independent measurements of at least two enzyme concentrations (S.D. range 10%). Sulfenic acid content was determined spectrophotometrically using TNB⁻ under denaturing conditions (0.1% SDS), after reaction with 150 mM DL-Met-R,S-SO in the absence of any regenerating system as previously described (see "Experimental Procedures"). Molecular masses of wild-type and mutant PILB-MsrA and PILB-MsrB were determined by electrospray mass analysis without any modification or after reaction with 150 mM DL-Met-R,S-SO and/or 20 mM dimedone as described under "Experimental Procedures." Molecular mass and difference in mass are expressed in daltons.

Enzyme	TNB ⁻		Electrospray mass spectrometry analyses			
	Native	After MetSO treatment	Before modification		After modification with MetSO and dimedone	
			Theoretical mass	Measured mass	Measured mass	Mass difference ^a
	<i>mol TNB⁻ / mol enzyme</i>					
Wild-type PILB-MsrA	0	0	21,896	21,898 ± 1	21,897 ± 1	-1 ± 2
C206S PILB-MsrA	0	0	21,880	21,881 ± 1	21,880 ± 1	-1 ± 2
C348S PILB-MsrA	0	1	21,880	21,880 ± 1	22,018 ± 1	+138 ± 2
Wild-type PILB-MsrB	0	0	16,374	16,374 ± 1	16,373 ± 1	-1 ± 2
C439S PILB-MsrB	0	1	16,358	16,358 ± 1	16,512 ± 1 ^b	+154 ± 2
C494S PILB-MsrB	0	0	16,358	16,358 ± 1	16,358 ± 1	+0 ± 2

^a Mass differences measured by electrospray ionization-mass spectrometry correspond to the differences between the mass of the protein before and after treatment.

^b A second peak, representing about 50% of the enzyme population, and with a mass of 16,390 ± 1 Da was observed. This corresponds to a mass increase of 32 Da compared with native C439S PILB-MsrB. This peak can correspond to a population of sulfenic acid derivative that would be oxidized into sulfonic acid under the experimental conditions used.

that both Msrs are active within PILB-MsrA/MsrB and thus that the presence of one subdomain does not prevent the reductase activity of the other subdomain.

Catalytic Constants and Stereoselectivity in MetSO Reduction

The catalytic constants of PILB-MsrA and PILB-MsrB were first determined using the mixture of four diastereomers DL-Met-R,S-SO as a substrate under conditions where thioredoxin concentrations were not limiting (Table IV). K_m for MetSO and thioredoxin and k_{cat} values of PILB-MsrA and PILB-MsrB were 9 mM, 75 μM, and 3.7 s⁻¹ and 56 mM, 34 μM, and 0.2 s⁻¹, respectively. The catalytic values of PILB-MsrA are in the range of those recently determined for *E. coli* MsrA (18), but the K_m and k_{cat} values for MetSO are significantly different from those recently described by Grimaud *et al.* (8) for *E. coli* MsrA and *E. coli* MsrB (K_m values for MetSO are 170 μM and 6.7 mM, and k_{cat} values are 20 and 0.6 min⁻¹, respectively). This is because the concentration of 5 μM of thioredoxin used in their experiments was not saturating. In the case of MsrB, the observed discrepancy could be due to structural differences between MsrBs from *N. meningitidis* and *E. coli*. In fact, a control experiment done on *E. coli* MsrB showed that a saturating concentration of thioredoxin is also only attained at 75 μM (data not shown). In this context, it is interesting to note that K_m values of *E. coli* MsrB and of *E. coli* MsrA for *E. coli* thioredoxin are 3–5-fold better than K_m for *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxin (data not shown). This therefore suggests that thioredoxin affinity is in part species-dependent. Therefore, K_m values of *N. meningitidis* MsrA and MsrB for *N. meningitidis* thioredoxin are probably lower than those reported for *E. coli* thioredoxin.

DL-Met-R,S-SO was shown to be quantitatively reduced by PILB-MsrA/MsrB. In contrast, only 50% of the mixture of diastereomers of MetSO was reduced by either PILB-MsrA or PILB-MsrB. Moreover, only L-Met-S-SO and D-Met-S-SO were quantitatively reduced by PILB-MsrA, whereas D-Met-R-SO and L-Met-R-SO were only reduced by PILB-MsrB. These results support the data reported by Grimaud *et al.* (8) on oxidized calmodulin, suggesting that MsrB is stereospecific for the R isomer of the sulfoxide of MetSO, whereas, as has already been shown, MsrA is stereospecific for the S isomer (22, 23).

The catalytic constants were then determined for the isomers

that are substrates (Table IV). The K_m value of PILB-MsrA for L-Met-S-SO is 3-fold lower than for D-Met-S-SO, whereas the K_m value of PILB-MsrB for L-Met-R-SO is decreased 6-fold compared with that for D-Met-R-SO. This suggests that the configuration at the carbon C α is not a determining factor for efficient binding to both Msrs. Compared with the k_{cat}/K_{MetSO} value of 1,200 M⁻¹s⁻¹ for PILB-MsrA with L-Met-S-SO, the catalytic efficiency of PILB-MsrB is at least 60-fold lower with L-Met-R-SO. The low catalytic efficiency of PILB-MsrB raised the question of whether protein-bound MetSO is a better substrate than free MetSO. Therefore, the catalytic constants were determined for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. In this case, the amino and carboxyl groups of MetSO are engaged in amide bonds, and thus no charge is present. As shown in Table IV, the K_m value of MsrB for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe was decreased by a factor of 16 compared with that of L-Met-R-SO. Taking into account the fact that Ac-L-Met-S-SO-NHMe is neither a substrate nor an inhibitor (see below), the K_m value is in fact 32-fold decreased. A similar effect was observed with MsrB from *E. coli*.⁴ For PILB-MsrA, K_m was decreased by a factor of 7 compared with that for L-Met-S-SO, taking also into account the fact that Ac-L-Met-R-SO-NHMe is not a substrate. On the other hand, the K_m value of PILB-MsrB for Ac-L-Met-R,S-SO was similar to that for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, whereas a 3.7-fold increase in the K_m value was observed for L-Met-R,S-SO-NHMe. PILB-MsrA behaves similarly to PILB-MsrB except that a 13-fold increase in the K_m value was observed for Ac-L-Met-R,S-SO. Anyway, the highest k_{cat}/K_{MetSO} values of both Msrs are observed for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe (Table IV). Thus, this suggests that the active sites of both Msrs are adapted for binding protein-bound L-MetSO more efficiently than free L-MetSO. Finally, it is important to note that no inhibition of the two PILB-Msrs was observed in the presence of methionine and of the L-Met-SO isomer, which is not a substrate, at a concentration as high as 100 mM, with N-Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe as a substrate.

Several results presented in this study argue for a structure of the active site of PILB-MsrB different from that of PILB-MsrA, which can probably be extended to all MsrBs and MsrAs. In particular, the two Msrs exhibit opposite stereoselectivities toward the sulfoxide function, and the sulfoxide isomer, which

⁴ A. Olry, S. Boschi-Muller, and G. Branlant, unpublished results.

TABLE IV

Kinetic parameters for the methionine sulfoxide reductase activity of wild-type PILB-MsrA, PILB-MsrB, and PILB-MsrA/MsrB

Reactions were carried out in 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA buffer, pH 8, at 25 °C as described under "Experimental Procedures." Enzyme concentration was 0.5 μM for wild-type PILB-MsrA and PILB-MsrA/MsrB, and 2–6 μM for wild-type PILB-MsrB. Data presented were obtained by fitting the experimental data to the Michaelis-Menten equation. NA, no activity (*i.e.* $k_{cat} \leq 3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$); ND, not determined.

Enzyme	Substrate	k_{cat} <i>s</i> ⁻¹	$K_{sulfoxide}$ <i>mM</i>	$k_{cat}/K_{sulfoxide}$ <i>M</i> ⁻¹ · <i>s</i> ⁻¹	K_{Trx} <i>μM</i>
PILB-MsrA	DL-Met- <i>R,S</i> -SO	3.7 ± 0.4	9 ± 4	410 ± 200	75 ± 15
	L-Met- <i>S</i> -SO	2.5 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1200 ± 150	ND
	D-Met- <i>S</i> -SO	2.5 ± 0.1	6.0 ± 0.2	400 ± 100	ND
	L-Met- <i>R</i> -SO	NA			
	D-Met- <i>R</i> -SO	NA			
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe ^{a,b}	3.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2 ^c	5600 ± 200 ^c	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO	2.1 ± 0.2	8 ± 2 ^c	250 ± 40 ^c	ND
	L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.3 ^c	1200 ± 200 ^c	ND
PILB-MsrB	DL-Met- <i>R,S</i> -SO	0.2 ± 0.1	56 ± 7	4 ± 2	34 ± 6
	L-Met- <i>S</i> -SO	NA			
	D-Met- <i>S</i> -SO	NA			
	L-Met- <i>R</i> -SO	0.36 ± 0.01	19 ± 2	19 ± 6	ND
	D-Met- <i>R</i> -SO	0.30 ± 0.03	122 ± 13	2 ± 1	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe ^{a,d}	0.46 ± 0.04	1.2 ± 0.4 ^c	380 ± 60 ^c	ND
	Ac-L-Met- <i>R,S</i> -SO	0.28 ± 0.01	1.6 ± 0.2 ^c	175 ± 50 ^c	ND
	L-Met- <i>R,S</i> -SO-NHMe	0.17 ± 0.01	4.5 ± 0.5 ^c	40 ± 20 ^c	ND
PILB-MsrA/MsrB	DL-Met- <i>R,S</i> -SO	2.8 ± 0.2	9 ± 2	300 ± 100	114 ± 31
	L-Met- <i>S</i> -SO	2.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1600 ± 300	ND
	L-Met- <i>R</i> -SO	0.08 ± 0.01	3 ± 1	25 ± 8	ND

^a No inhibition was observed in the presence of up to 100 mM Met.

^b No inhibition was observed in the presence of up to 100 mM L-Met-*R*-SO.

^c $K_{sulfoxide}$ and $k_{cat}/K_{sulfoxide}$ should be divided and multiplied by 2, respectively, considering the fact that only one stereomer is a substrate and that the second one is not an inhibitor.

^d No inhibition was observed in the presence of up to 100 mM L-Met-*S*-SO.

is not a substrate, does not bind. Moreover, no sequence identity is detectable. In particular, the conserved sequence of MsrA around Cys-51 (*i.e.* GCFW, which is located at the N terminus of an α-helix) is different from the conserved region around Cys-494 of PILB-MsrB (*i.e.* RYC(I/V/M)N). However, the following common properties are shared by MsrA and MsrB. 1) Their chemical mechanisms are similar, with sulfenic acid formation. This supports the idea that sulfenic acid chemistry is a general feature in the reduction of sulfoxides by thiols and thus excludes another chemical mechanism proposed by Wallace and Mahon (24). 2) The recycling process is probably dependent on thioredoxin *in vivo*. 3) The presence of the sulfoxide function is a prerequisite for binding to Msrs as supported by the absence of inhibition in the presence of a large excess of methionine.

The fact that MsrA and MsrB subdomains are fused in *N. meningitidis* PILB and also in *S. pneumoniae* (1) in which the first subdomain is not present also raised the question of whether the fusion of MsrA and MsrB subdomains had an inhibitory, an additive, or a synergetic effect on the efficiency of MetSO reduction. Therefore, the catalytic constants were also determined on wild-type PILB-MsrA/MsrB. As shown in Table IV, the catalytic efficiency determined with DL-Met-*R,S*-SO was in the range of that of PILB-MsrA. This suggests that the presence of PILB-MsrB does not change significantly the catalytic efficiency of PILB-MsrA. This is confirmed by the fact that k_{cat} and K_m values for L-Met-*S*-SO of PILB-MsrA/MsrB were similar to those of PILB-MsrA. The fact that the catalytic efficiency, k_{cat}/K_m , for L-Met-*R*-SO of PILB-MsrA/MsrB was similar to that of PILB-MsrB also suggests that the presence of PILB-MsrA does not change significantly the catalytic efficiency of PILB-MsrB. However, k_{cat} and K_m values of PILB-MsrB were 4.5- and 6-fold decreased, respectively. These differences remain to be explained.

Sequence comparisons of putative MsrBs show that Cys equivalent to Cys-494 of PILB-MsrB is replaced by a selenocysteine in human (25) and mouse ortholog SelXs. Taking into account the fact that selenocysteine is chemically more reactive than a Cys, one can hypothesize that substituting selenocys-

teine for Cys will favor the efficiency of the reduction of the sulfoxide function at least of the nucleophilic attack on the sulfoxide function. Inspection of the primary structure of SelXs shows that the Cys equivalent to Cys-439 of PILB-MsrB located in the signature CGWP(S/A)F is replaced by a Ser, whereas there exist four Cys at positions equivalent to 421, 424, 470, and 473, which are conserved in at least 40% of the MsrB putative sequences. The fact that these Cys have been recently shown to be involved in binding of metal in *E. coli* MsrB⁴ excludes their participation in the thioredoxin-recycling reductase activity. Therefore, if SelXs are expressed and are catalytically active, this means that either an alternative recycling thiol system other than that involving thioredoxin is operative or Cys at another position plays a similar role as Cys-439 of PILB-MsrB. In this context, it would be informative to test the activity of the putative MsrBs that have no Cys at position 439.

Bacterial virulence relies on the adhesins and cytoadherence-related proteins of the pathogenic bacteria to bind to host cells. It also depends on the ability of the pathogenic bacteria to survive oxidative damages caused by reactive oxygen or nitroson species. In this context, it was suggested that PILB from *N. gonorrhoeae* contributed to the production or the maintenance of the functional properties of adhesins by mechanisms not clearly elucidated (1). More recently, convincing experiments showed that MsrA is required for full virulence of the plant pathogen *E. chrysanthemi* (2) and of the human pathogen *M. genitalium* (3). The role of the bacterial MsrA would be at least to protect the protein structures of such bacteria, in particular methionine, from oxidative damage or through alternate virulence-related pathways. The fact that MsrA is specific for the *S* isomer of MetSO while MsrB is *R*-specific and that PILB expresses both Msr activities suggests that MsrB is also involved in bacterial virulence.

CONCLUSION

We have shown that the MsrB subdomain of PILB reduces MetSO via a two-step catalytic mechanism involving sulfenic acid chemistry. The first step leads to reduction of MetSO into Met with a concomitant formation of a sulfenic acid on the

catalytic Cys-494. The second step consists in the regeneration of Cys-494 via formation of a disulfide bridge between Cys-494 and Cys-439 followed by reduction of the disulfide bridge by thioredoxin. Cys-494 is almost conserved, whereas Cys-439 is only conserved in 50% of the MsrB putative sequences. This argues for the generality of the sulfenic acid mechanism described in the present study but at the same time raises the question of whether alternative mechanisms in Cys-494 regeneration are functioning.

PILB-MsrB recognizes only the *R* isomer of the sulfoxide function, whereas PILB-MsrA recognizes the *S* isomer. These differences in stereospecificities are of particular importance *in vivo*, since they allow the complete reduction of Met-*R,S*-SO back to methionine. It is also shown that 1) the presence of the sulfoxide function is a prerequisite for binding to both Msrs and 2) the catalytic efficiency of PILB-MsrB is significantly lower than that of PILB-MsrA. The results also suggest that protein-bound L-Met-SO is a better substrate than free L-MetSO, in particular for MsrB. Several results from the present study argue for a structure of the active site of MsrBs different from that of MsrAs. In this context, the Cys-494 that is situated in the signature RYC(I/V/M)N and is oxidized into a sulfenic acid during the catalytic event is probably not located in an environment similar to that of Cys-51 of *E. coli* MsrA. Thus, knowledge of the three-dimensional structure of a MsrB combined with site-directed mutageneses will be useful for characterizing its active site, in particular the amino acids involved in the stereospecificity and catalysis.

Acknowledgments—We are very grateful to Dr. M. K. Taha for the gift of the *N. meningitidis* DNA, to Dr. R. Glockshuber for the gift of the *E. coli* thioredoxin recombinant plasmid, to Dr. S. B. Mulrooney for the gift of the *E. coli* thioredoxin reductase plasmid, and to Dr. C. Didierjean for the resolution of the crystal structure of D-Met-*R*-SO. We also thank Dr. S. Azza, C. Gauthier, and G. Devaux for efficient technical help.

REFERENCES

1. Wizemann, T. M., Moskovitz, J., Pearce, B. J., Cundell, D., Arvidson, C. G., So, M., Weissbach, H., Brot, N., and Masure, H. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7985–7990
2. El Hassouni, M., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F., and Barras, F. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 887–892
3. Dhandayuthapani, S., Blaylock, M. W., Bebear, C. M., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 5645–5650
4. Taha, M. K., Dupuis, B., Saurin, W., So, M., and Marchal, C. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 137–148
5. Tête-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) *Structure* **8**, 1167–1178
6. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 13307–13312
7. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A., and Branlant, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913
8. Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., and Barras, F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48915–48920
9. Singh, V. K., Moskovitz, J., Wilkinson, B. J., and Jayaswal, R. K. (2001) *Microbiology* **147**, 3037–3045
10. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–687
11. Scopes, R. K. (1974) *Anal. Biochem.* **59**, 277–282
12. Holland, H. L., Andreana, P. R., and Brown, F. M. (1999) *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 1833–1843
13. Bose, A. K. (1960) *Org. Synthesis* **40**, 82–85
14. Bodanszky, M., and Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, 103–112, Springer-Verlag, New York 103–112
15. Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233–1244
16. Mulrooney, S. B. (1997) *Protein Expression Purif.* **9**, 372–378
17. Silver, M. (1979) *Methods Enzymol.* **62**, 135–137
18. Boschi-Muller, S., Azza, S., and Branlant, G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 2272–2279
19. Hayes, C. S., Illades-Aguar, B., Casillas-Martinez, L., and Setlow, P. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 2694–2700
20. Jeong, W., Cha, M. K., and Kim, I. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **275**, 2924–2930
21. Pedrajas, J. R., Miranda-Vizueté, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A., and Spijrou, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16296–16301
22. Sharov, V. S., Ferrington, D. A., Squier, T. C., and Schoneich, C. (1999) *FEBS Lett.* **455**, 247–250
23. Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., and Stadtman, E. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14167–14172
24. Wallace, T. J., and Mahon, J. J. (1965) *J. Org. Chem.* **30**, 1502–1506
25. Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 38147–38154

PARTIE II :

Caractérisation du mécanisme cinétique et des trois étapes du mécanisme catalytique de la MsrB de *N. meningitidis*

Publication n° 2:

A. Olry, S. Boschi-Muller and G. Branlant. (2004).

Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from
Neisseria meningitidis.

Biochemistry, **43**, 11616-22.

Le mécanisme catalytique des MsrB est un mécanisme à trois étapes. Dans une première étape, la Cys catalytique 117 réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde. Ceci amène à la formation d'un état de transition et son réarrangement engendre la libération d'une molécule de Met avec la formation d'un intermédiaire acide sulfénique sur la Cys catalytique. Ensuite, lors de la deuxième étape, la Cys63 de régénération attaque l'intermédiaire acide sulfénique entraînant ainsi la formation d'un pont disulfure intramoléculaire Cys117-Cys63 et la libération d'une molécule d'eau. Dans une troisième étape, le pont disulfure est réduit par la Trx réduite et l'activité MsrB est ainsi régénérée. Au début de cette étude, aucune donnée n'était disponible tant sur le mécanisme cinétique que sur la nature de l'étape limitante.

I. Le mécanisme cinétique de la MsrB de *N. meningitidis* est de type ping-pong

Le mécanisme cinétique de la MsrB de *N. meningitidis* a été étudié en utilisant le substrat Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe en présence soit de Trx comme réducteur (les vitesses sont alors obtenues par le suivi en spectrophotométrie de la disparition du NADPH lié à la Trx réductase utilisée comme système couplé), soit de DTT (les vitesses sont alors obtenues par la quantification de Ac-L-Met-NHMe formé au cours du temps après arrêt de la réaction par ajout de TFA).

I. 1. Résultats cinétiques

La figure 29, p. 88, représente $1/k_{\text{obs}}$ en fonction de $1/[\text{Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe}]$. Le fait que les droites soient parallèles, est caractéristique d'un mécanisme de type ping-pong.

L'équation, qui décrit ce mécanisme, est la suivante :
$$\frac{v}{E_0} = \frac{k_{\text{max}}[\text{S}][\text{R}]}{K_R[\text{S}] + K_S[\text{R}] + [\text{S}][\text{R}]}$$

k_{max} représente la constante catalytique apparente, K_S et K_R respectivement l'affinité apparente pour le Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe et le réducteur (ici la Trx ou le DTT), S et R respectivement la concentration de Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe et de Trx ou de DTT.

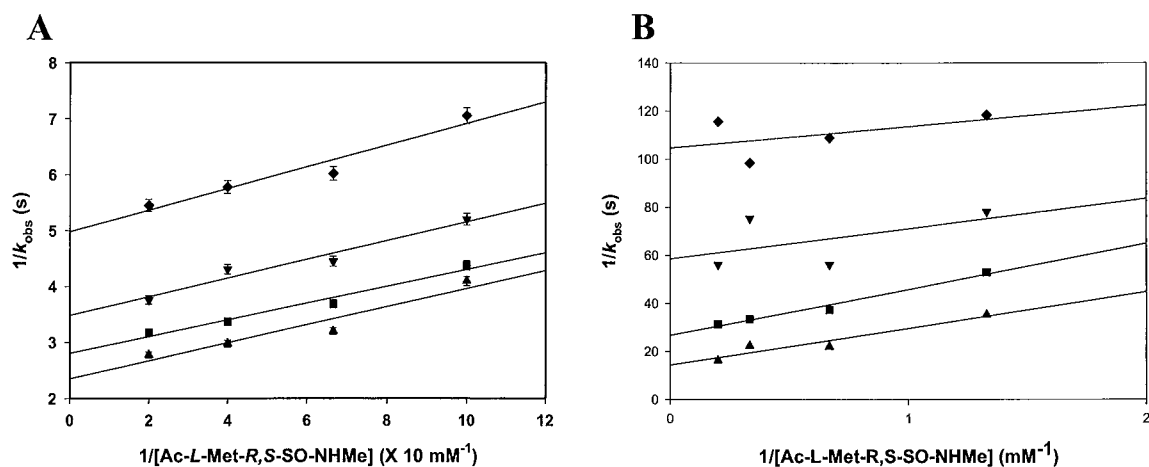


Figure 29 : Activité méthionine sulfoxyde réductase de la MsrB de *N. meningitidis* en présence du système de régénération Trx/Trx réductase/NADPH (A) ou de DTT (B). Les axes représentent $1/k_{obs}$ (sec) en fonction de $1/[Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe]$ (mM^{-1}). Les points expérimentaux ont été ajustés selon une régression linéaire. (A) Les différentes concentrations en Trx sont de 20 μM (\blacklozenge), 30 μM (\blacktriangledown), 40 μM (\blacksquare) 60 μM (\blacktriangle). (B) Les différentes concentrations en DTT sont de 5 mM (\blacklozenge), 10 mM (\blacktriangledown), 15 mM (\blacksquare) et 20 mM (\blacktriangle).

La figure 30, ci-dessous, représente l'ordonnée à l'origine pour chaque concentration en Trx ($1/k_{maxapp}$) en fonction de la concentration en Trx ou en DTT et permet d'accéder aux paramètres cinétiques K_M et k_{cat} , à l'état stationnaire.

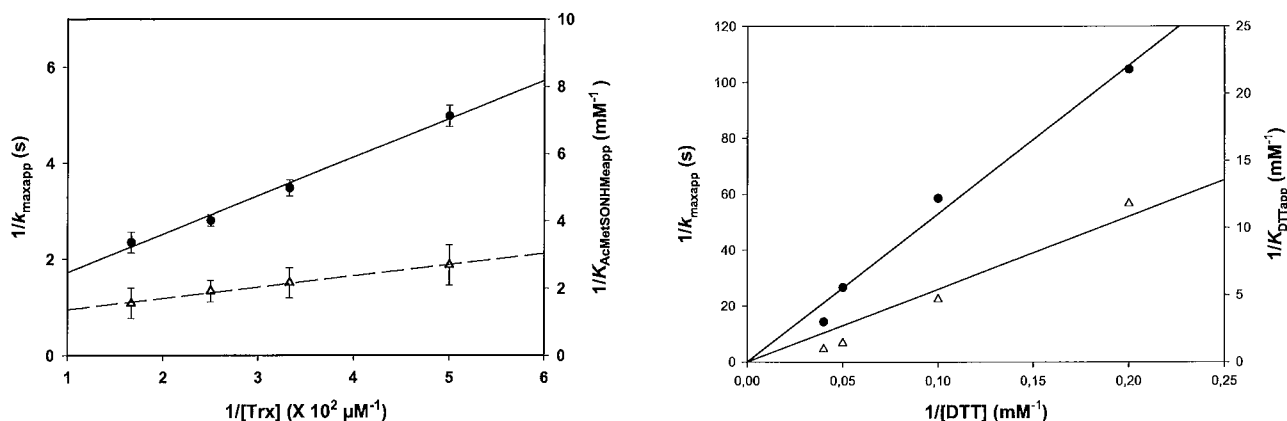


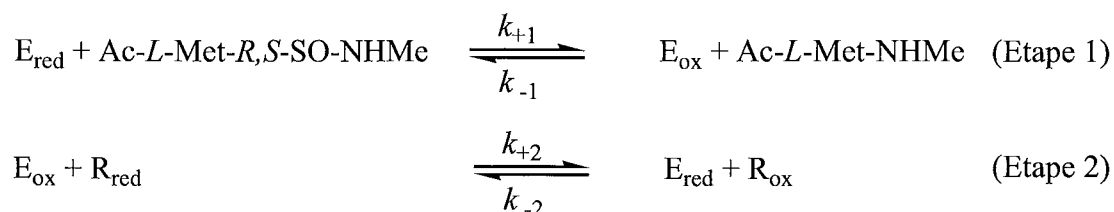
Figure 30 : Activité méthionine sulfoxyde réductase de la MsrB de *N. meningitidis* en présence du système de régénération Trx/Trx réductase/NADPH (A) et DTT (B). Les axes représentent $1/k_{maxapp}$ (s) (\bullet) et $1/K_{Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe}$ (mM^{-1}) (Δ) en fonction de $1/[Trx]$ (μM^{-1}) (A) ou $1/[DTT]$ (mM^{-1}) (B). Les points expérimentaux ont été ajustés selon une régression linéaire.

En présence de Trx comme réducteur, les points s'ajustent selon une régression linéaire et donne les paramètres cinétiques suivants : $k_{cat} = 1.1 \pm 0.2 s^{-1}$, $K_{Ac-L-Met-(R,S)-SO-NHMe} = 1.2 \pm 0.2 mM$ et $K_{Trx} = 58 \pm 12 \mu M$. En tenant compte du fait que seul l'isomère R de Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe est substrat et que l'isomère S n'est pas inhibiteur, la valeur de

$K_{Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe}$ est en fait deux fois plus faible. Par contre en présence de DTT comme réducteur, les deux droites coupent l'axe des ordonnées à zéro. Ceci indique qu'il n'y a pas de saturation, et donc que les constantes k_{cat} et K_{DTT} sont infinies. Une valeur de $2.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ peut être déduite de la pente et assimilée à la valeur d'une constante k_{cat}/K_{DTT} . L'absence de saturation observée en présence de DTT est probablement la conséquence de l'absence de formation d'un complexe MsrB-DTT, qui reflèterait l'absence de reconnaissance structurale entre la MsrB oxydée et le DTT. Néanmoins, les résultats ne nous permettent pas d'exclure que la vitesse de formation du complexe MsrB-DTT serait plus lente que celle de la réaction dans le complexe.

I. 2. Discussion

Nous avons montré clairement que le mécanisme cinétique de la MsrB de *N. meningitidis* est de type Ping-Pong quelque soit le réducteur considéré. Ce mécanisme peut être décrit *via* le schéma ci-dessous, où E_{ox} est l'intermédiaire acide sulfénique et R le réducteur (Trx ou DTT) :



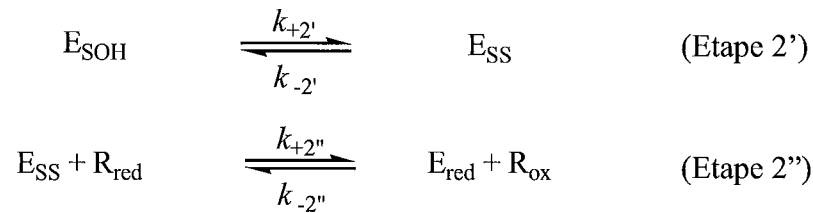
Ce schéma est en accord avec le mécanisme chimique dans lequel la formation de Ac-L-Met-NHMe est concomitante à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Dans ce schéma, la constante k_{cat}/K_S pour la réaction de l'enzyme réduite avec le Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe ($k_{cat}/K_{Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe} = 917 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) peut être définie comme k_{+1}/k_{-1} et peut être assimilée à k_{+1} puisque l'étape 1 est irréversible. L'efficacité catalytique de la MsrB est 6 fois inférieure à celle de la MsrA d'*E. coli* ($5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et 500 fois inférieure à celle d'autres systèmes enzymatiques comme les peroxydases (Crane *et al.*, 1995), (Parsonage *et al.*, 1993; Sayed et Williams 2004).

La saturation observée avec la Trx et l'absence de saturation avec le DTT ne peut s'expliquer que par une variation de la vitesse de l'étape de recyclage du mécanisme catalytique, ce qui implique que l'étape limitante du mécanisme doit être associée à l'étape 2. Cette étape peut être divisée en deux sous-étapes : 1) l'étape de formation du pont disulfure

Résultats Partie II

intramoléculaire (étape 2') et; 2) l'étape de réduction du pont disulfure par la Trx (étape 2'') comme décrit dans le schéma ci-dessous, où E_{SOH} est l'intermédiaire acide sulfénique et E_{SS} l'intermédiaire pont disulfure :

Ainsi, l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global peut être associée à



l'étape 2' ou 2''. Le fait que la formation d'un pont disulfure après formation d'un intermédiaire acide sulfénique soit généralement rapide et limitée par la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique (Antoine *et al.*, 2003) suggère que l'étape cinétiquement limitante serait plutôt associée à l'étape 2'' et donc que $k_{+2} = k_{+2''}$. Le fait qu'il y ait un phénomène de saturation à l'état stationnaire pour la Trx, nous permettant d'en déduire un K_M de la MsrB pour la Trx, montre qu'il y a formation d'un complexe MsrB oxydée-Trx réduite et que la vitesse de formation de ce complexe n'est pas cinétiquement limitante. L'étape cinétiquement limitante peut alors être associée au transfert d'électrons conduisant à la formation du complexe MsrB réduite-Trx oxydée ou à la dissociation de celui-ci.

L'efficacité de réduction du pont disulfure par la Trx est élevée ($2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et similaire à celle de la MsrA d'*E. coli* ($4,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ceci suggère fortement l'existence d'une reconnaissance MsrB-Trx nécessaire à la réduction efficace du pont disulfure. A ce jour, les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans cette reconnaissance ne sont pas connus.

II. Détermination de la vitesse des trois étapes du mécanisme

Par des approches de cinétiques rapides par "quenched-flow" (dosage de la quantité de Met produite en absence de Trx) et en utilisant le message de fluorescence des résidus Trp en tant que sonde (messages de fluorescence différents dans les formes Msr réduite et oxydée ainsi que dans la Trx réduite et oxydée), nous avons pu étudier séparément les vitesses de chaque étape. Ces études ont été réalisées sur la MsrB sauvage mais également en partie sur le mutant protéique Ser de la Cys de recyclage (Cys63Ser), ce qui permet de bloquer la réaction en absence de réducteur au niveau de l'intermédiaire acide sulfénique.

II. 1. Etape 1 de réduction du substrat sulfoxyde

Nous avons utilisé la technique de cinétique rapide résolue en temps en mode interrompu, dite "quenched-flow", afin de déterminer la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique dans la première étape qui est concomitante à la formation de Ac-L-Met-NHMe. A pH 8,0, la vitesse de formation de Ac-L-Met-NHMe avec la MsrB sauvage ou le mutant protéique Cys63Ser est trop rapide ($\geq 50\text{s}^{-1}$) pour être mesurable avec l'appareil utilisé. L'étude a donc été réalisée à pH 5,5, à concentration saturante en substrat. Les vitesses obtenues sont 60 fois supérieures au k_{cat} mesuré à l'état stationnaire à pH 5,5 avec le système couplé Trx/TR/NADPH, indiquant que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global se situe après l'étape réductase.

Nous avons également utilisé une seconde technique, basée sur les propriétés de fluorescence de la MsrB, pour étudier la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Les valeurs de k_{obsmax} déterminées à pH 5,5 et 8 sont respectivement 48 fois et 163 fois supérieures aux valeurs de k_{cat} déterminées à l'état stationnaire aux mêmes pH.

Ainsi, la vitesse de l'étape réductase, déterminée par les deux approches, est largement supérieure au k_{cat} , ce qui démontre que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme de la MsrB se situe après la formation de l'intermédiaire acide sulfénique et est associée soit à la formation du pont disulfure Cys117-Cys63, soit à la réduction de ce pont par la Trx.

II. 2. Etape 2 de formation du pont disulfure Cys117-Cys63

La vitesse de l'étape de formation du pont disulfure a été déterminée en suivant la perte des groupements thiols libres lors des expériences de « quenched-flow » par quantification des fonctions thiols libres à l'aide d'un réactif spécifique, le DTNB. Ainsi à pH 5,5 et à saturation en substrat Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, la constante de vitesse de l'étape 2 est égale à la constante de vitesse de l'étape réductase. Ceci montre que l'étape cinétiquement déterminante dans le processus à deux étapes qui conduit à la formation du pont disulfure est associée à l'étape de formation de l'intermédiaire acide sulfénique, et que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global se situe après l'étape de formation du pont disulfure.

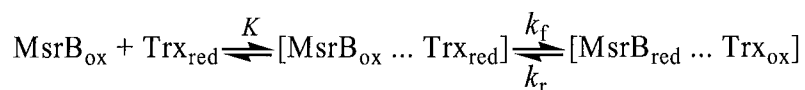
L'étape limitante étant associée à la troisième étape, l'affinité de la MsrB pour le substrat sulfoxyde dans la première étape et la deuxième étape doit être beaucoup plus faible que celle mesurée à l'état stationnaire. C'est effectivement ce que nous avons montré. Le K_S

Résultats Partie II

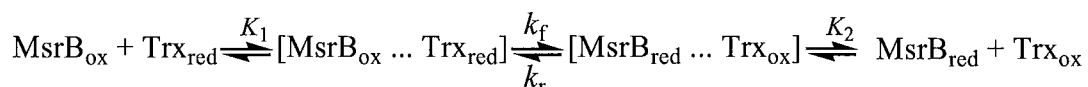
du substrat sulfoxyde dans les deux premières étapes est supérieur, au moins de 100 fois, au K_M mesuré à l'état stationnaire.

II. 3. Etape 3 de réduction du pont disulfure Cys117-Cys63 par la Trx

La vitesse de formation de la Trx oxydée, lors de la réduction de la MsrB oxydée, a été déterminée en suivant la variation de l'intensité d'émission de fluorescence de la Trx, liée à la formation du pont disulfure dans son site actif. La vitesse de formation de Trx oxydée a ainsi été déterminée à différentes concentrations en Trx. L'étape de réduction de la MsrB oxydée par la Trx peut être représentée par le schéma ci-dessous où K représente l'affinité apparente K_S pour la Trx, et k_f et k_r respectivement les constantes de vitesse d'échange des ponts disulfures dans le sens direct et inverse :



Les résultats obtenus montrent que l'étape de réduction de la MsrB oxydée par la Trx, peut être considérée comme irréversible ($k_r = 0$), et que la constante k_f obtenue représente probablement la vitesse de la réaction chimique d'échange de pont disulfure. Les valeurs de K_S et k_f obtenues sont respectivement 3,2 fois et 10 fois supérieures aux valeurs de K_M et k_{cat} déterminés à l'état stationnaire. Ceci montre que l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global se situe après l'étape d'échange de pont disulfure, et est donc associée à la dissociation du complexe MsrB réduite-Trx oxydée (dernière étape du schéma ci-dessous).



Le relargage de la Trx oxydée pourrait être cinétiquement limitée par une étape de changement conformationnel du complexe MsrB réduite-Trx oxydée précédant la dissociation des deux partenaires. Dans ce cas, un changement conformationnel semblable doit également exister au niveau de la formation du complexe michaélien MsrB oxydée-Trx réduite. Ce changement conformationnel pourrait alors être cinétiquement déterminant dans la formation du complexe MsrB réduite-Trx oxydée. La détermination des paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'association du complexe par des techniques biophysicochimiques, comme la

microcalorimétrie (ITC) et la résonance plasmonique de surface, pourraient permettre de valider ces hypothèses.

III. Publication 2 : A. OLRY, S. BOSCHI-MULLER and G. BRANLANT. (2004).
Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. Biochemistry, **43**, 11616-22.

Kinetic Characterization of the Catalytic Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase B from *Neisseria meningitidis*[†]

Alexandre Olry, Sandrine Boschi-Muller, and Guy Branlant*

UMR 7567 CNRS-UHP, Maturation of ARN and Molecular Enzymology, Faculty of Sciences, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received April 7, 2004; Revised Manuscript Received June 9, 2004

ABSTRACT: Methionine sulfoxide reductases catalyze the thioredoxin-dependent reduction of methionine sulfoxide back to methionine. The methionine sulfoxide reductases family is composed of two structurally unrelated classes of enzymes named MsrA and MsrB, which display opposite stereoselectivities toward the sulfoxide function. Both enzymes are monomeric and share a similar three-step chemical mechanism. First, in the reductase step, a sulfenic acid intermediate is formed with a concomitant release of 1 mol of methionine per mol of enzyme. Then, an intradissulfide bond is formed. Finally, Msrs return back to reduced forms via reduction by thioredoxin. In the present study, it is shown for the *Neisseria meningitidis* MsrB that (1) the reductase step is rate-determining in the process leading to formation of the disulfide bond and (2) the thioredoxin-recycling process is rate-limiting. Moreover, the data suggest that within the thioredoxin-recycling process, the rate-limiting step takes place after the two-electron chemical exchange and thus is associated with the release of oxidized thioredoxin.

Oxidation of proteins can readily occur during oxidative stress conditions by reactive oxygen species (ROS). One of the targets in proteins is a methionine (Met) residue, which can be oxidized into methionine sulfoxide (MetSO).¹ Met oxidation is reversed in vivo by methionine sulfoxide reductases (Msr). Two classes of Msrs called MsrA and MsrB have been described so far, which reduce free and protein-bound MetSO back to Met, using reduced thioredoxin (Trx) as an electron source (1–6). Three major roles for Msrs have been postulated: they can (1) scavenge ROS species such as an antioxidant molecule (7, 8), (2) repair oxidized proteins and therefore may regulate the function of these proteins (9, 10), and (3) play a role in the virulence of some bacteria (11–14).

MsrA and MsrB are two structurally unrelated classes of enzymes that display opposite stereoselectivities toward the S and R isomers of the sulfoxide function of MetSO, respectively (2–6). The 3-D structures of MsrA from *Escherichia coli*, *Bos taurus*, and *Mycobacterium tuberculosis* and of MsrB from *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* were determined by X-ray crystallography (15–19). The structure of MsrA is of mixed α - β -type with an active site, which can be described as an opening basin

readily accessible to the substrate. This site contains the catalytic Cys-51 located at the N-terminus of an α -helix. The core of the MsrB structure is composed of two antiparallel β -sheets, and the active site is also solvent exposed and contains the catalytic Cys-117 located in the middle of a β -strand. Except for the presence of the catalytic and the recycling cysteines and of a tryptophan, the latter of which is involved in the recognition of the methyl of the sulfoxide substrate, the two active sites do not share any other common amino acids that can be involved either in the chemical mechanism or in the substrate specificities. However, both classes of Msrs share the same three-step chemical mechanism including (1) a nucleophilic attack of the catalytic Cys residue on the sulfur atom of the sulfoxide substrate leading via a 1,3-sigmatropic rearrangement to formation of a sulfenic acid intermediate and release of 1 mol of Met per mol of enzyme, (2) a formation of an intramonomeric disulfide bond between the catalytic and the recycling cysteines with a concomitant release of 1 mol of water, and (3) a reduction of the Msr disulfide bond by Trx leading to regeneration of the reduced form of Msr and to formation of oxidized Trx in the disulfide state (Trx_{ox}) (Scheme 1) (6, 20). For MsrA, this chemical mechanism is in agreement with the kinetic mechanism, which was shown to be of ping-pong type (21).

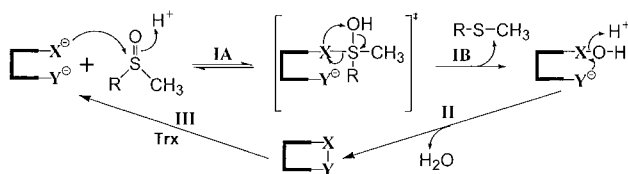
Recent studies from our group on the catalytic mechanism of the MsrA from *N. meningitidis* have shown that the rate-limiting step is associated with the reduction of the MsrA disulfide bond by Trx and that the rate of the sulfenic acid intermediate formation is fast and is rate-determining in the process leading to formation of the MsrA disulfide bond (22). In contrast, no data are presently available on the kinetics of the MsrBs.

[†] This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Programme Physique et Chimie du Vivant 2000, Programme Protéomique et Génie des Protéines 2001), the University Henri Poincaré Nancy I, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 5436), and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie.

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

¹ Abbreviations: MetSO, methionine sulfoxide; DTNB, 5,5'-dithio-bis(2-nitro)benzoate; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MsrA/B, methionine sulfoxide reductase A/B; Trx, thioredoxin; MsrB_{ox}, MsrB in the disulfide state; MsrB_{red}, MsrB in the reduced state; Trx_{ox}, Trx in the disulfide state; Trx_{red}, Trx in the reduced state.

Scheme 1: Proposed Catalytic Mechanism of MsrA and MsrB from *N. meningitidis*^a



^a Representation of the three-step chemical mechanism as described by Antoine et al. (22). In step III, a Michaelis complex is formed between Msr_{ox} and Trx_{red}. Then, a nucleophilic attack of Cys-32 of Trx on the disulfide bond of the Msr leads to formation of an intermolecular disulfide bond, which is followed by a nucleophilic attack of Cys-35 of Trx that leads to Msr_{red} and Trx_{ox}. For MsrB from *N. meningitidis*, X represents Cys-117 and Y Cys-63.

In the present study, the rates of the three steps of the chemical mechanism have been determined for the *N. meningitidis* MsrB. The results demonstrate that the Trx-recycling process is rate limiting. The data also suggest that within the Trx-recycling process, the rate-limiting step takes place after the two-electron chemical exchange and thus is associated with the release of Trx_{ox}. These results are compared with those recently described for MsrA (22).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-Directed Mutagenesis, Production, and Purification of Enzymes. The *E. coli* strain used for all *N. meningitidis* MsrB productions was BE002 (MG1655 msrA::specΩ, msrB::α3kan), transformed with the plasmidic construction pSKPILBMrB containing the coding sequence of msrB under the lac promoter (6). The BE002 strain was kindly provided by Dr. F. Barras. Its use prevented expression of endogenous wild-type MsrA and MsrB from *E. coli* and thus avoided any contamination of the activity of the *N. meningitidis* MsrB by the Msrs from *E. coli*. Site-directed mutageneses were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Purifications were realized as described previously (6). Purity of wild-type and mutant MsrBs was checked by electrophoresis on 15% SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses. Storage of the enzymes was done as described previously (6). The molecular concentration was determined spectrophotometrically, using an extinction coefficient at 280 nm of 17 330 M⁻¹ cm⁻¹ for wild-type and mutant MsrBs (6). In this paper, *N. meningitidis* MsrB amino acid numbering is based on the *E. coli* MsrB sequence without the N-terminal Met.

Trx1 and Trx reductase from *E. coli* were prepared following experimental procedures already published (23, 24).

Preparation of Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. Ac-L-Met-OME was purchased from Bachem. Treatment of Ac-L-Met-OME with 25 mol equiv of methylamine in methanol gave Ac-L-Met-NHMe. Oxidation of Ac-L-Met-NHMe with 1.05 mol equiv of H₂O₂ in methanol resulted in Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. Separation of Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe from residual nonoxidized Ac-L-Met-NHMe was achieved by reverse phase chromatography on a Delta-Pak C18 preparative column (19/300) (Waters) on a Waters HPLC system, equilibrated with H₂O and eluted with a linear gradient of acetonitrile from 0 to 55%. Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe was eluted at 3% aceto-

nitrile, whereas Ac-L-Met-NHMe was eluted at 30% acetonitrile. The fractions corresponding to Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe were pooled and concentrated to eliminate acetonitrile. The proton NMR spectrum is in accord with the Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe structure. Concentration of Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe solution was determined on an analytic Atlantis C18 column (Waters) on an ÄKTA explorer system (Amersham Biosciences) by integrating the absorption peak at 215 nm (1 nmol of Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe gives 1.62 area units).

Enzyme Kinetics. Kinetics studies were carried out with Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe as a substrate and *E. coli* Trx1 as a reductant in the presence of a Trx-regenerating system (1.28 μM *E. coli* Trx reductase and 0.3 mM NADPH) as previously described by Olry et al. (6). The initial rate data were fit to the Michaelis–Menten relationship using least-squares analysis to determine *k*_{cat} and *K*_M with the program Sigmaplot (Jandel Scientific Software). All *K*_M values were determined at saturating concentrations of the other substrate.

Preparation of MsrB in the Disulfide State and Trx_{ox}. MsrB oxidation was achieved by mixing 100 μM MsrB with 300 mM MetSO in buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8). The MetSO used was D,L-Met-R,S-SO, of which only the R isomer is a substrate for MsrB (6). Trx oxidation was achieved by mixing 500 μM Trx with 1 mM DTNB in buffer A. After 10 min of incubation at room temperature, oxidized proteins were passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with buffer A. Oxidation of protein in the disulfide state was checked by titration with DTNB.

Fluorescence Properties of Wild-Type and Mutant MsrBs. The fluorescence characteristics of the wild-type MsrB in the reduced form (MsrB_{red}) and Cys-117/Cys-63 disulfide state, and the C63S MsrB in its reduced form and Cys-117 sulfenic acid state, were recorded on a spectrofluorometer (flx, SAFAS company) thermostated at 25 °C, in buffer A with 10 μM each protein.

Determination of the Rate of Ac-L-Met-NHMe Formation and of Thiol Loss by Single Turnover Quenched-Flow Experiments. Quenched-flow measurements were carried out at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for the double-mixing mode and adapted to recover the quenched samples as previously described (22). Briefly, equal volumes (60 μL) of a solution containing 600 μM MsrB in 50 mM MES, pH 5.5, or in buffer A and a solution containing 700 mM Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe in 50 mM MES, pH 5.5, or in buffer A were mixed in the aging loop. The mixture was then allowed to react for 30–800 ms before being mixed with an equal volume of a quenching aqueous solution containing 2% of trifluoroacetic acid. Quenched samples were then collected in a 200 μL loop. For each aging time, four shots were done, and the four corresponding quenched samples were pooled in a volume of 700 μL and then analyzed. Ac-L-Met-NHMe quantification in the quenched samples was carried out by reverse phase chromatography as described in the paragraph *Preparation of Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe* by peak integration at 215 nm. The other part of the quenched samples was used to (1) determine the protein concentration from the absorbance at 280 nm and (2) quantify the free cysteine content, using 2,2'-dipyridyl disulfide as a thiol probe. Progress curves of pyridine-2-thione production were recorded at 343 nm in

buffer A. Enzyme concentration was 6.19 μM , and the 2,2'-dipyridyl disulfide concentration was 665 μM . The amount of pyridine-2-thione formed was calculated using an extinction coefficient at 343 nm of 8080 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Data were plotted as mol of Ac-L-Met-NHMe formed per mol of MsrB and as free remaining thiols per mol of MsrB, both as a function of time. The rate of Ac-L-Met-NHMe formation was determined by fitting the curve to the monoexponential equation (eq 1), in which a represents the fraction of Ac-L-Met-NHMe formed per mol of MsrB and k_{obs} represents the rate constant.

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

The rate of loss in free thiols was determined by fitting the curve to the monoexponential equation (eq 2) in which y_0 represents the number of free remaining thiols, a represents the number of oxidized thiols, and k_{obs} represents the rate constant.

$$y = y_0 + ae^{-k_{\text{obs}}t} \quad (2)$$

Kinetics of the Formation of the Cys-117 Sulfenic Acid Intermediate of C63S MsrB by Single Turnover Stopped-Flow Experiment. Kinetics of the C63S MsrB fluorescence decrease associated with the formation of the Cys-117 sulfenic acid intermediate were measured at 25 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for fluorescence measurements. The excitation wavelength was set at 291 nm, and the emitted light was collected using a 320 nm cutoff filter. One syringe contained MsrB in buffer A (10 μM , final concentration after mixing), and the other one contained Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe at various concentrations in buffer A (5–550 mM, final concentration). An average of six runs was recorded for each Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe concentration. Rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential equation (eq 3) in which c represents the end point, a represents the amplitude of the fluorescence increase (<0), and k_{obs} represents the rate constant.

$$y = ae^{-k_{\text{obs}}t} + c \quad (3)$$

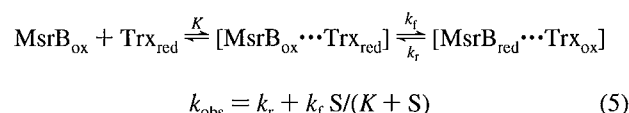
Data were fit to eq 4 using least-squares analysis to determine $k_{\text{obs max}}$ and K for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. S represents the Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe concentration, and K represents the K_s value for the substrate.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{obs max}}S/(K + S) \quad (4)$$

Kinetics of the Reduction of the Cys-117/Cys-63 MsrB Disulfide Bond by Trx by Single Turnover Stopped-Flow Experiments. Kinetic measurements of the Trx fluorescence quenching associated with the formation of the Cys-32/Cys-35 disulfide bond upon the reduction of the MsrB in the disulfide state (MsrB_{ox}) were carried out as previously described for MsrA (22). Briefly, the excitation wavelength was set at 310 nm, and the emitted light was collected above 320 nm using a cutoff filter. One syringe contained the MsrB_{ox} in buffer A (from 10 to 25 μM , final concentration), and the other one contained the Trx in the reduced form (Trx_{red}) at various concentrations in buffer A (from 50 to 1250 μM , final concentration). An average of six runs was recorded for each concentration of Trx. Rate constants, k_{obs} ,

were obtained by fitting fluorescence traces with the monoexponential eq 2 with $a > 0$.

Data were fit to eq 5 using least-squares analysis to determine k_r , k_f , and K for Trx. S represents the Trx concentration, K represents the K_s value for Trx, and k_r and k_f represent the rate constants of the disulfide exchange in the reverse and forward directions, respectively.



Eq 5 was used, assuming that binding of Trx_{red} to MsrB_{ox} is rapid equilibrium.

RESULTS AND DISCUSSION

Catalytic Constants with Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. The catalytic constants of *N. meningitidis* MsrB were determined with Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe and Trx1 from *E. coli* as substrates and Trx reductase from *E. coli* and NADPH as the Trx-regenerating system. Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe was used instead of MetSO because MsrB displays a better affinity for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, and thereby, kinetic parameters of the reductase step could be determined at saturating concentration. K_M for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe and Trx and k_{cat} value at pH 8 and 5.5 were $2.2 \pm 0.6 \text{ mM}$, $140 \pm 22 \mu\text{M}$, and $0.51 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$ and $7 \pm 2 \text{ mM}$, $104 \pm 26 \mu\text{M}$, and $0.30 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, respectively. Doubling or halving the concentration of Trx reductase did not affect the k_{cat} value.

The fact that saturation kinetics were observed with a low K_M for Trx showed that Trx is a specific recycling reductant for MsrB similarly to that observed for *N. meningitidis* MsrA (6). Therefore, this suggests that specific interactions exist between Trx and Msrs. It is important to note that the affinity constant for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe has to be divided by 2, taking into account the fact that the isomer of MetSO is neither a substrate nor an inhibitor of MsrB (6).

Rate-Limiting Step Is Not Associated with the Concomitant Formation of the Sulfenic Acid Intermediate and of Ac-L-Met-NHMe. (A) *Rate of Formation of Ac-L-Met-NHMe in the Wild-Type and C63S Msrs.* A means to determine the rate of formation of the sulfenic acid intermediate was to attain that of the Ac-L-Met-NHMe, which is formed concomitantly. To do so, the stopped-flow apparatus was adapted in a quenched-flow mode as previously described by Antoine et al. (22). At various times of incubation of MsrB with Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, in the absence of Trx, the reaction mixture was quenched by mixing it with trifluoroacetic acid. Ac-L-Met-NHMe was then quantified by reverse-phase chromatography analysis. The study was done at 350 mM Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, a concentration that can be considered to be saturating (see K_s value determined for C63S MsrB). At pH 8, a burst of Ac-L-Met-NHMe formation was observed with a stoichiometry of 0.9 and 0.8 mol of Ac-L-Met-NHMe/mol of wild-type and C63S Msrs, respectively. However, the rate of the Ac-L-Met-NHMe formation was too fast, at least 50 s^{-1} , to be determined with the apparatus adapted for quenched-flow experiments, which gave a minimum aging time around 30 ms. In contrast, at pH 5.5, the rate was attainable, and the curve profile was fit to the

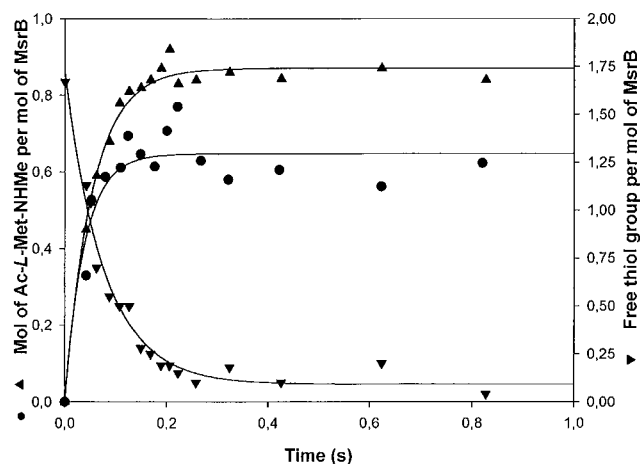


FIGURE 1: Time-resolved appearance of Ac-L-Met-NHMe for the wild type (▲) and C63S (●) MsrBs from *N. meningitidis* and disappearance of free thiols for the wild type (▼) under single turnover kinetics. The quenched-flow experiment was carried out at 25 °C in 50 mM MES, pH 5.5 as described in the Experimental Procedures. Symbols represent experimental data points (▲ for Ac-L-Met-NHMe quantification, ▼ for free thiol titration for the wild type, and ● for Ac-L-Met-NHMe for the C63S MsrB). Data of Ac-L-Met-NHMe quantification were fit to eq 1 and gave rate constants of 18 ± 1 and 23 ± 3 s⁻¹ with amplitudes of 0.87 ± 0.01 mol of Ac-L-Met-NHMe per mol of enzyme and 0.65 ± 0.02 mol of Ac-L-Met-NHMe per mol of enzyme for the wild type and C63S MsrBs, respectively. Data of free thiol titration were fit to eq 2 and gave a rate constant of 13 ± 1 s⁻¹ with amplitude of 1.82 ± 0.07 free thiol groups per mol of enzyme for the wild type.

monoexponential eq 1 with k_{obs} values of 18 and 23 s⁻¹ and a stoichiometry of 0.87 and 0.65 mol of Ac-L-Met-NHMe/mol of wild-type and C63S MsrBs, respectively (Figure 1). The fact that a stoichiometry of only 0.8 and 0.65 mol of Ac-L-Met-NHMe/mol of C63S MsrB was found at pH 8 and pH 5.5, respectively, remains to be explained. A possibility was that MsrB in the sulfenic acid state and reduced MsrB (MsrB_{red}) reacted together to form a dimer and thus decreased the concentration of C63S MsrB. In fact, it is not the case because on nonreducing gels, no significant amount of dimer was observed (gels not shown).

As expected, substituting Ser for Cys-63 has no significant effect on the rate of formation of Ac-L-Met-NHMe. More importantly is the fact that the rates of the reductase step for the wild-type and C63S MsrBs are at least 60-fold higher than the k_{cat} value determined for the wild type under steady-state conditions and at the same pH of 5.5.

(B) Rate of Formation of the Sulfenic Acid Intermediate in the C63S MsrB. Another approach to determine the rate of formation of the sulfenic acid intermediate was to follow a specific message associated with the oxidation of the catalytic cysteine. As shown next, the probe used was Trp-65 whose fluorescence emission intensity at 343 nm decreases upon going from the reduced to the sulfenic acid forms. The study was done with the C63S MsrB, which accumulates the sulfenic acid intermediate but not with the wild type, which accumulates the disulfide intermediate in the absence of Trx (see next paragraph).

As shown in Figure 2A, wild-type MsrB_{red} presented a maximum excitation wavelength at 291 nm and a fluorescence emission maximum at <320 nm with a shoulder at 343 nm. This suggested a contribution of tyrosine and of tryptophan residues to the fluorescence signal at <320 and

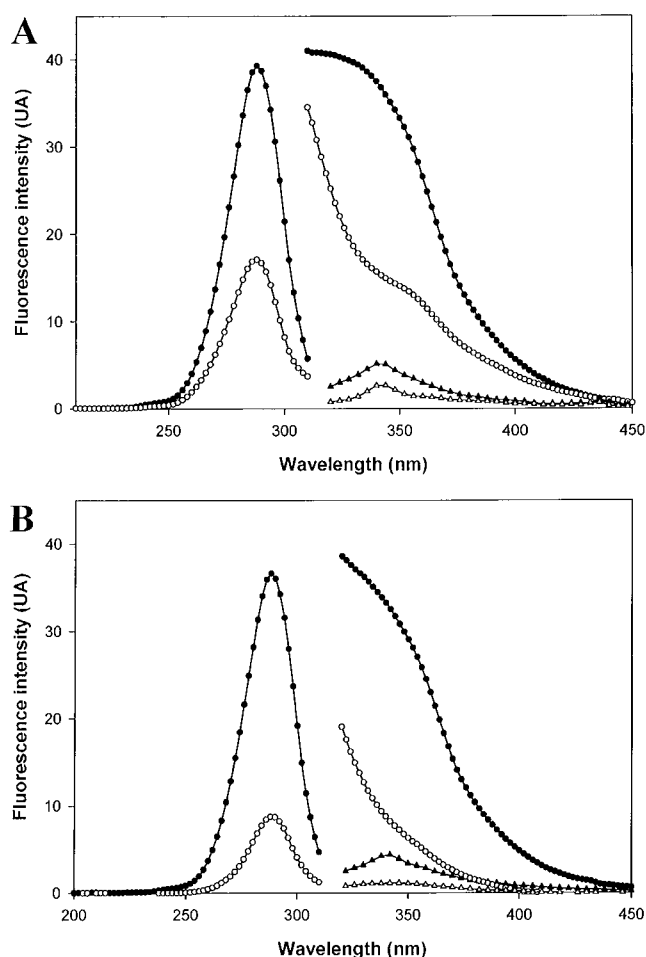


FIGURE 2: Fluorescence spectra of *N. meningitidis* wild-type MsrB_{red} and MsrB_{ox} and of *N. meningitidis* C63S MsrB in reduced and sulfenic acid states. All the spectra were recorded with 10 μM protein at 25 °C in buffer A, pH 8. In panel A, the wild type: excitation spectra of MsrB_{red} (●) and MsrB_{ox} (○) (emission followed at 340 nm), emission spectra of MsrB_{red} (●) and MsrB_{ox} (○) (excitation at 291 nm) and MsrB_{red} (▲) and MsrB_{ox} (△) (excitation at 310 nm). In panel B, the C63S MsrB: excitation spectra of MsrB_{red} (●) and MsrB sulfenic acid form (○) (emission followed at 340 nm), emission spectra of MsrB_{red} (●) and MsrB sulfenic acid form (○) (excitation at 291 nm), and emission spectra of MsrB_{red} (▲) and MsrB sulfenic acid form (△) (excitation at 310 nm).

343 nm, respectively. In MsrB from *N. meningitidis*, there are nine tyrosines and one tryptophan at position 65. The fact that in W65F MsrB, the fluorescence emission strongly decreased at >320 nm with a disappearance of the shoulder at 343 nm when the excitation was done at 291 nm confirmed the contribution of only Trp-65 in the fluorescence emission at 343 nm (spectrum not shown). Inspection of the X-ray structure shows that Trp-65 is situated in a loop near the catalytic Cys-117 and has recently been shown to be implicated in the binding of the methyl group of the substrate (data not shown). Thus, Trp-65 could be a good candidate to probe a change of the active site environment along the reductase process.

This was shown on the C63S MsrB, which accumulates the sulfenic acid intermediate. When excited at 291 nm, C63S MsrB in a sulfenic acid state showed a fluorescence emission at 343 nm that decreased by a factor of 50% (integrated from 320 to 450 nm) when compared with that of the MsrB_{red} (Figure 2B). Therefore, the presence of a sulfenic acid on

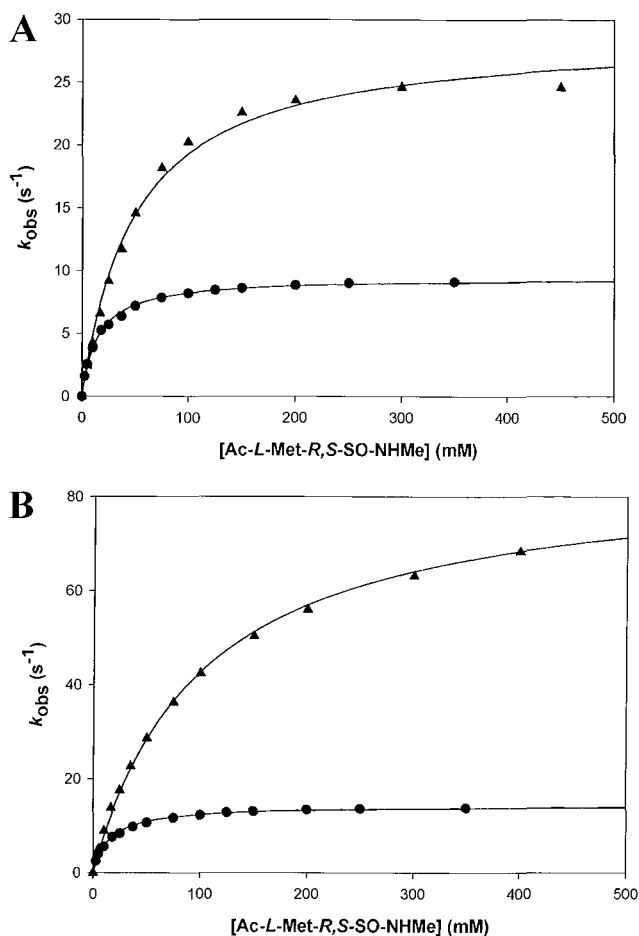


FIGURE 3: Determination of the catalytic parameters of the reductase step of wild type (A) and C63S MsrB (B) from *N. meningitidis* in buffer A pH 8 (\blacktriangle) and in MES buffer pH 5.5 (\bullet) measured by fluorescence stopped-flow under single turn-over kinetics. The MsrB fluorescence decrease was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C. Final concentration of wild-type and C63S MsrBs was 10 μ M. Excitation wavelength was set at 291 nm, and emitted light was collected above 320 nm using a cutoff filter. Data were fit to eq 4, which gave $k_{obs\ max}$ and K_s values of $28.9 \pm 0.7\ s^{-1}$ and $49 \pm 4\ mM$ and $9.5 \pm 0.1\ s^{-1}$ and $15 \pm 1\ mM$ for the wild type in buffer A and in 50 mM MES buffer pH 5.5, respectively, and $85 \pm 1\ s^{-1}$ and $101 \pm 4\ mM$ and $14.3 \pm 0.3\ s^{-1}$ and $15 \pm 1\ mM$ for the C63S MsrB in buffer A, pH 8, and in 50 mM MES buffer pH 5.5, respectively.

the catalytic Cys-117 likely modifies locally the Trp-65 environment, leading to a quenching of its fluorescence emission message. At pH 8 and 5.5, a fast decrease of the fluorescence signal of the C63S MsrB was observed with the Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe concentrations used. All the curves fitted to the monoexponential eq 2 with k_{obs} values ranging from 1 to 70 s^{-1} . From the curve of k_{obs} versus substrate concentration, K_s values of 101 and 15 mM for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe and $k_{obs\ max}$ values of 85 and 14.3 s^{-1} were determined at pH 8 and 5.5, respectively (Figure 3B). The k_{obs} values determined at pH 8 and 5.5 are 163- and 48-fold higher than those determined under steady-state conditions for the wild type, respectively.

Therefore, it can be concluded that the rate of the reductase process determined by the two approaches (i.e., by following the rate of formation of either Ac-L-Met-NHMe or the sulfenic acid intermediate) is largely higher than the k_{cat} . This demonstrates that the rate-limiting step in MsrB takes place after the formation of the sulfenic acid intermediate and is

associated with either the Cys-117/Cys-63 disulfide bond formation or the Trx reduction process.

Rate of Formation of the Cys-117/Cys-63 MsrB Disulfide Bond Is Not Rate-Limiting and Is as Fast as That of Sulfenic Acid Intermediate and Met Formations. One approach is to determine the rate of the intradisulfide bond formation in the wild type by following a specific message associated with its formation, such as a modification of the Trp-65 fluorescence emission intensity, provided that the message can be differentiated from that observed upon formation of the sulfenic acid intermediate. In fact, a quenching of the Trp-65 emission fluorescence intensity due to formation of the Cys-117/Cys-63 disulfide bond is also observed and is moreover similar to that observed upon formation of the sulfenic acid intermediate in the C63S MsrB (Figure 2B). Moreover, K_s for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe and the $k_{obs\ max}$ values of the wild-type MsrB at pH 8 and 5.5 determined by following the quenching of the Trp-65 fluorescence are in the same range as those determined for the C63S MsrB (Figure 3A and data in legend of Figure 3A). Consequently, it was not possible to attain the rate of the disulfide bond formation using Trp-65 as a fluorescent probe.

Therefore, there remained only one method to determine the rate of formation of the Cys-117/Cys-63 MsrB disulfide bond. It was to follow the loss of the two free thiol groups by quenched-flow experiments. Indeed, the Cys-117 free thiol group is lost first in the reductase step, whereas the Cys-63 free thiol group is lost only in the second step, which leads to formation of the Cys-117/Cys-63 MsrB disulfide bond. This analysis was done with the samples obtained from the quenched-flow experiments described previously. At pH 5.5 and with 350 mM Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe, the curve profile was fit to the monoexponential eq 2, with a concomitant loss of two cysteines and a k_{obs} value of 13 s^{-1} (Figure 1). The fact that the k_{obs} value was in the range of that determined by following Ac-L-Met-NHMe formation with the wild type and the C63S MsrBs as well suggested that as soon as Cys-117 is oxidized in the sulfenic acid form in the wild-type, Cys-63 attacks it and forms a disulfide bond. In other words, the rate of the nucleophilic attack of Cys-63 on the Cys-117 sulfenic intermediate is limited by that determining the formation of the sulfenic acid intermediate, which as a consequence cannot accumulate. Therefore, the rate-limiting step in MsrB takes place after the Cys-117/Cys-63 disulfide bond formation, and the rate-determining step in the formation of the disulfide bond is governed by that leading to formation of the sulfenic acid intermediate.

Rate-Limiting Step Probably Takes Place within the Trx-Recycling Process After the Two-Electron Chemical Exchange. The rate of formation of the Trx_{ox} was determined by following the decrease of the Trx fluorescence intensity upon going from Trx_{red} to Trx_{ox} during the reduction of the Cys-117/Cys-63 disulfide bond of the MsrB. To interpret the data, we should first verify that the change in the fluorescence signal of the MsrB upon going from the oxidized disulfide to the reduced forms did not interfere with the Trx message. As shown in Figure 4, when the excitation wavelength was set at 310 nm, the fluorescence message of MsrB increases upon going from MsrB_{ox} to MsrB_{red}. Therefore, the decrease in fluorescence intensity corresponded to a change in the fluorescence message of the Trx. Under the experimental conditions used, at pH 8, the

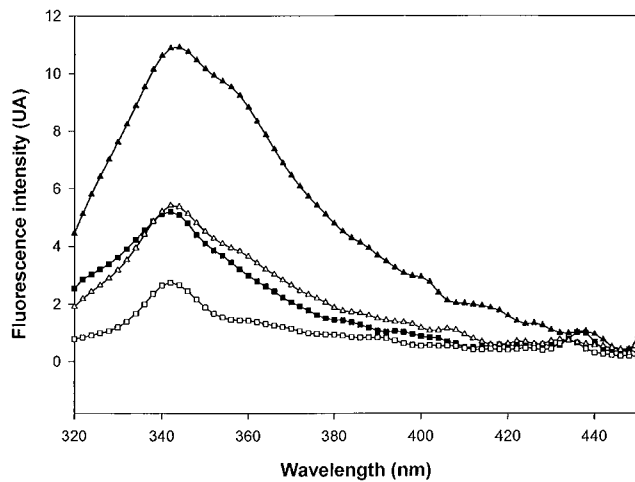


FIGURE 4: Fluorescence emission spectra of the *E. coli* Trx_{red} and Trx_{ox} and of the *N. meningitidis* MsrB_{red} and MsrB_{ox}. Fluorescence spectra of 10 μM MsrB_{red} (■) and MsrB_{ox} (□) and 10 μM Trx_{red} (▲) and Trx_{ox} (△) were recorded at 25 °C on excitation at 310 nm.

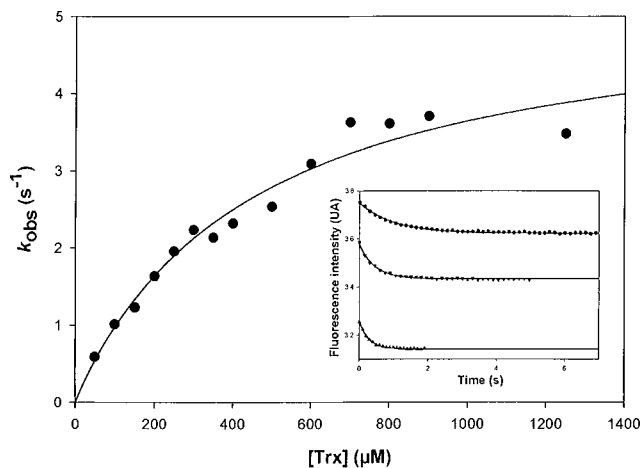


FIGURE 5: Rate of reduction of the Cys-117/Cys-63 disulfide bond of the *N. meningitidis* MsrB by *E. coli* Trx measured by fluorescence stopped-flow experiments. The Trx fluorescence quenching associated with Trx disulfide bond formation was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C in buffer A pH 8 by mixing Trx_{red} and MsrB_{ox}. MsrB final concentration varied from 10 to 25 μM. Excitation wavelength was set at 310 nm, and emitted light was collected above 320 nm using a cutoff filter. Data were fit to eq 5, which gave k_f , k_r , and K_s values of $5.2 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, and $440 \pm 75 \text{ μM}$, respectively. Symbols (●) represent experimental data points. Inset: representative sampling of primary data: 10 μM MsrB_{ox} and 100 μM Trx_{red} (●), 15 μM MsrB_{ox} and 300 μM Trx_{red} (▼), and 25 μM MsrB_{ox} and 800 μM Trx_{red} (▲). Data were fit to eq 2 with $a > 0$, which gave k_{obs} of 1.01 ± 0.01 , 2.23 ± 0.02 , and $3.64 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ at 100, 300, and 800 μM Trx, respectively.

concentration of the Cys-117/Cys-63 disulfide MsrB varied from 10 to 25 μM, and the concentration of the Trx_{red} varied from 50 to 1250 μM. For each concentration of Trx, a k_{obs} value was determined. Assuming binding of Trx_{red} to MsrB_{ox} is rapid equilibrium and using eq 5, a K_s value of 440 μM for Trx and k_f and k_r values of 5.2 and $\sim 0 \text{ s}^{-1}$ can be determined from the curve k_{obs} versus Trx concentration, respectively (Figure 5). The fact that the curve passes through the origin indicates that, in first approximation, the recycling process going up to disulfide exchange can be considered as irreversible; therefore, the k_{obs} value is presumably measuring the rate of the chemical reaction. The values of

K_s and k_f are 3.2- and 10-fold higher than the K_M and k_{cat} values determined under steady-state conditions in which the Trx-reductase recycling system was assumed to not be rate-limiting. To confirm that the k_{cat} value obtained with the Trx-reductase recycling system was indeed measured under steady-state conditions, the k_{cat} value was also determined by following the rate of Ac-L-Met-NHMe formation in the absence of Trx reductase, at saturating concentration of Ac-L-Met-*R,S*-SO-NHMe and Trx. The rate was 1.3 s^{-1} . A rate constant of 1 s^{-1} was obtained when reduction of MsrB_{ox} by Trx_{red} was carried out in the presence of Trx reductase by following NADPH disappearance (experiments not shown). In both cases, the rate constants are in the range of that determined under steady-state conditions in the presence of Trx reductase. Therefore, the fact that the k_{cat} value is significantly lower than the k_f value strongly supports a rate-limiting step within the Trx-recycling process that takes place after the two-electron chemical exchange and thus is associated with release of Trx_{ox}. In this context, release of Trx_{ox} could be rate limited by a conformational change of the MsrB_{red}/Trx_{ox} complex. If so, it is probable that a similar conformational change of the MsrB_{ox}/Trx_{red} complex also takes place after formation of the Michaelis complex. This latter conformational change could be rate-determining in the formation of the MsrB_{red}/Trx_{ox} complex. Further studies including methods to directly investigate MsrB/Trx binding kinetics should be done to settle such hypotheses.

CONCLUSION

We have shown that (1) the rate-limiting step in MsrB is within the Trx-recycling process and probably takes place after the two-electron chemical exchange and (2) the formation of the sulfenic acid intermediate is rate determining within the two-step process leading to formation of the intradisulfide Cys-117/Cys-63 intermediate. As already mentioned, the active sites of MsrA and MsrB are structurally different. In particular, the amino acids involved in the activation of the reductase step are different. This includes the amino acids implicated in (1) the decrease of the pK_a of the catalytic cysteine, (2) the increase of the electrophilic character of the sulfoxide, and (3) the 1,3-sigmatropic rearrangement that leads to formation of the sulfenic acid intermediate. Compared to that of the *N. meningitidis* MsrA, the rate of the reductase step that leads to the sulfenic acid intermediate at pH 8 is 20-fold slower in MsrB (22). This remains to be explained but likely reflects differences in the nature of the amino acids of the two active sites involved either in the catalysis or in the substrate recognition.

The fact that the rate-limiting step within the Trx-recycling process probably takes place after the two-electron chemical process in MsrB raises the question as to whether the structurally unrelated MsrA behaves similarly. The data recently published by our group on the MsrA from *N. meningitidis* have clearly shown that the Trx-recycling process is rate limiting. But no definitive conclusion was given on which step was rate limiting within the Trx process (22). Interpreting now the experimental data published and by comparison with those from MsrB, it can be concluded that MsrA likely behaves similarly to MsrB. Indeed, under single turnover conditions, at pH 8, using eq 5, the K_s constant of MsrA for Trx and the k_f and k_r values determined

from the curve k_{obs} versus Trx concentration were $930 \mu\text{M}$, 50 s^{-1} , and $\sim 0 \text{ s}^{-1}$, respectively, whereas under steady-state conditions the K_{M} for Trx and the k_{cat} constant were $75 \mu\text{M}$ and 7 s^{-1} , respectively (22). Therefore, the rate limiting step for MsrA probably also takes place after the two-electron chemical exchange. Consequently, release of Trx_{ox} is likely rate limiting for both MsrA and MsrB from *N. meningitidis*.

MsrB represents an interesting example of convergent evolution in which two structurally unrelated proteins have evolved to catalyze the same reaction with the same chemical and kinetic mechanisms but with an opposite MetSO stereoselectivity. Studies are presently underway to characterize all the amino acids of the MsrA and MsrB from *N. meningitidis*, which are involved not only in the chemical activation of the three steps but also in the substrate specificities.

ACKNOWLEDGMENT

We are very grateful to Dr. F. Barras for the gift of the BE002 strain, to A. Kriznik for Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe synthesis and purification, to Dr. A. Van Dorsselaer for mass determination, to Dr. E. McRae for careful reading of the manuscript, and to Dr. W. Wallace Cleland, University of Wisconsin, Madison, for critically reading the manuscript.

REFERENCES

1. Brot, N., Weissbach, L., Werth, J., and Weissbach, H. (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2155–2158.
2. Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R., and Stadtman, E. R. (2000) Overexpression of peptide–methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress, *J. Biol. Chem.* **275**, 14167–14172.
3. Sharov, V. S., Ferrington, D. A., Squier, T. C., and Schoneich, C. (1999) Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase, *FEBS Lett.* **455**, 247–250.
4. Moskovitz, J., Singh, V. K., Requena, J., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K., and Stadtman, E. R. (2002) Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 62–65.
5. Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J., and Barras, F. (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase, *J. Biol. Chem.* **276**, 48915–48920.
6. Olyry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaer, A., and Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022.
7. Levine, R. L., Moskovitz, J., and Stadtman, E. R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation, *IUBMB Life* **50**, 301–307.
8. Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., and Stadtman, E. R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage, *Mech. Ageing Dev.* **107**, 323–332.
9. Brot, N., and Weissbach, H. (2000) Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role, *Biopolymers* **55**, 288–296.
10. Stadtman, E. R., Moskovitz, J., and Levine, R. L. (2003) Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences, *Antioxid. Redox. Signal* **5**, 577–582.
11. Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M., and Stadtman, E. R. (1998) Overexpression of peptide–methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14071–14075.
12. Wizemann, T. M., Moskovitz, J., Pearce, B. J., Cundell, D., Arvidson, C. G., So, M., Weissbach, H., Brot, N., and Masure, H. R. (1996) Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7985–7990.
13. Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F., and Barras, F. (1999) The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 887–892.
14. Dhandayuthapani, S., Blaylock, M. W., Bebear, C. M., Rasmussen, W. G., and Baseman, J. B. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*, *J. Bacteriol.* **183**, 5645–5650.
15. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G., and Aubry, A. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine–sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution, *Structure Fold. Des.* **8**, 1167–1178.
16. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H., and Matthews, B. W. (2000) Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an antioxidation enzyme, *Biochemistry* **39**, 13307–13312.
17. Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Matthews, B. W. (2002) The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB, *Nat. Struct. Biol.* **9**, 348–352.
18. Kauffmann, B., Favier, F., Olyry, A., Boschi-Muller, S., Carpentier, P., Branlant, G., and Aubry, A. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB, *Acta Crystallogr., Sect. D* **58**, 1467–1469.
19. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S., and Hart, P. J. (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine, *J. Bacteriol.* **185**, 4119–4126.
20. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaer, A., and Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913.
21. Boschi-Muller, S., Azza, S., and Branlant, G. (2001) *Escherichia coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide, *Protein Sci.* **10**, 2272–2279.
22. Antoine, M., Boschi-Muller, S., and 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**, 45352–45357.
23. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active sites of other thiol/disulfide oxidoreductases, *Protein Sci.* **7**, 1233–1244.
24. Mulrooney, S. B. (1997) Application of a single-plasmid vector for mutagenesis and high-level expression of thioredoxin reductase and its use to examine flavin cofactor incorporation, *Protein Expr. Purif.* **9**, 372–378.

BI049306Z

PARTIE III :

**Acides aminés impliqués dans la
première étape du mécanisme
catalytique des MsrB**

Comme montré dans le chapitre précédent, l'étape réductase du mécanisme des MsrB est très rapide et non limitante. La question qui se pose maintenant est de caractériser les facteurs moléculaires et structuraux qui sont impliqués dans l'efficacité de cette activité réductase. En effet, pour être efficace, cette étape nécessite, 1) l'activation de la Cys117 sous forme thiolate pour attaquer le substrat sulfoxyde, 2) la présence d'une catalyse acide pour augmenter le caractère électrophile de l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde afin de faciliter l'attaque nucléophile du thiolate et de favoriser le réarrangement sigmatropique 1,3 postulé et; 3) la présence d'un site de spécificité adapté pour la reconnaissance de l'isomère *R* de la MetSO tant au niveau du sulfoxyde que du groupement méthyle ϵ .

Comme mentionné dans la partie Introduction, les structures tridimensionnelles de la MsrB de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae* ont été résolues par RX. La MsrB de *N. gonorrhoeae* a été cristallisée en présence d'une molécule de cacodylate non liée covalamment, ce qui pourrait être un bon modèle mimant le substrat MetSO fixé dans le site actif. L'examen de cette structure nous a ainsi permis d'émettre des hypothèses sur la nature des acides aminés impliqués dans la reconnaissance du substrat et/ou dans la catalyse au niveau de la première étape. Ainsi, l'existence d'une distance entre l'un des oxygènes du cacodylate et l'atome d'azote δ_1 de l'His103 compatible avec la formation d'une liaison hydrogène permet de postuler un rôle de catalyseur acide au niveau de la première étape pour l'His103. Afin de confirmer nos hypothèses, une étude par ingénierie a été entreprise. Ainsi, les acides aminés susceptibles d'être impliqués dans la catalyse et/ou dans la spécificité structurale des MsrB ont été remplacés et les propriétés cinétiques de chacun des mutants protéiques sont en cours d'analyse en utilisant les mêmes techniques que celles utilisées pour les enzymes sauvages. En parallèle, la détermination du pKa des résidus impliqués dans la première étape a été réalisée. Dans la suite de ce chapitre, seuls les résultats de la détermination des pKa seront décrits, l'étude des différents mutants protéiques étant poursuivie par Fabrice Neiers, actuellement en deuxième année de thèse au laboratoire.

I. Détermination des pK_{app} des Cys117 et Cys63 catalytiques dans l'enzyme libre

Les pKa des Cys63 et Cys117 de la MsrB ont été déterminés en utilisant une sonde chimique spécifique des résidus Cys, le 2,2'-dithiodipyridine (2PDS). Cette sonde réagit avec les fonctions thiolates et la réaction libère de la pyridine-2-thione qui est un chromophore absorbant à 343 nm avec un ϵ de $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La réaction du 2PDS avec la MsrB suit une cinétique de pseudo-premier-ordre avec la libération de 2 moles de pyridine-2-thione par mole d'enzyme. La courbe k_2

Résultats Partie III

en fonction du pH, présentée ci-dessous (Figure 31), s'ajuste à une équation de type monosigmoïde avec un $pK_{app} \geq 9,5$ et un k' de $(9,6 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce résultat montre que les deux Cys sont accessibles dans la MsrB, la valeur de k' étant proche de celle d'une Cys libre comme dans le GSH.

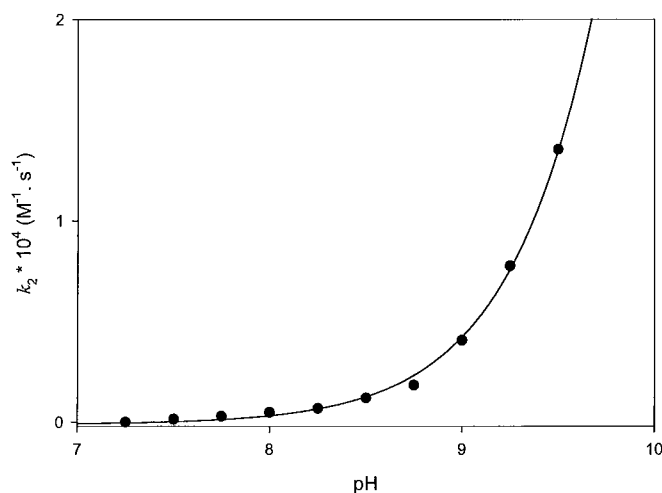


Figure 31 : Variation, en fonction du pH, de la constante de second-ordre k_2 de la réaction des groupements thiols de la MsrB sauvage de *N. meningitidis* avec le 2PDS. Les expériences ont été réalisées à température ambiante avec un polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, Acide acétique 30 mM de pH 7,25 à 9,5. La concentration en MsrB sauvage est de 10 μM , celle de 2PDS est de 300 μM . Les valeurs de k_2 ont été ajustées à l'équation d'une monosigmoïde ($f = y + (k' / (1 + 10^{(pK_a - pH)}))$) et les paramètres obtenus sont les suivants : $pK_{app} = 11 \pm 2$, et $k' = (9,6 \pm 0,8) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les points représentent les valeurs expérimentales et le trait continu l'ajustement. L'enzyme n'étant pas stable à des pH supérieurs à 9,5, les valeurs de k_2 n'ont pas pu être déterminées à des pH plus élevés.

Le fait que la courbe s'ajuste sur l'équation d'une monosigmoïde montre que les deux résidus Cys ont des pK_a équivalents et élevés dans l'enzyme libre. Or, la Cys117 doit être sous forme thiolate pour attaquer la fonction sulfoxyde dans la première étape réductase. Le fait que le pH optimum de l'activité réductase soit de 7 (Figure 32, p. 104) implique que le pK_a est inférieur à 7 dans le complexe michaélien. Ceci suggère que la formation du complexe michaélien amène à une réorganisation locale du site actif.

II. Détermination des pK_{app} des résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase

Les pK_a des résidus impliqués dans la catalyse de l'étape réductase ont été obtenus en suivant la variation du k_{obsmax} de l'étape réductase en fonction du pH. Pour cela, le k_{obsmax} a été déterminé en suivant la variation de l'émission de fluorescence du Trp65 (situé dans la poche de spécificité structurale, voir page 66) à différents pH et en présence de concentrations saturantes en substrat. Les études ont été réalisées avec la MsrB sauvage et le mutant protéique Cys63Ser, afin de vérifier que la variation de l'émission de fluorescence restait bien associée à la formation de

l'intermédiaire acide sulfénique sur toute la gamme de pH testée. En effet, il était envisageable qu'à certains pH, la vitesse de l'étape de formation du pont disulfure intramoléculaire devienne plus lente que celle de l'étape réductase. Dans ces conditions, la vitesse mesurée par fluorescence avec la MsrB sauvage aurait été représentative de la vitesse de formation du pont disulfure. Les résultats sont présentés dans la figure 32 ci-dessous :

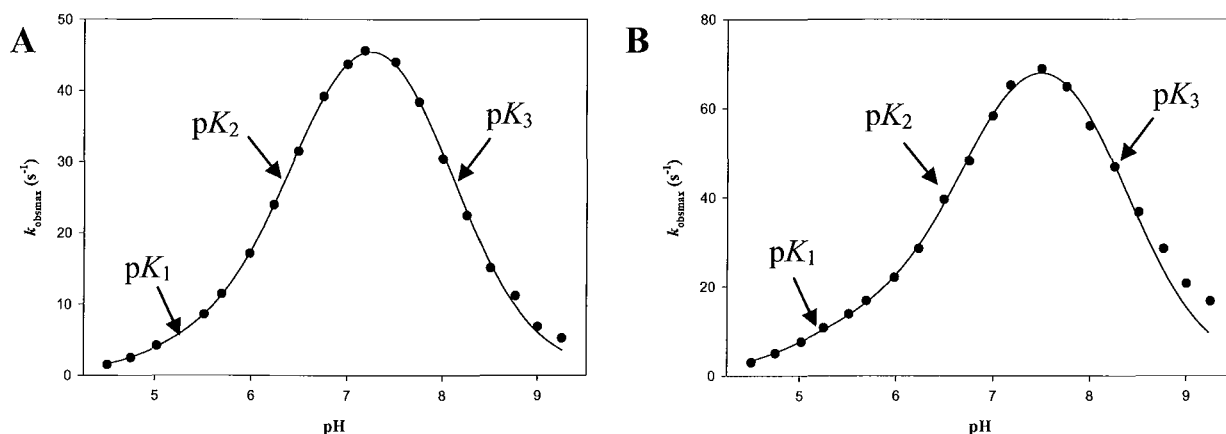


Figure 32 : Variation en fonction du pH de la constante de vitesse k_{obsmax} associée à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique pour la MsrB sauvage (A) et la MsrB Cys63Ser (B). Les expériences ont été réalisées à une température de 25 °C dans le polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, Acide acétique 30 mM à des pH de 4,5 à 9,25. La concentration en MsrB est de 10 μ M, celle d'Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe de 350 mM. L'ensemble des points a été ajusté à une équation à trois pKa : $f = ((10^{(-2 * pH - pK1)} * k_1) + (10^{(-pH - pK1 - pK2)} * k_2)) / ((10^{(-pK1 - pK2 - pK3)} + (10^{(-pH - pK1 - pK2)} + (10^{(-2 * pH - pK1)} + (10^{(-3 * pH)}))$. Pour le mutant protéique Cys63Ser, les valeurs expérimentales obtenues à des pH supérieurs à 8,5 n'ont pas été prises en compte pour l'ajustement en raison de la divergence observée avec la courbe théorique qui reste à être expliquée. Les pK_{app} et les constantes k obtenus sont les suivants : $pK_1 = 5,0 \pm 0,4$; $pK_2 = 6,5 \pm 0,1$; $pK_3 = 8,0 \pm 0,1$; $k_1 = 6 \pm 3 s^{-1}$; $k_2 = 59 \pm 1 s^{-1}$ pour la MsrB sauvage, et $pK_1 = 5,0 \pm 0,2$; $pK_2 = 6,8 \pm 0,1$; $pK_3 = 8,3 \pm 0,1$; $k_1 = 14 \pm 2 s^{-1}$; $k_2 = 88 \pm 2 s^{-1}$ pour la MsrB Cys63Ser. Les points représentent les valeurs expérimentales, le trait continu noir l'ajustement à l'équation à 3 pKa décrite ci-dessus.

Les deux profils de k_{obsmax} en fonction du pH s'ajustent à une équation à trois pKa, et les valeurs de ces pKa sont sensiblement identiques entre la MsrB sauvage et le mutant protéique Cys63Ser, confirmant que la formation de l'acide sulfénique est bien suivie sur toute la gamme de pH. Ceci montre l'implication d'au moins trois groupements ionisables dans la catalyse de l'étape réductase : un groupement de $pK_{app} 5,0 \pm 0,2$ qui doit être déprotoné, un second de $pK_{app} 6,7 \pm 0,1$ dont la déprotonation augmente la vitesse de l'étape réductase d'un facteur 5, et un troisième de $pK_{app} 8,1 \pm 0,2$ qui doit être protoné.

Se pose maintenant la question de la nature des résidus qui portent ces fonctions ionisables, et de leur rôle dans la catalyse. Le premier pK_{app} doit correspondre à celui de la Cys catalytique, qui serait abaissé d'au moins 4 unités de pH dans le complexe Michaélien par rapport à celui dans l'enzyme libre. Le troisième pK_{app} pourrait lui correspondre à celui du catalyseur acide. Lorsque ce

Résultats Partie III

groupement est déprotoné, il n'y a plus d'activité, ce qui est en accord avec un rôle de catalyseur acide de ce groupement. Ce catalyseur pourrait être l'His103. Quant au deuxième pK_{app} de 6,7, nous n'avons pour le moment pas pu l'attribuer à un acide aminé particulier. Sa nature et son rôle restent à déterminer.

III. Conclusion

Nos résultats suggèrent que le pK_a de la Cys117 catalytique passerait d'une valeur $\geq 9,5$ dans l'enzyme libre à une valeur de 5,0 dans le complexe michaélien. Ceci indique qu'une réorganisation locale du site actif doit avoir lieu lors de la formation du complexe, qui doit être un préalable pour que l'étape réductase soit efficace. Il reste maintenant à définir les facteurs moléculaires responsables de l'abaissement du pK_{app} de la Cys117 dans le complexe michaélien.

La présence des résidus Arg115 et Asp107 proches de la Cys117 dans la MsrB de *N. gonorrhoeae* avait conduit Lowther *et al.* à postuler que la Cys117 ferait partie d'une triade catalytique Cys/Arg/Asp, qui serait responsable de son activation (Lowther *et al.*, 2002). Des résultats préliminaires portant sur des études de variants protéiques des positions Arg115 et Asp107 montrent qu'il n'en est rien (Neiers *et al.*, résultats non publiés).

D'autre part, les courbes à saturation de substrat en fonction du pH dans l'étape réductase montrent qu'un acide aminé avec un pK_{app} de 8 joue le rôle de catalyseur acide. L'His103 semble être un bon candidat.

L'identité du résidu qui présente le troisième pK_{app} reste à élucider. L'inspection de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. gonorrhoeae* montre que l'Asp82 pourrait jouer un rôle dans le positionnement de l'imidazole de l'His103, *via* la formation d'une liaison hydrogène avec l'atome d'azote ϵ_2 de l'His103, et ainsi intervenir éventuellement dans l'augmentation du pK_{app} de l'His103 ($pK_{app} = 8,0$).

PARTIE IV :

Etude de l'interaction MsrB-Trx

La Trx est une protéine ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus biologiques. Elle réduit des ponts disulfures de cibles protéiques très variées, dont les Msr. Assez peu d'informations sont disponibles sur la nature des interactions existant entre la Trx et ses cibles, dont les MsrB. Plusieurs résultats suggèrent qu'il doit exister une reconnaissance spécifique mais très localisée entre les MsrB sous forme pont disulfure et la Trx réduite. D'abord, une saturation par la Trx (K_M) est observée, ce qui montre qu'il existe une reconnaissance MsrB-Trx. D'autre part, l'étape cinétiquement limitante du mécanisme global est associée au relargage de la Trx oxydée, alors que la vitesse de formation de la Trx oxydée est plus rapide, ce qui suggère l'existence, en plus, d'une étape de changement conformationnel entre les deux partenaires avant leur dissociation et sans doute aussi lors de leur association.

Pour aborder l'identification des facteurs structuraux et/ou moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre la MsrB oxydée et la Trx réduite, la détermination de la structure tridimensionnelle d'un complexe MsrB/Trx par RX et/ou RMN était une des approches la plus appropriée. Plusieurs options se présentaient. L'une consistait à caractériser un complexe non covalent entre les deux partenaires. Cette approche n'est possible que si on est en présence d'une population homogène de complexe, par exemple MsrB oxydée/Trx réduite avec des affinités entre les deux partenaires suffisantes. Ces deux conditions ne sont pas réunies. Une approche, permettant d'avoir une population stable et homogène de complexe, consistait à former de façon artificielle un complexe covalent stable entre la MsrB et la Trx. Un préalable à cette approche était de connaître quelle est la cystéine de la MsrB oxydée qui forme un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys32 de la Trx.

Pour répondre à cette question, une méthode a été mise au point, basée sur l'identification par spectrométrie de masse de la Cys impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire en collaboration avec Guillaume Chevreux du laboratoire de Spectrométrie de Masse appliquée aux Protéine à Strasbourg (UMR 7560 CNRS/ULP). Cette méthode a consisté à former un complexe entre la MsrB oxydée et la Trx mutée Cys35Ser. Deux possibilités étaient envisageables. La Cys32 formait un pont disulfure intramoléculaire soit avec la Cys117 de la MsrB, soit avec la Cys63 (Figure 33, p. 107). Pour favoriser l'équilibre vers la forme intermoléculaire MsrB/Trx, un excès de trois fois en Trx par rapport à la MsrB a été utilisé. L'ajout d'iodoacétamide (IAM), qui réagit sur la Cys de la MsrB qui n'a pas été attaquée par la Cys32 de la Trx, permet de bloquer le pont disulfure intermoléculaire (MsrBCys117-TrxCys32Ser ou MsrBCys63-TrxCys32Ser). Il en résulte alors un complexe où une des deux Cys de la MsrB est alkylée (Figure 33, p. 107), l'autre

faisant un pont disulfure avec la Cys32 de la Trx. Cette alkylation peut être mise en évidence par analyse par spectrométrie de masse en mesurant la masse moléculaire des peptides obtenus après digestion du complexe par une protéase de spécificité structurale adéquate. En effet, le peptide contenant la Cys alkylée peut être identifié grâce à sa masse moléculaire caractéristique supérieure de 57 Da par rapport à celle du peptide non alkylé. De même, il est possible de caractériser la masse moléculaire du peptide hybride portant MsrBCys63-TrxCys32 ou MsrBCys117-TrxCys32.

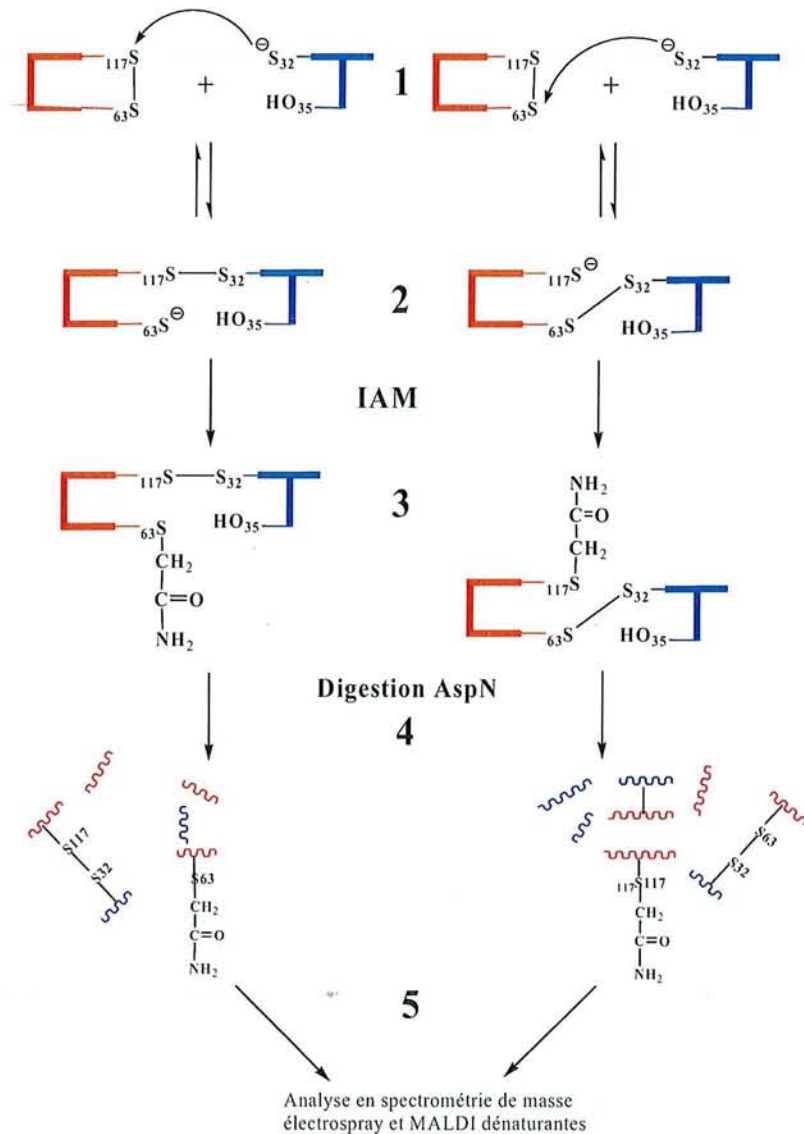


Figure 33 : Stratégie pour identifier la Cys de la MsrB de *N. meningitidis* oxydée qui forme un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys32 catalytique de la Trx. 1) les deux partenaires MsrB et Trx sont incubés, 2) les complexes MsrB-Trx se forment, 3) le complexe est stabilisé *via* l'alkylation de la Cys libre par l'IAM, 4) les complexes sont digérés par la protéase AspN et; 5) les produits de digestion sont analysés par spectrométrie de masse électrospray ou MALDI.

I. Résultats

I. 1. Formation des complexes stables MsrBCys117-TrxCys32 et MsrBCys63-TrxCys32

Les deux complexes impliquant l'un ou l'autre mutant protéique Cys de la MsrB et la Trx Cys35Ser ont servi de témoins pour valider les résultats obtenus sur le complexe MsrB sauvage-Trx Cys35Ser, 1) ils ont été utilisés pour déterminer le volume d'éluion sur la colonne de gel filtration SUPERDEX 75 du complexe MsrB-Trx, technique utilisée pour isoler le complexe, comme nous le verrons dans la partie ci-dessous, 2) ils ont également été utilisés comme témoins pour les analyses en spectrométrie de masse afin de déterminer la masse des peptides des deux partenaires contenant les résidus Ser63 et Ser117 et la masse des peptides hybrides MsrB-Trx après digestion par la protéase. En effet, le peptide hybride impliquant un peptide issu de MsrB est lié covalentement sous forme de pont disulfure à un peptide issu de la Trx contenant la Cys32.

La technique utilisée pour former ces deux complexes a consisté dans un premier temps à activer les Cys63 ou Cys117 de la MsrB mutée sur l'autre Cys avec le DTNB. L'ajout de Trx Cys35Ser permet ensuite de former le complexe covalent sous forme de pont disulfure (Figure 34). La formation de l'adduit avec le TNB⁻ et du complexe est suivie grâce à l'absorbance du TNB⁻ à 412 nm.

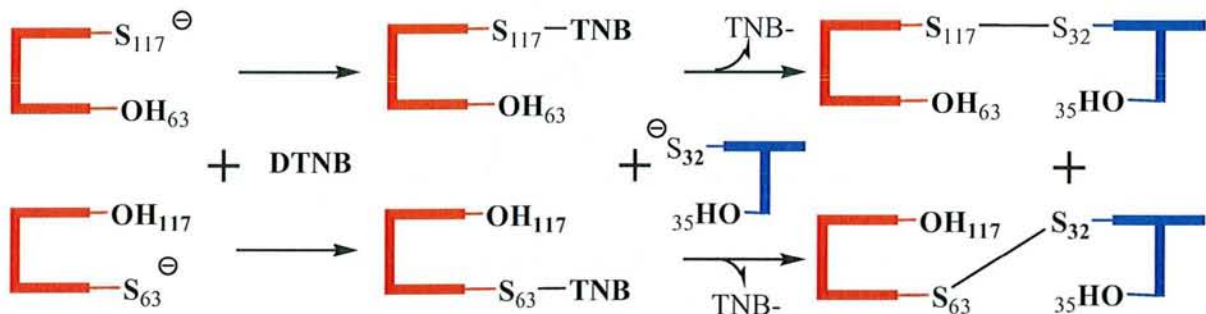


Figure 34 : Formation des complexes stables MsrB-Trx. La Cys de la MsrB réduite est activée par le DTNB par formation d'un adduit MsrB-TNB. L'addition de Trx Cys35Ser permet de former le complexe artificiel stable MsrB-Trx avec libération d'une molécule de TNB⁻.

I. 2. Formation du complexe stable MsrB sauvage-Trx Cys35Ser

Le complexe est formé comme décrit dans la partie "Matériels et Méthodes". Malgré un ajout de Trx en excès de trois fois, l'équilibre n'est pas totalement déplacé en faveur de la

forme complexée. Une étape de dénaturation par le SDS 1% permet d'obtenir un rendement de complexe plus élevé. Une hypothèse est que l'IAM réagirait plus vite avec la Cys32 de la Trx qu'avec la Cys libre de la MsrB, probablement à cause d'un problème d'encombrement stérique. Il en résulterait donc après ajout de l'IAM un déplacement de l'équilibre en faveur de la forme non complexée. L'ajout de SDS permet de dénaturer les deux partenaires et ainsi de limiter le déplacement de l'équilibre et d'augmenter la vitesse d'alkylation de la Cys libre de la MsrB par l'IAM. Le complexe covalent ainsi obtenu représente environ 10% de la quantité initiale de MsrB oxydée.

La colonne SUPERDEX 75 nous a permis de séparer et d'identifier les différentes espèces présentes dans le mélange réactionnel : MsrB oxydée, Trx Cys35Ser, dimère de Trx Cys35Ser sous forme de pont disulfure, complexe covalent MsrB sauvage-Trx Cys35Ser et enfin multimères de MsrB, de Trx Cys35Ser et de MsrB-Trx Cys35Ser (Figure 35). Afin d'identifier chaque espèce du mélange réactionnel, les volumes d'élution de la MsrB oxydée, Trx Cys35Ser alkylée et du complexe artificiel MsrBCys117-TrxCys32 ont été déterminés séparément.

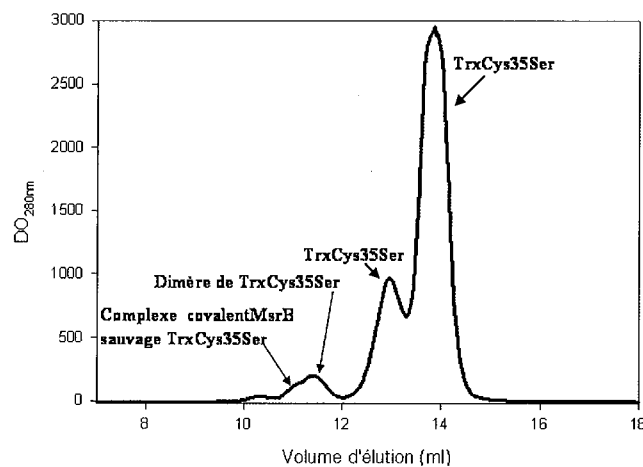


Figure 35 : Profil d'élution sur la colonne de gel filtration analytique SUPERDEX 75 du mélange MsrB sauvage sous forme oxydée pont disulfure/TrxCys35Ser en excès de trois fois. Le chromatogramme a été réalisé à température ambiante dans le tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0, KCl 300 mM. Le débit a été fixé à 0,4 ml/min.

I.3. Analyse des complexes MsrB-Trx Cys35Ser purifiés par spectrométrie de masse électrospray

Une fois les échantillons de complexes MsrB sauvage-Trx Cys35Ser purifiés, leur masse a d'abord été vérifiée par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes. Cette masse vérifiée, l'identification de la Cys alkylée ainsi que la nature du pont disulfure intermoléculaire ont été réalisés. Plusieurs étapes ont été nécessaires :

I. 3. 1. Vérification de la présence du complexe par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La spectrométrie de masse est une technique très sensible qui nécessite un échantillon homogène et sans sels. Chaque complexe a été purifié par gel filtration sur colonne SUPERDEX 75. Il contient 300 mM de KCl qui est présent dans le tampon de chromatographie pour éviter toute interaction électrostatique des protéines avec la matrice de la colonne de gel filtration. Avant analyse, chaque échantillon a donc été dessalé par chromatographie hydrophobe C₄ sur HPLC.

Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 3 ci-dessous sont en accord avec la présence de MsrB alkylée par l'IAM sur une de ses Cys et en tenant compte d'une différence supplémentaire de masse de 16 Da liée au changement d'une Cys en Ser sur les MsrB Cys117Ser et Cys63Ser.

Protéine	Masse théorique (Da)	Masse mesurée (Da)
MsrB réduite	16374	16374 ± 1
TrxCys35Ser réduite	11659	11659 ± 1
Complexe MsrBCys63-TrxCys32	28015	28015 ± 1
Complexe MsrBCys117-TrxCys32	28015	28015 ± 1
Complexe MsrB sauvage-Trx Cys35Ser + IAM	28088	28088 ± 1

Tableau 3 : Analyse en spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes de la MsrB sauvage, de la Trx Cys35Ser et des complexes covalents MsrBCys63-TrxCys32, MsrBCys117-TrxCys32 et MsrB sauvage-Trx Cys35Ser.

I. 3. 2. Digestion des complexes MsrB-Trx Cys35Ser et analyse par spectrométrie de masse MALDI

Plusieurs protéases ont été essayées et la plus efficace s'est avérée être la protéase AspN qui hydrolyse après les résidus Asp. Un dessalage sur C₁₈ permet de récupérer uniquement les peptides, ce qui a permis d'identifier uniquement la masse des peptides de

Résultats Partie IV

digestion issus de la MsrB. En effet, la Trx n'est pas digérée par la protéase AspN dans les conditions utilisées, ce qui pour l'instant n'est pas expliqué. La technique d'ionisation utilisée est le MALDI qui permet la détection avec une grande précision de composés de faible masse moléculaire. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous :

Complexe MsrBCys63-TrxCys32		Complexe MsrBCys117-TrxCys32		Complexe MsrB sauvage-Trx Cys35Ser + IAM	
Séquence	Masse (Da)	Séquence	Masse (Da)	Séquence	Masse (Da)
Asp98-Pro106	1008,5	Asp98-Pro106	1008,5	Asp98-Pro106	1008,5
Asp35-Val44	1188,7	Asp35-Val44	1188,7	Asp35-Val44	1188,7
Asp133-lys146	1304,6	Asp133-lys146	1304,6	Asp133-lys146	1307,8
Asp82-Ala97	1939,9	Asp60-ILeu72	1406,7	Asp60-ILeu72	1422,7
Asp81-Ala97	2054,9	Asp81-Ala97	2054,9	Asp60-ILeu72 + CH₂-CO-NH₂	1479,7
Asp81-Ala97	2070,9	Asp60-His80	2274,1	Asp81-Ala97	2055,0
Asp35-Ala56	2377,1	Asp35-Ala56	2376,2	Asp81-Ala97	2070,0
Asp107-Met132	2437,2	Asp6-Tyr28	3451,7	Asp60-His80	2290,1
Asp107-Met132	2453,3	Thr1-Tyr28	4156,2	Asp60-His80 + CH₂-CO-NH₂	2347,1
Asp107-Met132	2862,5			Asp35-Ala56	2377,2
Asp6-Tyr28	3451,6			Asp6-Tyr28	3451,7
Thr1-Tyr28	4156,2			Thr1Tyr28	4156,3

Tableau 4 : Masse (Da) et séquences des peptides de la MsrB identifiés par spectrométrie de masse MALDI après digestion par la protéase AspN du complexe MsrBCys63-TrxCys32, MsrBCys117-TrxCys32 et MsrB sauvage alkylée-Trx Cys35Ser. Les séquences colorées en rouge sont celles qui contiennent les résidus Cys mutés en Ser, celles en bleu sont celles qui contiennent le résidu Cys alkylé par l'IAM. La masse de +73Da correspond à l'augmentation due à l'alkylation par l'IAM (+57) sur la MsrB sauvage ajoutée de la différence de masse due à la mutation d'une des deux Cys en Ser (+16).

Pour les trois complexes analysés, le taux de recouvrement est de l'ordre de 80%.

Pour le complexe avec la MsrB sauvage, les peptides identifiés sont identiques à ceux obtenus avec le complexe témoin MsrBCys117-TrxCys32. Notamment deux peptides, qui contiennent le résidu 63 sont présents en proportion équivalente mais avec la Cys63 modifiée par l'IAM. Ce résultat suggère que la Cys du pont disulfure de la MsrB attaquée par la Cys32 de la Trx est la Cys117 catalytique.

I. 3. 3. Analyse des complexes MsrB-Trx Cys35Ser par spectrométrie de masse électrospray

L'utilisation de la technique de spectrométrie de masse par électrospray détermine avec une grande précision des masses plus importantes en comparaison de la technique MALDI qui a permis d'identifier uniquement la masse des peptides issus de la MsrB. Le dessalage a été effectué sur colonne hydrophobe C₄, qui retient uniquement la Trx non digérée avec le peptide issu de la MsrB en complexe covalent pont disulfure. L'analyse a été réalisée après digestion des complexes par AspN. Les résultats, présentés dans le tableau 5 ci-dessous, montrent que la Trx (qui n'est pas digérée par AspN) forme un pont disulfure avec le peptide contenant la Cys117 catalytique, confirmant ainsi les résultats précédents.

Complexe	Peptide de la MsrB	Masse théorique (Da)	Masse mesurée (Da)
MsrBCys63-TrxCys32	Asp60-Ileu72	13079	13079,9 ± 0,3
MsrBCys117-TrxCys32	Asp107-Met132	14112	14112,4 ± 0,2
MsrB sauvage-Trx Cys32	Asp107-Met132	14112	1411,6 ± 0,2

Tableau 5 : Analyse en spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes après digestion par AspN des différents complexes covalents MsrB-TrxCys35Ser.

II. Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus montrent clairement que la Cys32 de la Trx attaque la Cys117 catalytique de la MsrB oxydée. En effet, d'une part la Cys modifiée par l'iodoacétamide est la Cys63 (peptide avec une masse supplémentaire de 57 Da), et d'autre part la Cys impliquée dans le pont disulfure avec la Trx a été identifiée comme étant la Cys117. De plus, aucun mélange n'a été observé. Ce résultat montre que la formation du complexe MsrB/Trx où doit intervenir une reconnaissance structurale locale fait que la position de la Cys32 est adaptée pour attaquer la Cys117 du pont disulfure dans la MsrB de *N. meningitidis*.

PARTIE V :

Rôle du site à métal dans la MsrB

Comme nous l'avons vu dans le chapitre Introduction, la classe des MsrB peut être divisée en trois sous-classes, en fonction de la présence, de l'absence et de la position de la Cys de recyclage. De plus, indépendamment de cette classification, 50% des MsrB présentent la particularité de posséder quatre Cys supplémentaires au niveau de deux motifs CXXC. C'est le cas de la MsrB d'*E. coli* (Figure 26, p. 69) qui avait été surexprimée et purifiée au laboratoire par Benoit Thouvenot. La couleur rose de cette protéine laissait penser que du métal de type fer était coordonné. En parallèle, l'équipe de Gladyshev et *col.* avait montré que ces quatre Cys sont impliquées dans la fixation de zinc dans la MsrB de *Drosophila melanogaster*, et que la présence du métal était essentielle pour révéler l'activité Msr (Kumar *et al.*, 2002).

Comme dit dans l'Introduction, ces deux signatures CXXC sont localisées dans un motif structural formé de deux boucles qui est retrouvé dans les protéines TCTP et Mss4. Ces quatre Cys sont présentes dans des MsrB comme celle d'*E. coli* alors qu'elles sont remplacées par Asp, Ser, Ser et Ala dans les MsrB de *N. gonorrhoeae* et de *N. meningitidis* (Figure 26, p. 69). L'inspection des structures tridimensionnelles des MsrB montre que le motif structural est situé à l'opposé du site actif.

Le rôle du métal qui n'est présent que dans 50% des MsrB reste à définir. Une hypothèse raisonnable est qu'il joue un rôle structural. Si tel est le cas, il doit exister dans les MsrB n'ayant pas les quatre Cys impliquées dans la fixation du métal, d'autres facteurs moléculaires jouant un rôle équivalent. Pour essayer de répondre à ces questions, nous avons choisi deux modèles d'étude. Le premier modèle a été la MsrB d'*E. coli* qui possède les quatre Cys et fixe le zinc. Les conséquences structurales et enzymatiques de la substitution des quatre Cys par Asp, Ser, Ser et Ala ont été étudiées. Le deuxième modèle d'étude a été la MsrB de *N. meningitidis* qui ne possède pas les quatre Cys impliquées dans la fixation du métal et dont les structures primaire et tridimensionnelle sont quasiment identiques à celles de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Nous avons, en particulier, étudié l'impact de l'introduction de quatre Cys. Toute une étude a également été débutée afin d'identifier les facteurs structuraux impliqués dans la stabilisation des MsrB sans métal.

I. Identification du site et de la nature du métal dans la MsrB d'*E. coli*

Afin d'identifier la nature du métal coordonné sur la MsrB d'*E. coli*, nous avons utilisé deux techniques, d'une part la spectrométrie de masse électrospray en conditions natives (collaboration LSMBO UMR 7509 CNRS-ULP) en vue de déterminer une différence de masse éventuelle entre la forme dénaturée apo et la forme native holo, et d'autre part la spectrométrie d'émission atomique

Résultats Partie V

(collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie des Métaux dirigé par le Pr Burnel à Nancy) en vue de déterminer la concentration de métal éventuellement présent dans la protéine et donc sa stoechiométrie rapportée à la quantité de protéine. Les résultats, présentés dans le tableau 6 ci-dessous, indiquent la présence dans l'enzyme de deux populations avec chacune soit un atome de fer soit un atome de zinc coordonné et ce quelque soit la technique utilisée. La proportion de chaque métal n'est pas équivalente, le zinc représentant environ 80% de la population d'enzyme produit en milieu LB non complétement en fer.

FeSO ₄ (mM)	Spectrométrie de masse électrospray			Spectrométrie atomique d'absorption	
	Conditions dénaturantes (Da)	Conditions non dénaturantes (Da)	Différence (Da)	mole zinc/mole enzyme	mole fer/mole enzyme
0	15319 ± 1	15381 ± 1 (100%)	62	0,80	0,08
0.1	15319 ± 1	15371 ± 0.2 (32%) 15381 ± 0.2 (68%)	52 62	0,64	0,22
1	15319 ± 1	15371 ± 0.2 (40%) 15381 ± 0.2 (60%)	52 62	0,55	0,38

Tableau 6 : Détermination de la teneur en métal de la MsrB d'*E. coli* sauvage en fonction de la concentration en FeSO₄ présent dans le milieu de culture. Les deux techniques utilisées sont la spectrométrie de masse électrospray en conditions natives et dénaturantes et la spectrométrie de flamme.

Deux populations sont caractérisables en spectrométrie de masse avec une différence de masse de +62 Da et de +52 Da par rapport à la masse théorique de la MsrB. Ceci est en accord avec la présence d'un atome de zinc et de fer coordonné par quatre Cys (Tableau 6). La présence d'une population ayant fixé du fer est en accord avec la couleur rosée caractéristique de la MsrB observée après purification en absence de DTT. Ce résultat est confirmé par les résultats de spectrométrie de flamme. De plus, on constate que la proportion de la population de MsrB coordonnant du fer augmente avec la concentration en Fe²⁺ présent dans le milieu de culture (Tableau 6 ci-dessus). Ceci suggère que le fer est incorporé dans la MsrB quand le zinc est épuisé dans le milieu. La forte surexpression de la protéine dans *E. coli* dans les conditions utilisées (100 mg/L) mobilise vraisemblablement tout le zinc disponible et à défaut de zinc, la MsrB incorpore le fer présent.

La substitution des quatre résidus Cys des deux motifs CXXC de la MsrB d'*E. coli*, par la séquence consensus retrouvée dans les MsrB sans métal, conduit à la production d'une MsrB dépourvue de métal, alors que l'introduction des quatre Cys dans la MsrB de *N. meningitidis* permet la coordination d'un métal. En effet, quand le quadruple mutant protéique Asp45Cys/Ser48Cys/Ser94Cys/Ala97Cys de *N. meningitidis* a été purifié, la solution était de

couleur rose comme pour la MsrB d'*E. coli* purifiée. L'analyse du contenu en métal de ce quadruple mutant protéique a révélé la présence de fer et de zinc avec une stoechiométrie globale de 0,8 mole de métal/mole d'enzyme avec 80% de la population coordinant du zinc (Tableau 7, ci-dessous). Ces résultats montrent que le métal est coordonné dans les métalloMsrB par les quatre Cys des deux motifs CXXC, et que le site est préformé dans les MsrB sans métal.

MsrB de <i>N. meningitidis</i>	mole zinc/mole enzyme	mole fer/mole enzyme	k_{cat} avec Trx (s^{-1})	k_{obs} avec DTT (s^{-1})
Sauvage	0,01	0,01	0,20	0,050
Mutant Asp45Cys/Ser48Cys /Ser94Cys/Ala97Cys	0,60	0,17	NA	0,045
Forme apo du mutant Asp45Cys/Ser48Cys/ Ser94Cys/Ala97Cys	0,02	0,01	0,06	0,015

Tableau 7 : Contenu en métal et propriétés catalytiques de différentes formes de la MsrB de *N. meningitidis*. Pour la détermination du contenu en métal par spectrométrie de flamme, les valeurs représentent la moyenne de deux valeurs mesurées indépendamment (erreur de $\pm 10\%$). Les activités en présence de DTT ont été réalisées avec 150 mM de *D,L*-Met-*R,S*-SO, 10 mM DTT et 50-100 μ M d'enzyme (erreur de $\pm 10\%$). Les activités à l'état stationnaire en présence de Trx ont été mesurées avec 150 mM de *D,L*-Met-*R,S*-SO, 200 μ M de Trx, 1,28 μ M de Trx réductase et 0,5-50 μ M d'enzyme (erreur $\pm 10\%$). NA, non active ($< 3.10^{-3} s^{-1}$).

II. Rôle du site à métal dans la MsrB d'*E. coli*

II. 1. Paramètres catalytiques de la MsrB d'*E. coli*

Les deux Cys impliquées dans le mécanisme catalytique sont titrées en conditions natives par le DTNB (Tableau 9, p. 116). Par contre, les quatre Cys impliquées dans la coordination du métal ne sont titrables qu'en conditions dénaturantes en présence de SDS. Après réaction avec la MetSO, seules les quatre Cys des deux motifs CXXC sont titrées par le DTNB en conditions dénaturantes, les deux autres Cys catalytiques formant un pont disulfure Cys117-Cys63. En présence de Trx ou de DTT, les MsrB d'*E. coli* et de *N. meningitidis* présentent des paramètres cinétiques k_{cat} et K_M similaires à l'état stationnaire (Tableau 7, et Tableau 8, p. 115). Le métal n'apporte donc pas d'avantage catalytique significatif pour les métalloMsrB.

MsrB d' <i>E. coli</i>	mole zinc/mole enzyme	mole fer/mole enzyme	k_{cat} avec Trx (s^{-1})	k_{obs} avec DTT (s^{-1})
Sauvage	0,80	0,08	0,18	0,010
Forme apo	0,02	0,02	$2 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-3}$
Reconstituée avec Zinc	0,88	0,02	0,12	0,012
Reconstituée avec Fer	0,01	0,77	0,11	0,011
Mutant Cys45Asp/Cys48Ser/ Cys94Ser/Cys97Ser	0,02	0,02	NA ¹	NA ²

Tableau 8 : Contenu en métal et propriétés catalytiques de différentes formes de la MsrB d'*E. coli*. Pour la détermination du contenu en métal par spectrométrie de flamme, les valeurs représentent la moyenne de deux valeurs mesurées indépendamment (erreur de $\pm 10\%$). Les activités mesurées en présence de DTT ont été réalisées avec 150 mM de *D,L*-Met-*R,S*-SO, 10 mM DTT et 50-100 μM d'enzyme (erreur de $\pm 10\%$). Les activités à l'état stationnaire en présence de Trx ont été réalisées avec 150 mM de *D,L*-Met-*R,S*-SO, 200 μM de Trx, 1,28 μM de Trx réductase et 0,5-50 μM d'enzyme (erreur de $\pm 10\%$). NA, non active (¹, $< 3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; ², $< 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

II. 2. Conséquences de l'absence du métal sur les propriétés catalytiques de la MsrB d'*E. coli*

Deux approches ont été utilisées. Elles ont consisté à isoler, 1) une forme apo de la MsrB sauvage et; 2) une autre forme apo en substituant les quatre Cys par les acides aminés trouvés dans les MsrB sans métal par mutagenèse dirigée.

L'utilisation de chélatants comme la phénantroline, l'EDTA ou l'acide dipicolinique n'a pas permis de déplacer le zinc sur l'enzyme sauvage. L'examen de la structure de la MsrB de *N. gonorrhoeae* montre que le site à métal est accessible, en surface de la MsrB. L'absence de chélation suggère donc que la MsrB présente une forte affinité pour le métal. Pour obtenir la forme apo, il a donc été nécessaire de passer par une étape de déploiement de l'enzyme par l'acide trichloroacétique (TCA), suivie d'une étape de repliement en utilisant l'urée (voir chapitre Matériels et Méthodes). Les résultats, présentés dans le tableau 8 et le tableau 9, p. 116, montrent que l'ensemble des six Cys est alors titrable par le DTNB en conditions natives dans la MsrB apo. Ceci suggère qu'il n'y a plus de métal fixé. Ceci est confirmé par l'analyse de cette forme en spectrométrie de flamme qui montre une présence non significative de zinc et de fer.

La forme apo conserve une faible activité à l'état stationnaire avec un k_{cat} diminué d'un facteur 50 (Tableau 8, p. 115). Ceci est vraisemblablement dû à une faible quantité de forme holo encore présente, et non détectable. La reconstitution d'une forme holo par ajout au cours de l'étape de repliement soit de zinc soit de fer en quantité stoechiométrique, permet de retrouver des propriétés catalytiques comparables à la forme de départ que ce soit en présence de zinc ou de fer coordonné (Tableaux 8, p. 116 et 9). Ceci montre que, quelque soit le métal fixé, la MsrB présente les mêmes propriétés catalytiques. Aucune activité de la forme quadruplement "mutée" Cys45Asp/Cys48Ser/Cys94Ser/Cys97Ser n'est détectable. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus sur la forme apo.

MsrB d' <i>E. coli</i>	Nombre de Cys/mole enzyme						Stoechiométrie (mole Met/mole enzyme)	
	Total	Conditions non dénaturantes			Conditions dénaturantes			
		- MetSO	+ MetSO	Diffé- rence ^a	- MetSO	+ MetSO		Diffé- rence ^b
Sauvage	6	2,1	0,1	2,0	6,0	3,8	2,2	1,0
Forme apo	6	5,9	2,0	3,9	6,3	4,5	1,8	0,2
Mutant Cys45Asp /Cys48Ser/Cys94 Ser/Cys97Ser	2	2,1	1,7	0,4	1,9	1,7	0,2	0,0
Forme reconstituée avec Zinc	6	2,3	0,4	1,9	5,7	4,0	1,7	0,8
Forme reconstituée avec fer	6	1,8	0,4	1,4	4,3	3,0	1,3	0,6

Tableau 9 : Titration des thiolates libres et stoechiométrie de formation de la Met en absence de réducteur pour différentes formes protéiques de la MsrB d'*E. coli*. Le contenu en Cys a été déterminé spectrophotométriquement en utilisant la sonde DTNB en conditions dénaturantes et non dénaturantes, après incubation ou pas avec la *D,L*-Met-*R,S*-SO 150 mM pendant 10 min en absence de système de régénération. La quantité de Met formée pour déterminer la stoechiométrie de formation de la Met a été déterminée après incubation ou non avec de la *D,L*-Met-*R,S*-SO à 150 mM pendant 10 min en absence de système de régénération. Les valeurs indiquées pour la titration des thiolates libres et la stoechiométrie de formation de la Met représentent la moyenne de deux mesures indépendantes à deux concentrations différentes en enzyme (erreur de $\pm 10\%$). ^a, ^b, représentent la différence du nombre de thiolates titrés après incubation avec la *D,L*-Met-*R,S*-SO en conditions dénaturantes ou non.

II. 3. Conséquences structurales de la suppression du site à métal dans la MsrB d'*E. coli*

L'utilisation de la technique de microcalorimétrie différentielle de balayage (DSC) montre que la MsrB d'*E. coli* sauvage présente une température de demi-dénaturation de 43°C (Figure 36). Par contre, aucun thermogramme n'a été obtenu pour les formes apo. Une des raisons peut être que la forme dépourvue de métal soit dans un état partiellement structuré, faible en énergie et donc difficile à détecter par cette technique. Ceci est conforté par la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire des formes holo et apo qui indique clairement une perturbation globale de la structure des formes apo avec une teneur en zones non structurées plus importante dans la forme apo. En effet, le spectre de la MsrB quadruplement "mutée" présente un minimum vers 198 nm, caractéristique des zones non structurées.

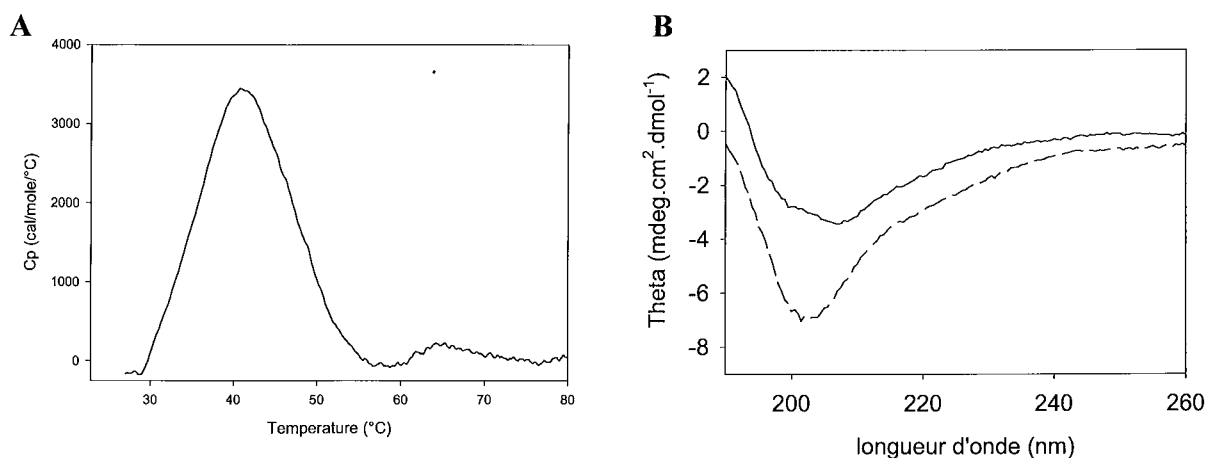


Figure 36 : Thermogramme de DSC de la MsrB d'*E. coli* sauvage (A) et spectres de dichroïsme circulaire de la MsrB d'*E. coli* sauvage (ligne continue) et quadruplement mutée Cys45Asp/Cys48Ser/Cys94Ser/Cys97Ser (ligne pointillée) (B). (A) Le thermogramme ont été réalisés dans le tampon KPi 10 mM, pH 7,1 à une température variant de 25 à 100°C pour une concentration en enzyme de 10 µM. La vitesse de scan est de 1 °C/min. Le Tm mesuré est de 42,5°C pour la MsrB sauvage. (B) Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés dans le tampon KPi 10 mM, pH 7,1 à 25°C entre 260 nm et 190 nm par incréments de 1 nm. La concentration en enzyme est de 10 µM.

L'utilisation de la fluorescence a permis d'étudier le changement d'environnement du Trp65, situé dans le site actif, en fonction de la présence ou non de métal. Ainsi, pour l'enzyme sauvage, la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence du Trp65 est de 343 nm, et elle passe à 353 nm lorsque le Trp65 est exposé au solvant (en présence de 4 M d'urée, la concentration de demi-dénaturation étant de 2 M d'urée). Par contre, les formes dépourvues de métal, aussi bien le quadruple mutant que la forme sauvage apo, ont leur Trp65 plus exposé au solvant même en conditions natives. En effet, la longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale est de 353 nm dans le quadruple mutant dépourvu de métal (spectres non montrés). Ce déplacement de la longueur

d'onde maximale d'émission de fluorescence dénote une perturbation au niveau du site actif, le Trp65 étant plus exposé au solvant. La présence du métal est donc essentielle au maintien de la structure « active » de l'enzyme, notamment au niveau de la conformation du site actif.

III. Conséquences de l'introduction des deux signatures CXXC dans la MsrB de *N. meningitidis*

La titration des thiolates libres par la sonde DTNB montre que deux Cys sont titrées en conditions natives (les deux Cys impliquées dans le mécanisme catalytique) et six en conditions dénaturantes (les autres étant impliquées dans la coordination du métal) (Tableau 10, p. 119). En absence de réducteur, après incubation de 10 min avec 150 mM de *D,L*-Met-*R,S*-SO, une stoechiométrie d'une mole de Met/mole d'enzyme est mesurée avec perte de deux Cys. Les deux Cys titrées en conditions natives par le DTNB sont donc les deux Cys63 et 117 impliquées dans le mécanisme catalytique. Quatre Cys sont titrées après incubation avec la *D,L*-Met-*R,S*-SO en conditions dénaturantes (Tableau 10, p. 119). Aucune activité Trx-dépendante n'est observée en utilisant le système couplé alors que l'activité avec le DTT est équivalente à celle de la MsrB de *N. meningitidis* sauvage (Tableau 7, p.114). La première étape de réduction du substrat sulfoxyde reste donc efficace même en présence du métal. Le fait d'éliminer le métal coordonné dans le quadruple mutant, restaure l'activité Trx-dépendante. La cause de la perte d'activité de recyclage par la Trx est donc bien liée à la coordination du métal et non aux mutations introduites.

Enfin, le spectre de dichroïsme circulaire du quadruple mutant est comparable à celui de la MsrB sauvage (Figure 37B, p. 119). D'autre part les résultats de fluorescence montrent que le Trp65 du mutant n'est pas exposé au solvant ($\lambda_{\max} = 343$ nm, spectre non montré). La structure globale de la protéine et la conformation du site actif ne semblent donc pas ou peu perturbées par l'introduction des quatre Cys et la fixation du métal. Par contre, les expériences de DSC montrent l'existence d'un T_m fortement augmenté, de + 45°C, pour le mutant par rapport à celui de la MsrB sauvage (Figure 37A, p. 119). La présence du métal entraîne donc une augmentation de la stabilité thermodynamique de la structure globale. L'introduction du métal induirait donc des modifications mineures de la structure tridimensionnelle mais, par contre, contribuerait à une rigidification de celle-ci défavorable à l'activité de recyclage Trx-dépendante. Il semble qu'il existe des éléments structuraux dans l'enzyme de *N. meningitidis* qui stabilisent la structure et qui sont absents de l'enzyme d'*E. coli* (à part la présence du métal).

MsrB de <i>N. meningitidis</i>	No. de Cys/mole enzyme						Stoechiométrie (mole Met/mole enzyme)	
	Total	Conditions non dénaturantes			Conditions dénaturantes			
		- MetSO	+ MetSO	Diffé- rence ^a	- MetSO	+ MetSO		Diffé- rence ^b
Forme sauvage	2	1,9	0,1	1,8	1,8	0,0	1,8	1,0
Mutant Asp45Cys/ Ser48Cys/Ser94 Cys/Ala97Cys	6	2,0	0,2	1,8	6,0	4,1	1,9	1,0
Forme apo du mutant Asp45Cys/ Ser48Cys/Ser94 Cys/Ala97Cys	6	5,6	3,9	1,7	5,8	3,9	1,9	1,0

Tableau 10 : Titration des thiolates libres et stoechiométrie de formation de la Met en absence de réducteur pour différentes formes protéiques de la MsrB de *N. meningitidis*. Le contenu en Cys a été déterminé spectrophotométriquement en utilisant la sonde DTNB en conditions dénaturantes et non dénaturantes, après incubation ou pas avec la *D,L*-Met-*R,S*-SO 150 mM pendant 10 min en absence de système de régénération. La quantité de Met formée pour déterminer la stoechiométrie de formation de la Met a été déterminée après incubation ou non avec de la *D,L*-Met-*R,S*-SO à 150 mM pendant 10 min en absence de système de régénération. Les valeurs indiquées pour la titration des thiolates libres et la stoechiométrie de formation de la Met représentent la moyenne de deux mesures indépendantes à deux concentrations différentes en enzyme (erreur de $\pm 10\%$). ^a, ^b, représentent la différence du nombre de thiolates titrés après incubation avec la *D,L*-Met-*R,S*-SO en conditions dénaturantes ou non.

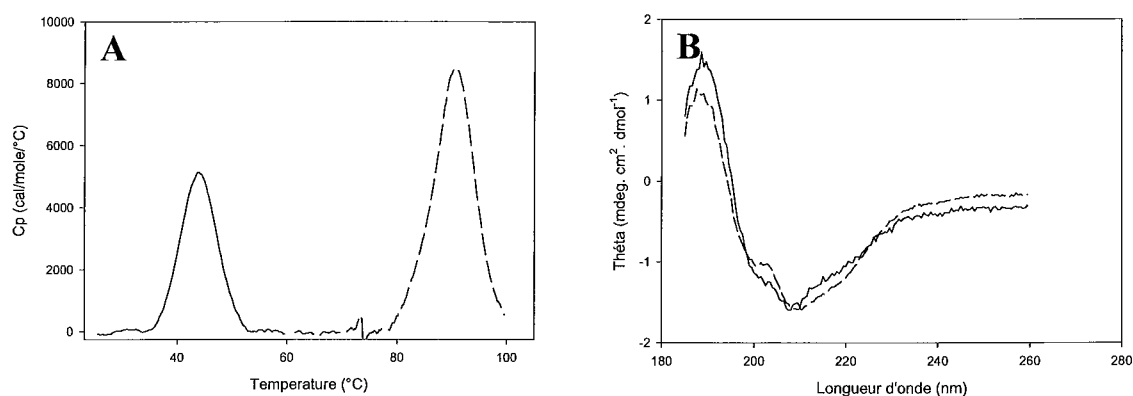


Figure 37 : Thermogrammes de DSC (A) et spectres de dichroïsme circulaire (B) de la MsrB sauvage (ligne continu) et quadruplement mutée Asp45Cys/Ser48Cys/Ser94Cys/Ala97Cys (ligne pointillée) de *N. meningitidis*. (A) Les thermogrammes ont été réalisés dans le tampon KPi 10 mM, pH 7,1 à une température variant de 25 à 100°C pour une concentration en enzyme de 10 μ M. La vitesse de défilement est de 1 °C/min. Les Tm sont respectivement de 43,8°C et 90,8°C pour la MsrB sauvage et pour le quadruple mutant. (B) Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés dans le tampon KPi 10 mM, pH 7,1 à 25°C entre 260 nm et 190 nm par incréments de 1 nm. La concentration en enzyme est de 10 μ M.

Discussion-Perspectives

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

III. Conclusion

Le métal présent dans les MsrB ne donne aucun avantage en terme d'activité. Par contre, la présence du métal est essentielle au maintien d'une structure active pour les MsrB à métal. En effet, pour la MsrB d'*E. coli*, la suppression du site à métal induit des changements conformationnels importants conduisant à la perte de l'activité réductase.

Par contre, l'introduction des deux signatures CXXC dans la MsrB de *N. meningitidis* rend l'étape de recyclage de la MsrB par la Trx inefficace, la première étape réductase restant efficace. Ceci tend à montrer que la fixation du métal suite à l'introduction des deux signatures induirait une rigidification de la structure de la MsrB qui serait transmise du site à métal au site actif, ne permettant plus à la Trx de former un complexe productif. De plus, le fait que le site à métal est préformé dans les MsrB sans métal suggère que d'un point de vue évolution, les MsrB avec et sans métal doivent avoir un ancêtre commun qui contenait un métal.

L'examen de la structure tridimensionnelle des MsrB de *Neisseria* montre que cette structure peut être assimilée à deux sous-domaines, l'un contenant un feuillet constitué de trois brins- β (β_1 , β_2 et β_9) et l'autre d'un feuillet regroupant cinq brins- β (β_4 , β_5 , β_6 , β_7 et β_8). En admettant que les structures tridimensionnelles des MsrB d'*E. coli* et de *N. meningitidis* soient très semblables (60 % d'identité en structure primaire), on peut suggérer que ces deux domaines soient connectés par le motif de fixation du métal dans la MsrB d'*E. coli* alors que dans la MsrB de *N. meningitidis*, d'autres facteurs structuraux permettraient de compenser cette absence (Figure 38, p. 121). La comparaison des alignements de l'ensemble des structures primaires des MsrB avec ou sans les deux signatures CXXC, ainsi que l'analyse de la structure tridimensionnelle de la MsrB apportent des éléments d'explications. A l'interface des deux sous-domaines, il existe en effet une liaison ionique Asp/Arg ou Asp/Lys présente dans les MsrB sans métal (85 % des cas). Cette liaison hydrogène est absente dans les MsrB à métal. Une hypothèse est que la présence de cette liaison ionique permettrait de stabiliser les MsrB sans métal (Figure 38, p. 121).

Dans le but de valider ces hypothèses, nous avons choisi d'introduire ces deux résidus participant à la formation de la liaison ionique dans la MsrB d'*E. coli* Cys45Asp/Cys48Ser/Cys94Ser/Cys97Ser. Parallèlement, ces deux résidus ont été substitués dans la MsrB de *N. meningitidis* en vue de supprimer leur interaction stabilisatrice. Ce travail est en cours.

Site putatif de fixation du
métal dans la MsrB d'*E. coli*

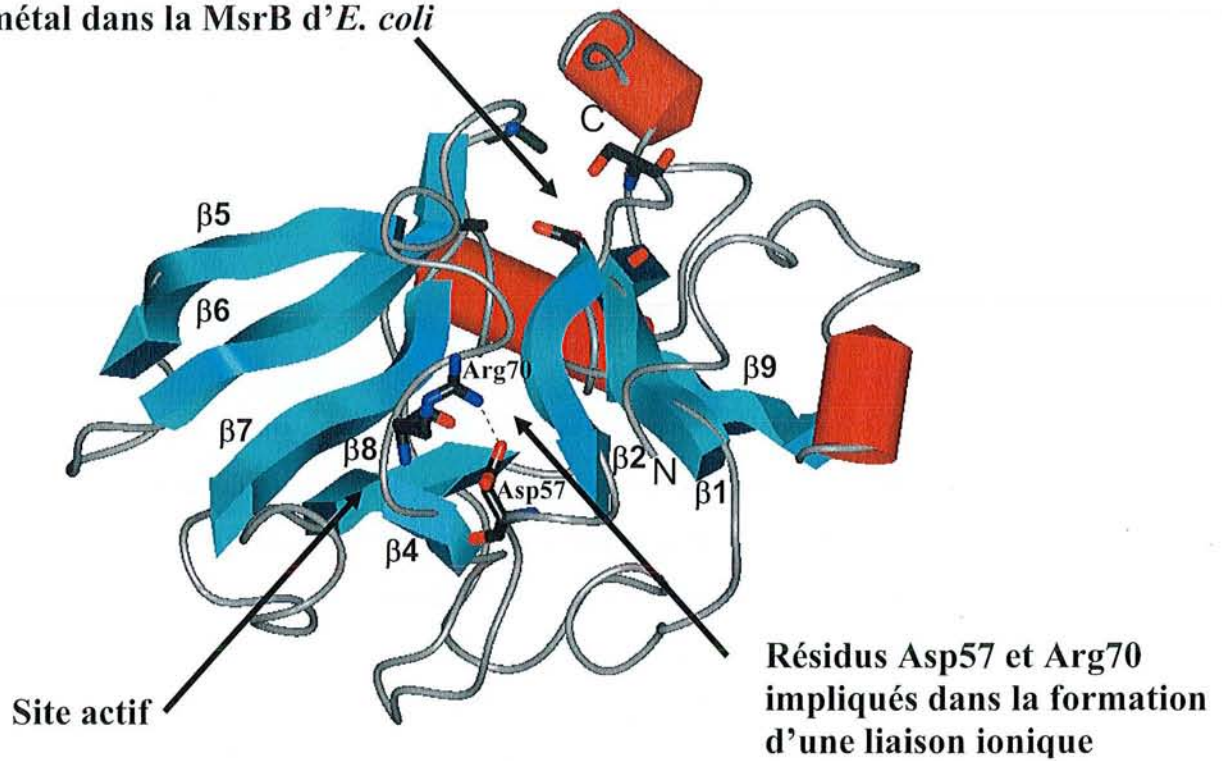


Figure 38 : Représentation schématique en mode ruban de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (d'après Lowther *et al.*, 2002). Les hélices- α sont représentées en rouge et les brins- β sont représentés en bleu. Les chaînes latérales des résidus Asp57 et Arg70 impliqués dans la formation d'une liaison ionique sont représentés en mode bâtons. Les résidus Asp45, Ser48, Ser94 et Ala97 (remplacés par des Cys dans la MsrB d'*E. coli* et impliqués dans la fixation d'un métal) sont également représentés.

L'étude des MsrA et MsrB de *N. meningitidis*, que nous avons entreprise au laboratoire, a permis de montrer la généralité du mécanisme de réduction d'une fonction sulfoxyde par un thiol, qui passe par la chimie de l'acide sulfénique. Le schéma catalytique est le même pour les deux classes. Il comprend trois étapes avec, 1) la formation d'un intermédiaire acide sulfénique avec relargage d'une mole de Met par mole de Msr, 2) la formation d'un intermédiaire pont disulfure intramoléculaire dont la vitesse est limitée par la vitesse de formation de l'intermédiaire acide sulfénique et; 3) la réduction du pont disulfure par la Trx, qui a été montrée être globalement cinétiquement limitante. Ce mécanisme a été confirmé par le fait que les MsrA et les MsrB présentent toutes deux un mécanisme cinétique de type ping-pong. De plus, dans le processus de recyclage par la Trx, il a été montré que c'est la dissociation du complexe Msr réduite/Trx oxydée qui est cinétiquement limitante.

Néanmoins de nombreuses questions restent posées dont certaines n'ont pas encore reçues de réponse ou alors que des réponses partielles. C'est le cas du mécanisme menant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, en particulier de la nature de l'état de transition, de la nature des résidus qui interviennent dans la catalyse des deux premières étapes et la reconnaissance structurale du substrat sulfoxyde et du partenaire Trx.

Comme déjà indiqué, la vitesse de l'étape réductase est rapide, et ce quel que soit la classe de Msr considérée. Ceci implique la déprotonation de la Cys catalytique et la protonation de l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat afin de faciliter l'attaque nucléophile du thiolate et le réarrangement sigmatropique 1,3 postulé. Ceci doit se faire *via* un acide aminé accepteur et donneur d'un proton, éventuellement par un relais d'une molécule d'eau. Bien qu'en partie préliminaires, nos résultats cinétiques montrent 1) que la Cys117 catalytique est activée lors de la formation du complexe Michaélien avec une diminution de son pK_{app} de 4 unités et; 2) l'implication d'un résidu jouant le rôle de catalyseur acide avec un pK_{app} de 8. L'examen de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *N. gonorrhoeae* montre une distance de 2,47 Å entre l'azote δ_1 de l'His103 et un des oxygènes du cacodylate (Figure 39, p. 123), qui est un mime de substrat, ce qui fait de l'His103 un bon candidat pour protoner la fonction sulfoxyde et participer au réarrangement sigmatropique 1,3. (Figure 39, p. 123). Le fait que la vitesse de l'étape réductase pour le mutant protéique His103Ala/Asn soit diminuée d'un facteur 10^3 conforte cette hypothèse (Neiers *et al.*, résultats non publiés). Nos études cinétiques ne permettent cependant pas de conclure si l'His103 participe à l'activation de la Cys117 et si oui directement ou indirectement. En absence de substrat, le pK_a de la Cys117 étant supérieur à 9,5, on peut exclure une interaction entre la Cys117 et l'His103. Qu'en est-il dans le complexe Michaélien ? L'inspection de la

structure tridimensionnelle de l'enzyme de *N. gonorrhoeae* en complexe avec le cacodylate montre une distance entre la Cys117 et l'azote δ_1 de l'His103 (6,9 Å) qui est incompatible avec une interaction directe entre les deux acides aminés.

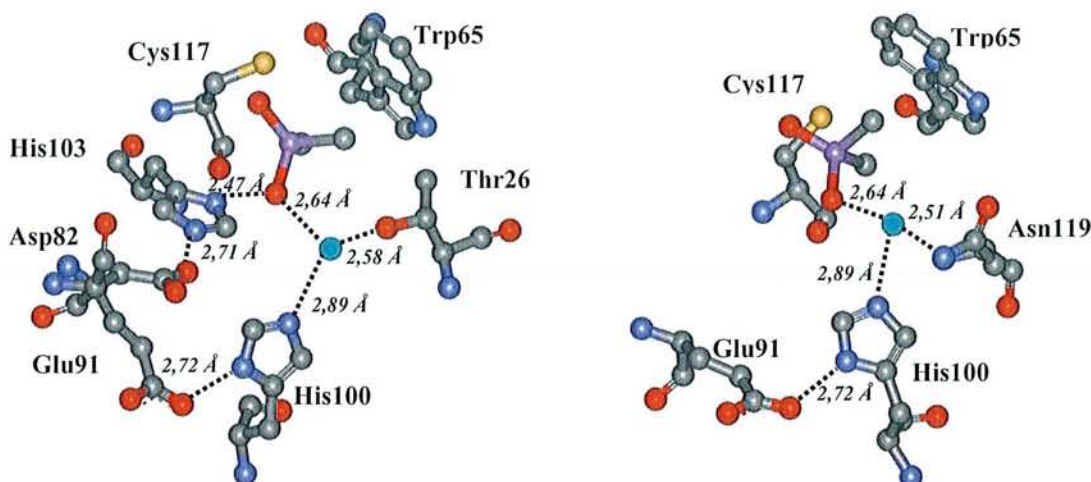


Figure 39 : Deux représentations du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (Lowther et al., 2002) Les différents résidus conservés, la molécule de cacodylate et une molécule d'eau (en bleu) présentes dans le site actif sont représentées en mode boules et bâtons. Les liaisons hydrogènes putatives (distances en Å) sont représentées par des lignes discontinues noires. Deux représentations du site actif ont été faites en vue d'inclure l'ensemble des résidus du site actif. Ces représentations ont été réalisées à l'aide du logiciel Web Lab Viewer.

Par contre, la distance entre l'azote ϵ_2 de l'His103 et l'Asp82 (2,71 Å) est compatible avec un rôle de l'Asp82 en vue de favoriser un positionnement adéquat du noyau imidazole de l'His103 et/ou d'augmenter le pK_{app} de l'His103, en accord avec la valeur du pK_{app} de 8 tirée de la courbe k_{obs} de l'étape réductase en fonction du pH. En vue d'avoir des informations complémentaires, la détermination du pK_a de l'His103 a été entreprise par RMN en collaboration avec l'équipe du Dr M. T. Cung. Ces études sont actuellement menées par Aurélien Thureau, qui a assigné sur un spectre RMN-1D le déplacement chimique du proton porté par le carbone δ_2 du noyau imidazole de l'His103 de la MsrB de *N. meningitidis* sous forme réduite. Le proton porté par le carbone δ_2 subit l'influence de la protonation de l'azote ayant un proton échangeable (Figure 40, p. 124).

Ainsi le suivi de ce déplacement chimique, en absence et en présence de substrat dans le mutant inactif Cys117Ser de la MsrB de *N. meningitidis*, en fonction du pH, a permis de déterminer un pK_{app} de l'His103 dans l'enzyme libre de $7,2 \pm 0,1$ et dans le complexe Michaelien de $7,8 \pm 0,2$. Ceci conforte l'hypothèse de l'attribution à l'His103 du pK_{app} de 8, pK_{app} déterminé en suivant la variation du k_{obs} de l'étape réductase en fonction du pH, à concentration saturante en substrat (voir partie résultats, p. 104).

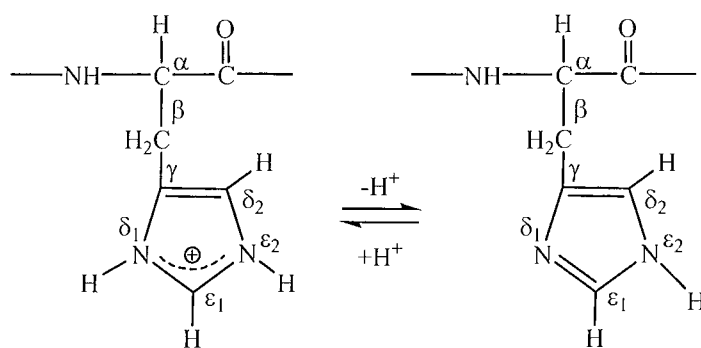


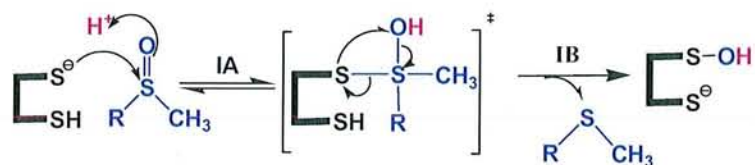
Figure 40 : Représentation en mode Lewis de l'acide aminé His sous forme protonée et sous forme non protonée. Le déplacement chimique des protons des carbones δ_2 et ε_1 varie selon l'état de protonation de l'azote δ_1 .

Il est intéressant de noter qu'au niveau des MsrA, la nature des résidus qui interviennent dans la catalyse de la première étape, excepté bien sûr la Cys catalytique, est différente. En effet, les résultats obtenus par Mathias Antoine et Adeline Gand dans notre équipe, montrent que dans les MsrA, le rôle de relais en tant que catalyseur acide serait assuré par le résidu Glu94 et que l'abaissement du pKa de la Cys catalytique fait intervenir, de façon directe ou indirecte, non seulement ce résidu Glu mais également les résidus Tyr82 et Tyr134. Ceci montre que différentes solutions ont été retenues au cours de l'évolution pour catalyser de façon efficace la réduction d'une fonction sulfoxyde, par une Cys d'un site actif.

L'étape conduisant à l'intermédiaire acide sulfénique peut être considérée comme irréversible. L'existence de cet intermédiaire n'avait jamais été démontrée dans la chimie de réduction d'un sulfoxyde par un thiol. Le mécanisme A (Figure 41, p. 125), proposé par notre équipe, implique que l'atome d'oxygène de l'acide sulfénique provient de l'atome d'oxygène du sulfoxyde. Cependant, un autre mécanisme B (Figure 41, p. 125), impliquant l'attaque d'une molécule d'eau activée sur l'intermédiaire sulfurane, ne pouvait pas être écarté.

L'utilisation de MetSO marquée à l'isotope 18 de l'oxygène (travaux M. Antoine, collaborations J. Bodigel, UMR 7068 CNRS-INPL, G. Chevreux UMR 7509 CNRS-ULP) devait permettre de conforter l'un ou l'autre des mécanismes proposés. En effet, si on réduit de la MetS¹⁸O avec un mutant Msr qui accumule l'intermédiaire acide sulfénique, l'oxygène présent sur cet intermédiaire devrait être de l'¹⁸O si le mécanisme passe par un réarrangement sigmatropique 1,3 ou de l'¹⁶O si une molécule d'eau intervient (Figure 41, p. 125), la présence d'¹⁸O ou d'¹⁶O sur l'intermédiaire étant identifiable par spectrométrie de masse. Ceci n'est vrai que si le OH de l'acide sulfénique n'est pas échangeable avec l'eau du milieu. Or, des

Mécanisme A



Mécanisme B

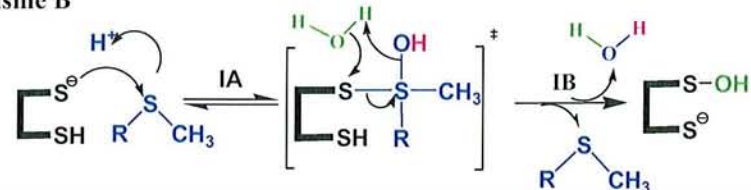


Figure 41 : Représentation des deux mécanismes catalytiques possibles de l'étape I de réduction du substrat sulfoxyde. L'atome de soufre de la MetSO subit une attaque nucléophile *via* la Cys117 catalytique, conduisant à la formation d'un "état de transition" sulfurane (étape IA). Dans le mécanisme A, un réarrangement sigmatropique 1,3 permet la formation de l'intermédiaire acide sulfénique alors que dans le mécanisme B, une molécule d'eau activée attaque l'intermédiaire sulfurane et conduit à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique. Dans ce schéma simplifié, il n'a pas été représenté le complexe michaélien qui précède l'état de transition.

études actuellement menées par Mathias Antoine sur la MsrA de *N. meningitidis* ont montré un échange sans doute lié au fait qu'une catalyse acide doit intervenir favorisant le départ d'une molécule d'eau de l'intermédiaire acide sulfénique. Cette approche ne semble donc pas adaptée. Une autre approche basée sur des méthodes de chimie quantique et de modélisation moléculaire a été entreprise en collaboration avec l'équipe du Dr. M. Ruiz-Lopez (UMR 7565 CNRS-UHP) en vue de prédire la nature des états de transition impliqués dans l'étape réductase. Compte tenu de la taille des systèmes enzymatiques à traiter, une approche hybride QM/MM est appliquée. Son principe consiste à traiter au niveau quantique une partie seulement de la structure, celle impliquée dans la catalyse chimique, et à traiter le reste de la protéine par une méthode de mécanique moléculaire. Cette approche est actuellement appliquée aux MsrA et MsrB. Des résultats préliminaires obtenus sur un modèle chimique, montrent que le réarrangement sigmatropique 1,3 est thermodynamiquement très défavorable ($\Delta G = 23,8$ kcal/mol), sauf si le groupement OH de l'intermédiaire sulfurane est « activé » par des molécules d'eau ou par des résidus du site actif. Dans ce cas, le réarrangement est thermodynamiquement possible (ΔG proche de 0 kcal/mol), la seule barrière énergétique dans la réaction étant alors associée à l'étape de protonation de la fonction sulfoxyde et à celle de déprotonation de la Cys, qui toutes deux, au sein du site actif, doivent être catalysées. Les simulations de chemin réactionnel faites actuellement intégrant ce que l'on connaît des structures des sites actifs et des propriétés des mutants protéiques du site actif actuellement en

cours d'études, pourraient permettre de proposer un schéma de catalyse pour les deux classes de Msr.

En ce qui concerne la spécificité structurale des MsrB, nos résultats montrent que l'affinité apparente dans la première étape pour le substrat sulfoxyde est d'environ 100 mM. La question est de savoir si cette valeur est représentative de la constante d'affinité K_D du substrat pour la MsrB. Pour répondre à cette question, la détermination du K_D a été entreprise par RMN par Aurélien Thureau sur le mutant inactif Cys117Ser. Une valeur de 24 mM pour le substrat Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe a été obtenue, qui est du même ordre de grandeur que la valeur du K_S . Il est à noter que, par cette approche, il devrait être possible d'identifier les acides aminés dont l'environnement est perturbé par la fixation du substrat Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe. Les premiers résultats obtenus par Aurélien Thureau montrent que la fixation du substrat entraîne une modification de l'environnement des résidus proches du site actif, mais également d'une partie contenant les brins $\beta 5$ (76-83) et $\beta 6$ (89-93) (Figure 42). Une hypothèse est que cette partie $\beta 5$ - $\beta 6$ aurait une dynamique permettant un mouvement en fonction de la présence ou non du substrat. Reste à définir le rôle de cette dynamique dans l'acte catalytique.

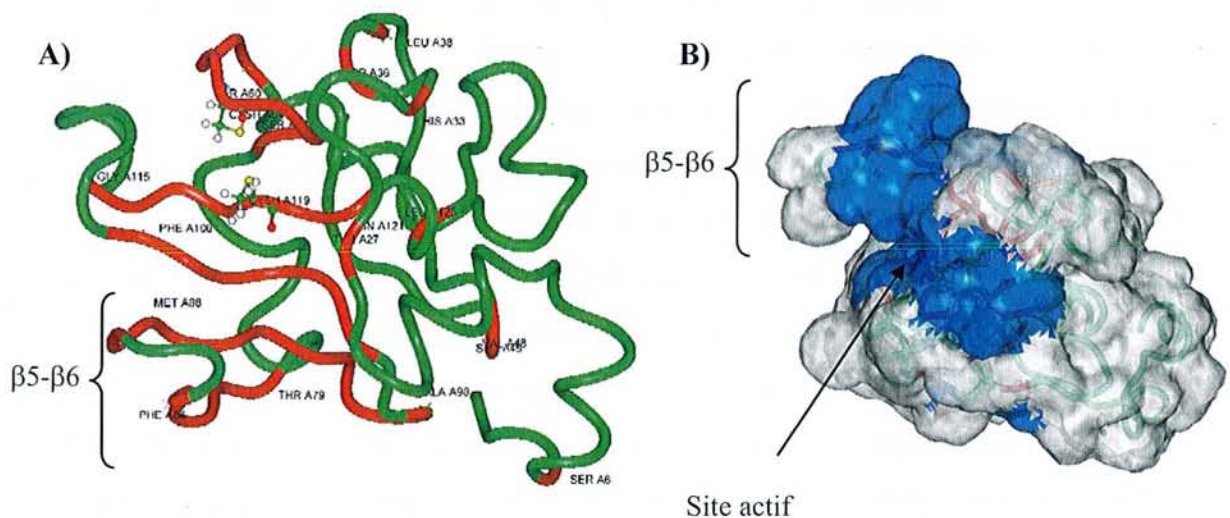


Figure 42 : Représentation du squelette (A) et de la surface (B) de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. (A) En rouge sont représentés les résidus dont l'environnement chimique est modifié lors de la fixation du substrat. La Cys63 est représentée en boules et bâtons. (B) La surface de la MsrB a été représentée. La surface bleutée représente les résidus dont l'environnement chimique est modifié lors de la fixation du substrat. Le squelette de la protéine est représenté en transparence.

D'autre part, les études cinétiques faites avec des substrats modifiés montrent qu'il doit exister un site de spécificité adapté pour la reconnaissance de la MetSO tant au niveau du sulfoxyde que du groupement méthyle. L'examen de la structure du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae*, avec une molécule de cacodylate, suggère, comme cela a été mentionné dans

l'Introduction, que le groupement indole du Trp65 forme une poche hydrophobe permettant une reconnaissance sélective du groupement méthyle de la chaîne latérale de la MetSO. L'étude des mutants protéiques Trp65Phe et Trp65Ala, actuellement en cours, devrait permettre de conforter cette hypothèse. On s'attend notamment à ce que l'affinité apparente dans la première étape pour le substrat Ac-L-Met-R-SO-NHMe soit fortement diminuée, sans que le $k_{\text{obs max}}$ soit altéré. L'examen du site actif de la MsrB montre que l'un des oxygènes du cacodylate pourrait former une liaison hydrogène avec l'His103, comme indiqué p. 123, mais également avec une molécule d'eau, qui établit elle-même un réseau de liaisons hydrogènes impliquant les résidus invariant His100, Thr26 et Asn119 (Figure 39, p. 123). Ce réseau de liaisons hydrogènes pourrait participer à la reconnaissance de la fonction sulfoxyde du substrat et/ou à la catalyse de la première étape, comme c'est le cas pour les résidus Tyr82 et Tyr134 des MsrA.

Les MsrB réduisent plus efficacement les résidus MetSO intégrés dans une protéine. Il doit donc exister des facteurs structuraux et moléculaires permettant de mieux reconnaître un substrat intégré dans une protéine. Leur identification reste à faire. Pour ce faire, la résolution de la structure tridimensionnelle du mutant inactif Cys117Ser de la MsrB de *N. meningitidis* complexée avec le substrat Ac-L-Met-R-SO-NHMe, dans lequel deux liaisons peptidiques sont mimées, a été entreprise. D'autre part, des études de modélisation moléculaire de la MsrB de *N. gonorrhoeae* simulant la fixation du substrat Ac-L-Met-R-SO-NHMe dans le site actif, réalisée par le Dr. Bulent Balta du groupe de Chimie et Biochimie théorique (UMR 7565 CNRS-UHP, Nancy), suggèrent l'existence d'une liaison hydrogène entre l'Arg89 du brin β_6 et l'oxygène de la liaison amide NH-CO-CH₃ du substrat. L'étude du mutant protéique Arg89Ala, actuellement en cours, permettra de conforter ou non cette hypothèse.

Le mécanisme des Msr implique également une deuxième assistance acide pour favoriser, lors de la formation du pont disulfure intramoléculaire, le départ de OH⁻ de l'intermédiaire acide sulfénique, sous forme de H₂O. La nature de ce catalyseur reste à déterminer. Pour répondre à ces questions, il faudrait d'abord pouvoir atteindre la vitesse de cette étape de formation du pont disulfure intramoléculaire, indépendamment de celle de l'étape réductase. Or, les études cinétiques réalisées montrent que la vitesse de l'étape réductase limite celle de l'étape de formation du pont disulfure, et ce quel que soit les Msr étudiées. La conséquence est qu'il est impossible d'atteindre la vitesse intrinsèque de formation du pont disulfure. Néanmoins, le fait que celle-ci soit rapide montre qu'il doit exister un catalyseur acide en vue de favoriser le départ de OH⁻ sous forme H₂O. Une

hypothèse est qu'il soit le même que celui qui intervient dans l'étape réductase. Dans ce cas, la question se pose de savoir comment il est reprotoné entre la première et la deuxième étape.

Une question importante concerne la nature des déterminants moléculaires ou structuraux impliqués dans la reconnaissance entre les Msr et la Trx. Les études cinétiques de l'étape de régénération des Msr par la Trx montrent qu'il existe une reconnaissance spécifique entre les Msr oxydées et la Trx réduite, matérialisée par une valeur de K_M de la Trx déterminée à l'état stationnaire, respectivement de 75 μM et 34 μM pour la MsrA et la MsrB (Olry *et al.*, 2002) et une valeur de K_S déterminée en suivant la vitesse d'apparition de la Trx oxydée, respectivement de 0,5-1 mM et 400 μM pour la MsrA (Antoine *et al.*, 2004) et la MsrB (Olry *et al.*, 2004). Il est raisonnable de postuler que la formation des deux complexes Msr oxydée/Trx réduite et Msr réduite/Trx oxydée se fait avec des K_S équivalents dans les deux directions. Ainsi, le k_1 associé à la formation du complexe MsrB oxydée/Trx réduite devrait être de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (étant donné que $K_S = k_1/k_{-1}$, avec $K_S = 400 \mu\text{M}$ et $k_{-1} = k_{\text{cat}} = 0,5 \text{ s}^{-1}$), valeur qui est très éloignée des valeurs attendues pour une association efficace protéine-protéine qui habituellement sont de l'ordre de $10^{5/8} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ceci suggère que l'étape de recyclage par la Trx est plus complexe que ne le décrit le schéma cinétique que nous avons proposé. Une possibilité est l'existence d'un changement conformationnel des deux complexes Msr/Trx, l'un au cours de la formation du complexe Michaelien Msr oxydée/Trx réduite et l'autre au cours de la formation du complexe Msr réduite/Trx oxydée (voir le schéma, p. 93, partie Résultats). Dans ce dernier cas, l'étape de changement conformationnel serait l'étape cinétiquement limitante, précédant la dissociation de la Trx oxydée de la Msr réduite. L'existence de ces ajustements conformationnels pourrait être un mécanisme général applicable à toutes les cibles de la Trx. Il serait un pré-requis pour que le transfert des deux électrons entre les deux partenaires soit efficace. Reste posée la question de la nature des déterminants responsables de la reconnaissance. Les travaux présentés précédemment montrent que la Cys32 de la Trx forme spécifiquement un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys117 catalytique de la MsrB. Par ailleurs, la même étude réalisée sur la MsrA de *N. meningitidis* par Mathias Antoine a montré que, dans ce cas, la Cys32 de la Trx forme sélectivement un pont disulfure intermoléculaire cette fois-ci avec la Cys198 de recyclage. Ces résultats montrent que la réactivité intrinsèque de la Cys des Msr formant l'intermédiaire pont disulfure intermoléculaire avec la Trx n'est pas le seul facteur déterminant. Il doit exister des déterminants structuraux spécifiques essentiels à la reconnaissance qui vont orienter la formation de l'intermédiaire pont disulfure. Pour les caractériser, la connaissance des structures tridimensionnelles des formes oxydées des Msr est un pré-requis. A ce jour, seules

Discussion-Perspectives

sont connues au niveau des MsrB, deux structures, l'une de *N. gonorrhoeae* en complexe avec le cacodylate, et l'autre de *N. meningitidis*. Dans ce dernier cas, chacun des quatre sites actifs de l'unité asymétrique est occupé par la boucle connectant les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ d'une molécule voisine. Deux cas de figures sont observés : soit le résidu Tyr85 d'un monomère est ancré dans le site actif du monomère voisin, soit c'est le résidu Asn86 (Figure 43).

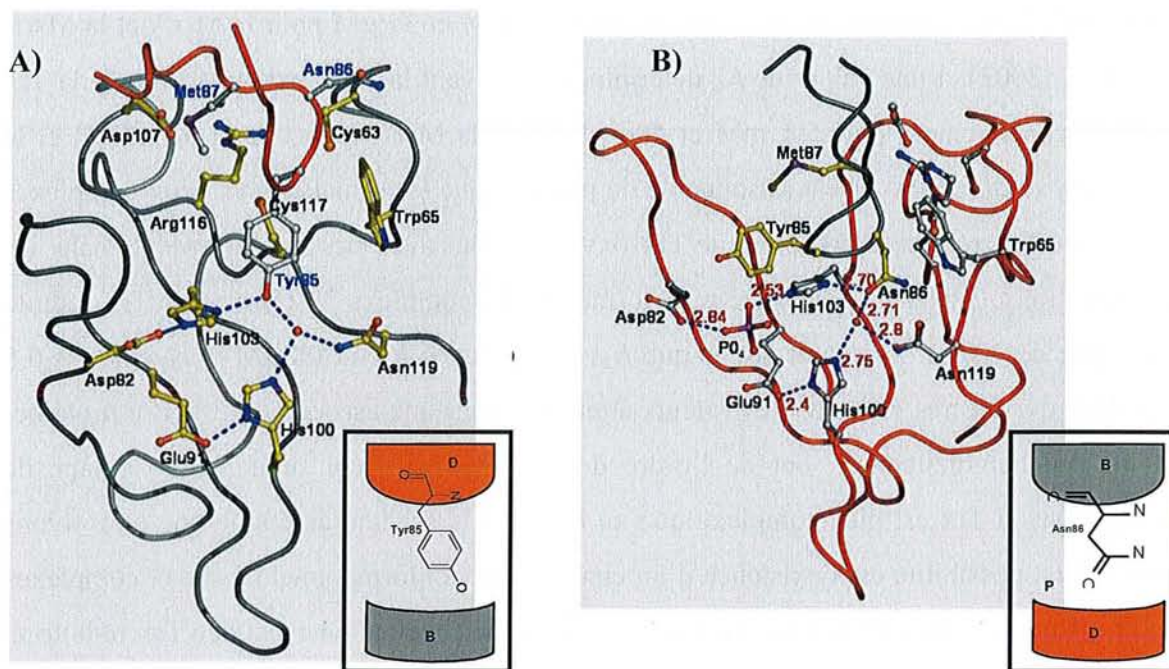


Figure 43: Représentation du site actif du monomère B occupé par le résidu Tyr85 du monomère D (A) et du site actif du monomère D occupé par le résidu Asn86 du monomère B (B) de la MsrB de *N. meningitidis* (Kauffmann *et al.*, non publié). Les mêmes interactions sont observées entre les monomères A et C, sachant que le monomère A est identique au monomère D et le monomère C est identique au monomère B. Les parties encadrées illustrent les codes couleur utilisés pour différencier les chaînes principales en mode ruban des monomères B (en gris) et D (en rouge). Les chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du réseau de liaisons hydrogènes sont représentées en mode sphères et bâtons.

Dans les deux cas, la chaîne latérale du résidu présent dans le site actif, Tyr85 ou Asn86, forme des liaisons hydrogènes avec d'une part l'atome $N\delta_1$ de l'His103, et d'autre part avec une molécule d'eau elle-même stabilisée par deux liaisons hydrogènes avec les résidus Asn119 et His100. L'atome d'oxygène des résidus Tyr85 ou Asn86 de la boucle adopte une position au sein du site actif comparable à celle observée pour l'un des atomes d'oxygène du cacodylate dans le site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae*. Cette structure pourrait en fait ne pas représenter celle de la forme réduite (en absence de substrat) mais celle d'une forme ayant une conformation semblable à celle du complexe Michaélien. Ces deux structures seraient donc un mime du complexe Michaélien. Dans ces deux structures, la

distance entre les deux Cys est compatible avec la formation d'un pont disulfure, suggérant que la structure de la forme oxydée pourrait être identique à celle du complexe Michaélien. Le fait que la forme oxydée de la MsrB ait été montrée être moins compacte que la forme réduite à partir des profils d'éluion sur gel d'exclusion (Figure 44, p. 130) suggère que la fixation du substrat génère des changements conformationnels et donc l'existence de différences structurales significatives entre la forme réduite et les formes soit complexée soit oxydée sous forme pont disulfure.

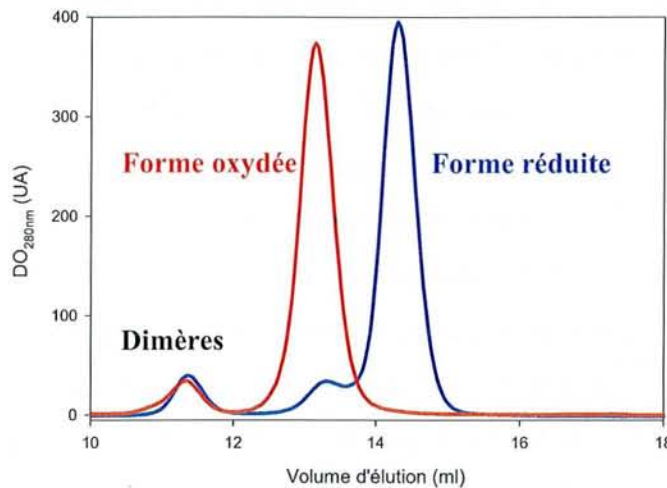


Figure 44: Profil d'éluion sur colonne de gel filtration analytique SUPERDEX 75 de la MsrB de *N. meningitidis* sous forme réduite (courbe bleue) et oxydée sous forme pont disulfure (courbe rouge). Les chromatographies ont été réalisées à température ambiante dans le tampon Tris 50 mM, EDTA 2 mM, KCl 300 mM, pH 8,0. Le débit a été fixé à 0,4 ml/min. Dans tous les cas, un pic mineur correspondant à la formation de dimères, probablement par pont disulfure, est observé. Sur le chromatogramme de la forme réduite, un second pic mineur apparaît. Il doit probablement correspondre à la forme oxydée sous forme pont disulfure, suite à l'oxydation spontanée des Msr en présence d'oxygène.

L'ensemble de ces résultats est donc plutôt en faveur de l'existence d'une flexibilité conformationnelle des MsrB (aspect dynamique). Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait que la MsrB de *X. campestris* qui possède une Cys de recyclage en position 31 en lieu et place de la Cys63 est aussi efficace catalytiquement que celle de *N. meningitidis*, en particulier au niveau de l'étape de recyclage par la Trx (Neiers *et al.*, 2004). Or, l'inspection de la structure de la MsrB de *N. meningitidis* montre une position 31 à 14 Å, très éloignée de celle de la Cys117 à l'inverse de la Cys63. La formation du pont disulfure Cys117/Cys31 doit donc impliquer une réorganisation conformationnelle importante. L'inspection de la structure tridimensionnelle de la MsrB de *X. campestris*, qui vient d'être résolue, le confirme (Rainavoson *et al.*, résultats non publiés).

Pour obtenir des informations sur les facteurs de reconnaissance entre les deux partenaires MsrB/Trx, l'approche RMN semble être une approche de choix, puisqu'elle intègre l'aspect dynamique. Pour ce faire, il est actuellement envisagé de générer des complexes covalents artificiels en utilisant des protéines « mutées » sur les Cys non impliquées dans la formation du pont disulfure intermoléculaire. Les techniques de RMN avec filtres hétéronucléaires $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ seront ensuite utilisées pour caractériser la structure locale du site actif des Msr, à partir de Msr dont les résidus seront marqués sélectivement au ^{13}C et ^{15}N .

Comme mentionné dans la partie Introduction, environ 25% des MsrB putatives ne possèdent que la Cys117 catalytique. Si ces enzymes sont actives *in vivo*, cela implique que l'intermédiaire acide sulfénique est réduit par un mécanisme différent de celui des MsrB possédant une Cys de recyclage. Cela doit être le cas de la MsrB de *Mycoplasma pneumoniae* qui ne possède que la Cys117 catalytique. Elle présente une activité réductase *in vitro* avec accumulation de l'intermédiaire acide sulfénique. Des essais de régénération de l'activité réductase avec la Trx ou la Grx en présence de leur réductase correspondante n'ont pas permis de réduire l'intermédiaire acide sulfénique. Par contre, une activité de régénération est observée avec l'isoforme CxxC2 de la Grx de peuplier (collaboration J. P. Jacquot UMR 1136 INRA-UHP) ou la Grx3 d'*E. coli*, et ce en présence de GSH (Neiers *et al.*, résultats non publiés). Or les Grx sont des protéines monomériques de la famille structurale des Trx. Les études comparatives, actuellement en cours au laboratoire, de la régénération de l'activité réductase des Msr par la Grx et/ou la Trx pourraient permettre d'obtenir des informations supplémentaires sur les facteurs impliqués dans la reconnaissance spécifique entre les protéines de la famille de la Trx et leurs cibles.

Annexes

Publication n° 3

**B. Kauffmann, F. Favier, A. Olry, S. Boschi-Muller, P.
Carpentier, G. Branlant and A. Aubry.**

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide
methionine sulfoxide reductase B domain
of *Neisseria meningitidis* PILB. (2002).
Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **58**, 1467-9.

Acta Crystallographica Section D

Biological
Crystallography

ISSN 0907-4449

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB

Brice Kauffmann,^a Frédérique Favier,^a Alexandre Olry,^b Sandrine Boschi-Muller,^b Philippe Carpentier,^c Guy Branlant^b and André Aubry^{a*}

^aLaboratoire de Cristallographie et de Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques, Groupe Biocristallographie (LCM3B), UMR 7036, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX, France, ^bLaboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire (MAEM), UMR 7567, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX, France, and ^cLaboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines (LCCP), Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel CEA-CNRS, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble CEDEX, France

Correspondence e-mail:
aubry@lcm3b.uhp-nancy.fr

Received 17 April 2002

Accepted 13 June 2002

Peptide methionine sulfoxide reductases (Msr) are ubiquitous enzymes that catalyse the reduction of free and protein-bound methionine sulfoxide back to methionine *via* sulfenic acid chemistry. Two classes of Msrs, MsrA and MsrB, have been described. The fact that the two Msrs display opposite stereoselectivities and have no sequence identity suggests that there is no structural similarity between the two classes. No three-dimensional structure of a MsrB is known. In the present report, the MsrB subdomain of *Neisseria meningitidis* PILB was used to grow orthorhombic crystals by the hanging-drop vapour-diffusion technique. The crystals belong to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 44.0$, $b = 118.6$, $c = 138.5$ Å. Crystals of selenomethionine-substituted MsrB were grown under the same conditions in order to use the MAD method for structure determination. Three diffraction data sets at 1.8 Å resolution were collected. The positions of the Se atoms were determined and should result in a full structure determination.

1. Introduction

Methionine residues are easily oxidized to methionine sulfoxides (MetSO) by activated oxygen and nitrogen species produced either during aerobic respiration, after exposure to various agents or after pathogenic bacteria invasion (Vogt, 1995; Nathan & Shiloh, 2000). Therefore, it is essential for cells to possess enzymes that can restore the biological function of the modified MetSO proteins. This is the role of the methionine sulfoxide reductases (Msr), which reduce peptidic MetSO back to methionine. Two Msr activities (MsrA and MsrB) have been described so far (Grimaud *et al.*, 2001; Moskovitz *et al.*, 2002; Olry *et al.*, 2002; Kryukov *et al.*, 2002). Both enzymes are monomeric and share a similar catalytic mechanism. This includes (i) formation of a sulfenic acid intermediate with a concomitant release of one mole of methionine per mole of Msr and (ii) regeneration of the oxidized Cys *via* formation of one or two intradisulfide bonds followed by reduction by thioredoxin (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Olry *et al.*, 2002). In contrast, they differ in stereoselectivity toward the sulfoxide function (Grimaud *et al.*, 2001; Moskovitz *et al.*, 2002; Olry *et al.*, 2002; Kryukov *et al.*, 2002).

MsrA and MsrB are produced either as distinct proteins as in *Escherichia coli* or as fused domains as in pathogenic bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae* (Wisemann *et al.*, 1996). In *Neisseria* species, MsrA and MsrB

are included in a large polypeptide called PILB that is likely to be a virulence factor involved in *Neisseria* pathogenicity (Taha *et al.*, 1988). PILB is composed of three subdomains: an N-terminal part (residues 1–194), which may encode a disulfide oxidoreductase (Taha *et al.*, 1991), a central domain (residues 195–375) and a C-terminal domain (residues 376–521). Recently, the central subdomain and the C-terminal subdomain of *N. meningitidis* were produced as independent folded entities (Olry *et al.*, 2002). They were shown to display MsrA and MsrB activities, respectively.

The fact that MsrA and MsrB exhibit opposite stereoselectivities towards sulfoxide function and present no sequence homology in particular around the cysteines involved in the catalytic mechanism argues in favour of a three-dimensional structure of MsrBs that is different from that of MsrAs. The X-ray structures of the MsrA from *E. coli* and *Bos taurus* (Tete-Favier *et al.*, 2000; Lowther *et al.*, 2000) have been determined, whereas no three-dimensional structure of an MsrB is known so far. Structural analysis of MsrB will permit definition of the amino acids involved not only in the catalytic mechanism but also in the stereoselectivities towards sulfoxide function. It is in this context that X-ray determination of the *N. meningitidis* MsrB structure was undertaken. Since no significant sequence similarity was found with any protein of known structure, the use of selenomethionine-substituted MsrB ([Se-Met]-MsrB) and multi-wavelength anomalous diffraction phasing

Table 1

MsrB crystallization conditions and X-ray characterization.

Protein concentration (mg ml ⁻¹)	75
Precipitant solution	0.5 M KH ₂ PO ₄
Cryoprotectant solution	20% (v/v) MPD
Unit-cell parameters (Å)	$a = 44.0$, $b = 118.6$, $c = 138.5$
Space group	$P2_12_12_1$
Molecules per asymmetric unit	4
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.76
Solvent content (%)	51
Useful diffraction limit (Å)	1.82

measurements (MAD) was chosen as the strategy to solve the structure. Here, we describe the crystallization, data collection and initial analyses for MsrB and [SeMet]-MsrB.

2. Material and methods

2.1. MsrB and [SeMet]-MsrB production and purification

MsrB was overexpressed and purified as described by Olry *et al.* (2002). The *E. coli* strain B834(DE3) containing plasmid pETMsrB (pETMsrB containing the PILB-MsrB coding sequence (amino acids 376–521) under the control of the T7 promoter) was cultured as described by Ramakrishnan *et al.* (1993) and was used as a source of [SeMet]-MsrB. [SeMet]-MsrB was purified using a procedure similar to that described for MsrB. Substitution of the methionine residues by selenomethionines was checked by electrospray mass analysis: the difference between the MsrB mass (16372.0 ± 0.5 Da) and the [SeMet]-MsrB mass (16467.2 ± 0.7 Da) corresponds precisely to the introduction of two Se atoms, indicating full substitution since MsrB contains two methionine residues at positions 463 and 508.

**Figure 1**

Orthorhombic MsrB crystals, obtained using conditions described in Table 1, with approximate dimensions 330 × 250 × 250 μm.

Table 2

Statistics of X-ray diffraction data collection for the [SeMet]-MsrB crystals.

Values in parentheses refer to data in the highest resolution shell.

Wavelength (Å)	0.9796 (inflection)	0.9791 (peak)	0.9765 (remote)
Resolution (Å)	30–1.82 (1.86–1.82)	30–1.82 (1.86–1.82)	30–1.82 (1.86–1.82)
No. of independent reflections	65709	64482	65003
Completeness (%)	97.1 (92.2)	93.6 (84.1)	97.0 (91.9)
R_{sym} (%)	4.5 (18.5)	5.8 (12.2)	4.5 (17.6)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	12.7 (3.1)	16.1 (2.5)	13.1 (2.9)
Mean figure of merit after SHARP		0.5986	
Mean figure of merit after SOLOMON		0.8543	

2.2. Crystallization

MsrB and [SeMet]-MsrB were crystallized using the same procedure. The purified enzyme was treated with 50 mM DTT, dialysed twice in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 buffer and finally concentrated to 75 mg ml⁻¹. Crystallization was achieved by the hanging-drop vapour-diffusion method in Linbro multiwell tissue-culture plates. The crystals were grown from 8 μl droplets composed of equal volumes of the protein solution and of the precipitant solution (Table 1) and equilibrated against 700 μl reservoirs at 293 K. Crystals quickly appeared and reached their maximal size within 3 d (Fig. 1).

2.3. Crystal X-ray characterization and data collection

X-ray diffraction experiments were performed at 100 K. To provide cryoprotection of the crystals upon flash-freezing, crystals were briefly soaked in cryoprotectant solution (Table 1). Cryocooling was performed by fast immersion of crystals in a nitrogen-gas stream at 100 K. Crystals belong to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 44.9$, $b = 118.9$, $c = 137.7$ Å.

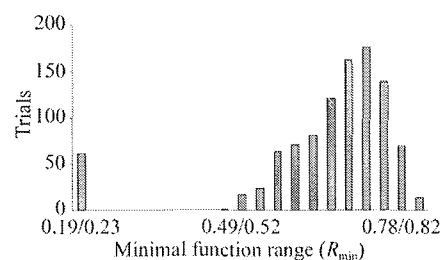
A MAD experiment was performed on beamline BM30A (FIP) at the ESRF. Three different wavelengths were chosen from inspection of the fluorescence spectrum using the program CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001), corresponding to the inflection point, peak and high-energy remote of the selenium *K* edge. All data sets were processed using DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) and scaled using SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). Further details are given in Table 2.

3. Results and discussion

The orthorhombic crystals showed diffraction to 1.8 Å resolution and three data sets were collected at three different wavelengths to this resolution (Table 2). On the basis of the solvent-content evaluation,

these crystals contain four molecules per asymmetric unit. The non-crystallographic symmetry has been analysed from the self-rotation function calculated by the program GLRF (Tong & Rossmann, 1990). It showed several weak peaks with general rotation angle (κ value in the polar angle convention). The native Patterson function calculated using FFT from the CCP4 package does not reveal any translation vector between the four molecules. The monomers are thus randomly positioned in the asymmetric unit, as confirmed subsequently by calculation of the superpositioning operators determined from the models obtained after the automatic building procedure.

Searches for the position of a maximum of 12 Se atoms were performed from the data set collected at the peak of the selenium *K* edge with the program Shake-and-Bake v.2.1 (Weeks & Miller, 1999). In any case, the same eight major sites were obtained with very high confidence after only 30 cycles of searching with SnB (Fig. 2). Their positions and occupancies were refined using SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997). Peak-wavelength structure factors were phased by SHARP to 2 Å resolution and these phases were extended to 1.82 Å with solvent flattening using SOLOMON (Abrahams &

**Figure 2**

Histogram of the number of trials and their corresponding minimal function values R_{min} obtained in Shake-and-Bake (SnB). Using 500 reflections selected in the resolution range 25–1.8 Å and 5000 invariants, a maximum of 12 sites were searched for in 1000 trials of 20 cycles each. Eight sites were found in 61 successful trials. The best value of R_{min} is 0.196. R_{min} is one of the figures of merit calculated by SnB.

Leslie, 1996) (see Table 2). Automatic model building with *ARP/wARP* (Perrakis *et al.*, 1999) allowed the positioning of 465 of 588 residues with their side chains.

Note added in proof: During the reviewing of this paper, the structure of the MsrB from *N. gonorrhoeae* was published by Lowther *et al.* (2002).

We are very grateful to Jean-Luc Ferrer and Richard Kahn at the ESRF (beamline BM30A) who gave us the opportunity to perform our data collections and for their kind technical help. We thank Alain Van Dorsselaer and Sarah Sanglier-Cianferani for determining the molecular weights of MsrB and [SeMet]-MsrB. This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Henri Poincaré-Nancy I, the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie, the PRST Bioingénierie and the Association

pour la Recherche sur le Cancer (ARC Nos. 5436 and 4393).

References

- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996). *Acta Cryst. D* **52**, 30–42.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaer, A. & Branlant, G. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913.
- Evans, G. & Pettifer, R. F. (2001). *J. Appl. Cryst.* **34**, 82–86.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Laffite, D., Briand, C., Derrick, P. J. & Barras, F. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 48915–48920.
- Kryukov, G. V., Kuma, R. A., Koc, A., Sun, Z. & Gladyshev, V. N. (2002). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 4245–4250.
- La Fortelle, E. de & Bricogne, G. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 472–494.
- Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H. & Matthews, B. W. (2000). *Biochemistry*, **39**, 13307–13312.
- Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. & Matthews, B. W. (2002). *Nature Struct. Biol.* **9**, 348–352.
- Moskovitz, J., Singh, V. K., Requena, J., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K. & Stadtman, E. R. (2002). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 62–65.
- Nathan, C. & Shiloh, M. U. (2000). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 8841–8848.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaer, A. & Branlant, G. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Perrakis, A., Morris, R. J. & Lamzin, V. S. (1999). *Nature Struct. Biol.* **6**, 458–463.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. & Sweet, R. M. (1993). *Nature (London)*, **362**, 219–223.
- Taha, M. K., Dupuy, B., Saurin, W., So, M. & Marchal, C. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 137–148.
- Taha, M. K., So, M., Seifert, H. S., Billyard, E. & Marchal, C. (1988). *EMBO J.* **7**, 4367–4378.
- Tete-Favier, F., Cobessi, D., Azza, S., Boschi-Muller, S., Branlant, G. & Aubry, A. (2000). *Structure*, **8**, 1167–1178.
- Tong, L. & Rossmann, M. G. (1990). *Acta Cryst. A* **46**, 783–792.
- Vogt, W. (1995). *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 93–105.
- Wisemann, T. M., Moskovitz, J., Pearce, B. J., Cundell, D., Arvidson, C. G., So, M., Weissbach, H., Brot, N. & Masure, H. R. (1996). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 7985–7990.
- Weeks, C. M. & Miller, R. (1999). *Acta Cryst. D* **55**, 492–500.

Publication n° 4

A. Thureau, A. Olry, N. Coudeville, S. Azza, S. Boschimuller, G. Branlant and M. T. Cung.

(1)H, (13)C and (15)N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. (2004).

J Biomol. NMR, **30**, 223-4.

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

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

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

Received 23 March 2004; Accepted 2 June 2004

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

Biological context

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

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

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

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

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

Methods and experiments

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

The NMR sample contained 2 mM protein concentration (95% H_2O , 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer and 50 mM 1,4-dithiothreitol- d_{10} at pH 7.1. All spectra were acquired at 298 K on Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis TXI probe and on Varian Inova spectrometer (800 MHz) equipped with triple-resonance probes including shielded z-gradients. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels et al., 1995). Backbone amide $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , C^{α} , C' , and side-chain C^{β} resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNC0, 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 HN^{N} , H^{α} , N , C^{α} , C^{β} and C'

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

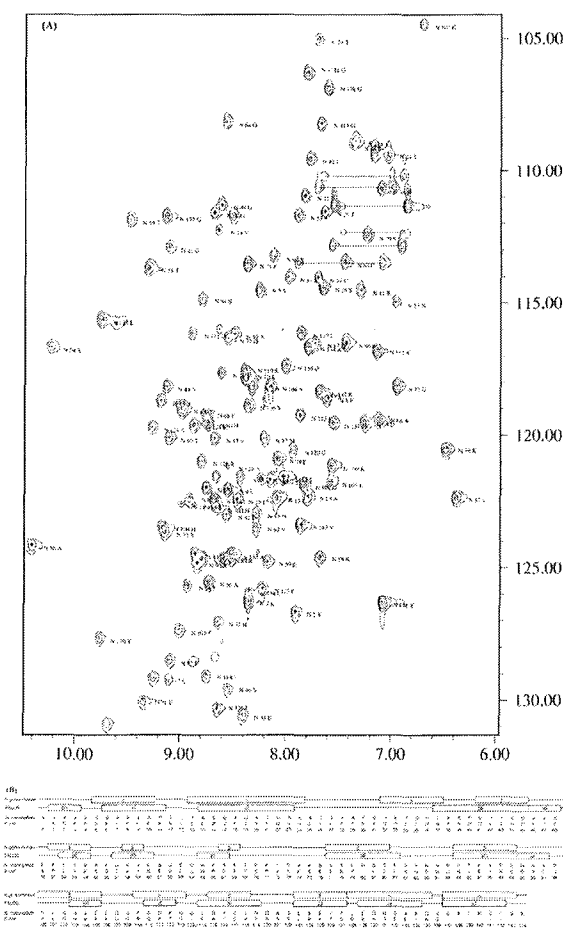


Figure 1. (A) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of MsrB at 298K. The backbone resonances of S67 and G135 are outside the region shown. Side chain amide protons of N and Q residues are indicated by solid horizontal lines. (B) The secondary structures from the X-ray structure of the *N. gonorrhoeae* MsrB and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

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

Extent of assignments and data deposition

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

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

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

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

Acknowledgements

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

References

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

Publication n° 5, revue

S. Boschi-Muller, A. Olry, M. Antoine and G. Branlant.

The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. (2005).

Biochimica et Biophysica Acta., **1703**, 231-8.



Review

The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases

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

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

Received 30 June 2004; received in revised form 14 September 2004; accepted 15 September 2004

Available online 6 October 2004

Abstract

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

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

2. Chemical mechanism: implication of the sulfenic acid chemistry

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

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

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

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

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

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

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

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

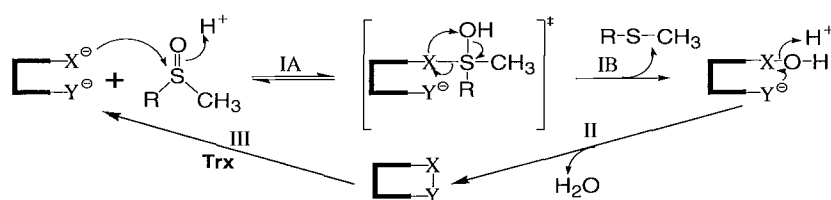


Fig. 1. Proposed catalytic mechanism of Msrs. Representation of the three-step chemical mechanism as described by Olry et al. [9]. In step III, a Michaelis complex is formed between Msr_{ox} and Trx_{red}. Then, a nucleophilic attack of Cys-32 of Trx on the disulfide bond of the Msr leads to formation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

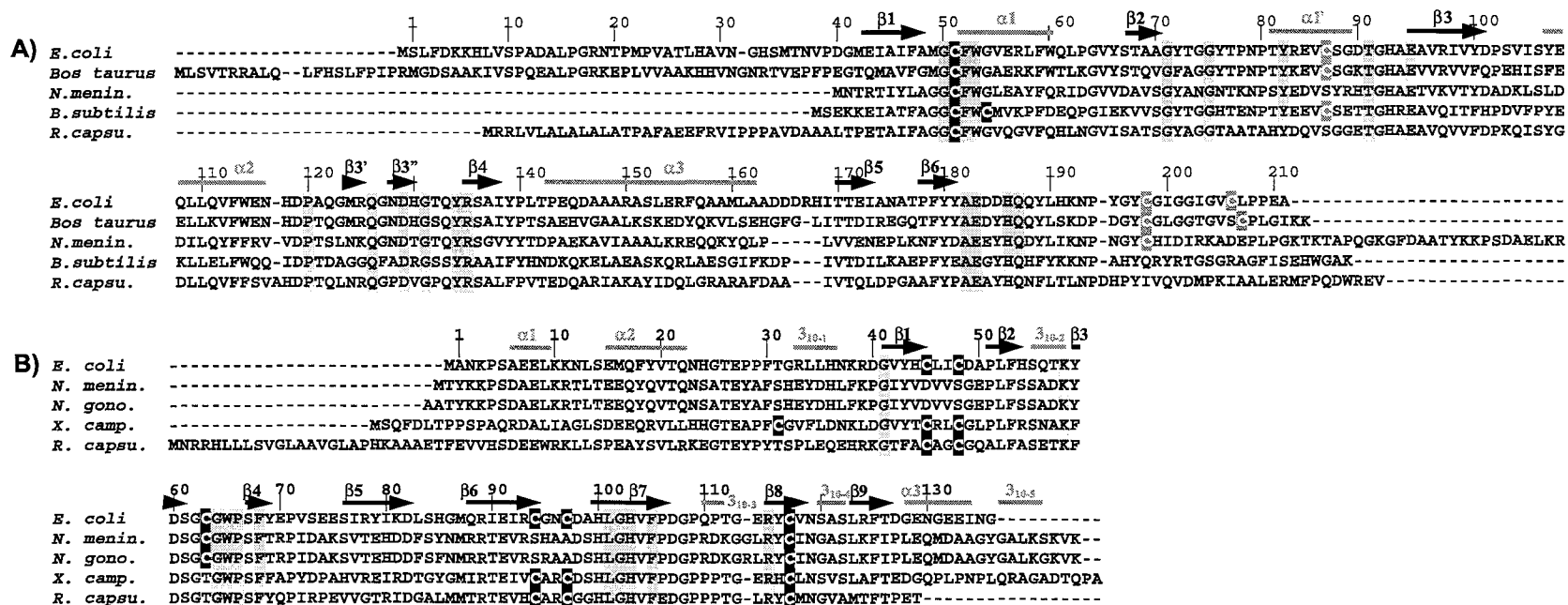


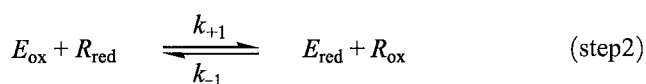
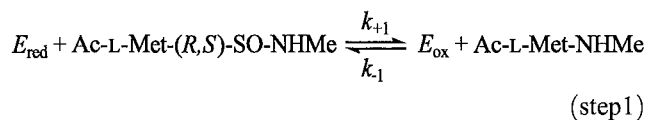
Fig. 2. Sequence alignment of representative sequences of MsrA (A) and MsrB (B) subclasses. (A) The sequences of *E. coli*, *B. taurus*, *N. meningitidis* (*N. mening.*), *B. subtilis* and *R. capsulatus* (*R. capsu.*) MsrAs were aligned with Bioedit software. The numbering of amino acid residues indicated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

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

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

3. Kinetic mechanism

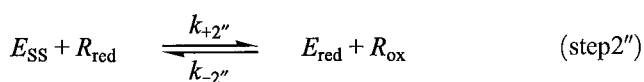
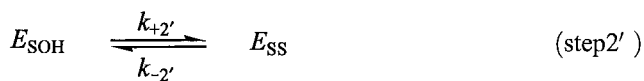
MsrS display a ping-pong kinetic mechanism in the presence of Trx or DTT as a reductant ([14], unpublished data). Kinetic saturations are only observed with Trx with low K_M values (Table 1). The kinetic ping-pong model can be described by the following scheme, where E_{ox} is the sulfenic acid intermediate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



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

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

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



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

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

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

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

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

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

Table 1
Kinetic parameters for the Msr activity of wild-type *E. coli* MsrA and *N. meningitidis* MsrB

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

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

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

^b Olry et al. (unpublished results).

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

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

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

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

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

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

Table 2
Kinetic parameters of the three steps and of the overall reaction for the Msr activity of *N. meningitidis* MsrA and MsrB

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

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

^a Antoine et al. (unpublished results).

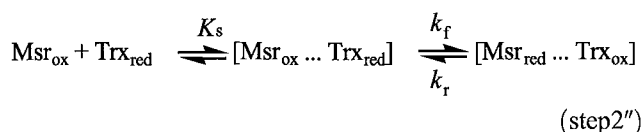
^b Antoine et al. [20].

^c Olry et al. [9].

^d Olry et al. [21].

^e Olry et al. (unpublished results).

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



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

5. Substrate specificity

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

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

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

6. Role of metal in MsrBs

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

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

7. Questions to be addressed?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

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

References

- [1] M. Russel, P. Model, The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 14997–15005.
- [2] T.Y. Lin, G33D mutant thioredoxin primarily affects the kinetics of reaction with thioredoxin reductase. Probing the structure of the mutant protein, *Biochemistry* 38 (1999) 15508–15513.
- [3] F. Tête-Favier, D. Cobessi, S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, A. Aubry, Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase at 1.9 Å resolution, *Struct. Fold. Des.* 8 (2000) 1167–1178.
- [4] W.T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, B.W. Matthews, Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an “anti-oxidation” enzyme, *Biochemistry* 39 (2000) 13307–13312.
- [5] A.B. Taylor, D.M. Benglis, S. Dhandayuthapani, P.J. Hart, Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 4119–4126.
- [6] W.T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, B.W. Matthews, The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 348–352.
- [7] B. Kauffmann, F. Tete-Favier, A. Olry, S. Boschi-Muller, P. Carpentier, G. Branlant, A. Aubry, Crystallisation and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1467–1469.
- [8] S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselaar, G. Branlant, A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35908–35913.
- [9] A. Olry, S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaar, G. Branlant, Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12016–12022.
- [10] L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne, Protein sulfenic acids in redox signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 325–347.
- [11] W. Jeong, M.K. Cha, I.H. Kim, Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2924–2930.
- [12] J.R. Pedrajas, A. Miranda-Vizuete, N. Javanmardy, J.A. Gustafsson, G. Spyrou, Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16296–16301.
- [13] F. Neiers, A. Kriznik, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin-recognition signature, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42462–42468.
- [14] S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant, *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N-terminus or C-terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide, *Protein Sci.* 10 (2001) 2272–2279.
- [15] D. Parsonage, H. Miller, R.P. Ross, A. Claiborne, Purification and analysis of streptococcal NADH peroxidase expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 15 (1993) 3161–3167.
- [16] E.J. Crane, J.I. Yeh, J. Luba, A. Claiborne, Analysis of the kinetic and redox properties of the NADH peroxidase R303M mutant: correlation with the crystal structure, *Biochemistry* 39 (2000) 10353–10364.
- [17] A.A. Sayed, D.L. Williams, Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26159–26166.
- [18] B.W. Lennon, C.H. Williams, Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 36 (1997) 9464–9477.
- [19] L. Zhong, A. Holmgren, Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18121–18128.
- [20] M. Antoine, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45352–45357.
- [21] A. Olry, S. Boschi-Muller, G. Branlant, Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*, *Biochemistry* 43 (2004) 11616–11622.
- [22] R. Grimaud, B. Ezraty, J.K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P.J. Derrick, F. Barras, Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48915–48920.
- [23] V.S. Sharov, D.A. Ferrington, T.C. Squier, C. Schoneich, Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase, *FEBS Lett.* 455 (1999) 247–250.
- [24] J. Moskovitz, J.M. Poston, B.S. Berlett, N.J. Nosworthy, R. Szczepanowski, E.R. Stadtman, Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14167–14172.
- [25] R.A. Kumar, A. Koc, R.L. Cerny, V.N. Gladyshev, Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37527–37535.

Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique et milieux de culture

I. 1. Souches bactériennes

- *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour l'obtention d'ADN plasmidique.

- *E. coli* BE002 : MG1655 *msrA* :: *spec* Ω , *msrB* :: α 3*kan*. Cette souche est utilisée pour la production du type sauvage et des mutants des MsrB de *N. meningitidis* et d'*E. coli*.

- *E. coli* BL21 (DE3) : F-, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal*, *dcm*. Cette souche qui contient l'ORF codant la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *lac* est utilisée pour la production du type sauvage et des mutants des MsrB de *N. meningitidis* marquées avec l'isotope ¹⁵N et ¹⁵N-¹³C et du type sauvage et des mutants de la MsrB d'*E. coli*.

- *E. coli* B834 : F-, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal*, *dcm*, *met*. Cette souche auxotrophe pour la Met est utilisée pour la production de la MsrB de type sauvage de *N. meningitidis* dans laquelle les résidus Met sont remplacés par des résidus sélénioMet.

I. 2. Vecteurs plasmidiques

- pSKPILBMrA et pSKPILBMrB : Il s'agit des phagemides recombinants pBluescript II SK (+) portant la séquence codante des Msr de *N. meningitidis* sous le contrôle du promoteur *lac* (Olry *et al.*, 2002). L'antibiotique de résistance est l'ampicilline.

- pETMrB *N. meningitidis* et *E. coli* : Phagemides recombinants pET-20b portant la séquence codante de la MsrB de *N. meningitidis* et d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur *lac*. L'antibiotique de résistance est la kanamycine.

I. 3. Milieux de culture bactérienne

I. 3. 1. Milieu riche LB

- Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH et le milieu est autoclavé pendant 20 min à 1 bar. Ce milieu est utilisé pour la production en grande quantité de plasmide pSKPILBMr *N. meningitidis* et pETMrB *E. coli* et *N. meningitidis* et de protéine recombinante correspondante. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/L de milieu de culture avant stérilisation. Les milieux sont autoclavés 20 min à 120 °C. Afin de sélectionner les clones recombinants, l'antibiotique approprié est ajouté à une concentration de 200 mg/L après stérilisation.

I. 3. 2. Milieu riche SOC

- Composition : Tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM). Ce milieu est utilisé pour la régénération des cellules après transformation par la technique du choc thermique (voir chapitre II. 1. 5.) Le milieu est autoclavé 20 min à 120 °C.

I. 3. 3. Milieux minimum

*I. 3. 3. 1. Milieu M9 : production de la MsrB de *N. meningitidis* marquée à ¹⁵N et ¹⁵N-¹³C*

- Composition : NaCl (0,5 g/L), KH₂PO₄ (22 mM), Na₂HPO₄, 7H₂O (50 mM), NH₄Cl (1 g/L), glucose (4 g/L), riboflavine (1 mg/L), nicotinamide (1 mg/L), pyridoxine monohydrochloride (1 mg/L), thiamine (1 mg/L), MgSO₄, 7H₂O (2 mM), FeSO₄, 7H₂O (25 mg/L). Pour les productions de la MsrB de *N. meningitidis* marquées à ¹⁵N et ¹⁵N-¹³C, du ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) et du ¹⁵NH₄Cl (1 g/L)+ ¹³Cglucose (4 g/L) sont utilisés.

I. 3. 3. 2. Milieu M9 modifié : production de la MsrB de N. meningitidis enrichie à la sélénomet

- Composition : KH_2PO_4 (44 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (44 mM), Mix I des acides aminés (alanine, arginine, acide aspartique, cystéine, acide glutamique, glutamine, glycine, histidine, leucine, isoleucine, lysine, proline, sérine, thréonine, valine) (40 mg/L), Mix II des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) (40 mg/L), riboflavine (1 mg/L), nicotinamide (1 mg/L), pyridoxine monohydrochloride (1 mg/L), thiamine (1 mg/L), $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (2mM), $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (25 mg/L), NH_4Cl (2 g/L), glucose (4 g/L), sélénomet (40 mg/L).

II. Techniques de génie génétique

II. 1. Préparation de l'ADN plasmidique

II. 1. 1. La minipréparation

La minipréparation d'ADN est une technique utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN (à partir de 5 ml de culture) dans un but analytique. Le protocole passe d'abord par la lyse alcaline des cellules grâce à une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1%. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 100%. Le culot ainsi obtenu est ensuite lavé à l'éthanol à 70% puis séché, repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, et finalement traité 1h à 37°C par la ribonucléase A (1 µg/ml).

II. 1. 2. La maxipréparation

Cette technique est utilisée pour la préparation en grande quantité d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne de 100 mL. Après lyse alcaline des cellules et centrifugation, l'ADN plasmidique est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (Macherey Nagel) qui repose sur l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique

Matériels et Méthodes

élué est concentré par précipitation à l'isopropanol, lavé à l'éthanol à 70% et enfin séché et repris dans du tampon Tris 10 mM EDTA 2mM pH 8,0.

La concentration de l'ADN ainsi obtenu est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm en admettant qu'une unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée à partir du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} , qui doit être compris entre 1,8 et 2.

II. 1. 3. Séquencage de l'ADN double brin

Le séquençage par méthode enzymatique est utilisée afin de vérifier l'introduction correcte des mutations ainsi que l'absence de mutations parasites sur le plasmide, en utilisant l'ADN polymérase du bactériophage T7 (Tabor et Richardson, 1987). 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' $\alpha^{33}PdATP$ dans le mélange réactionnel d'élongation. La séquence d'ADN est analysée après migration sur un gel de polyacrilamide et révélation par autoradiographie.

II. 1. 4. Clônage des ORF codant les Msr

Le clônage des ORF codant la MsrA et la MsrB a été réalisé à partir du génome de la souche *N. meningitidis* serogroup A Z2491 fournie par le Dr M. K. TAHA de l'Institut Pasteur de Paris.

La technique de PCR permet de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADN génomique compris entre deux oligodésoxyribonucléotides, dont les séquences sont complémentaires aux bordures du fragment d'ADN à amplifier et permet également de créer les sites de restriction *NdeI* et *SacI*. L'enzyme utilisée pour la réaction est la *Pfu*. La présence et la taille de l'insert sont vérifiées après dépôt sur gel d'agarose 0,8%.

L'extraction du gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés se fait à l'aide d'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 μ L sur gel d'agarose, aux côtés d'un marqueur de taille adéquat.

Les vecteurs et les inserts sont digérés pendant 1h30 à 37°C par les enzymes de restriction *NdeI* et *SacI* à raison de 3 unités par μ g de matériel nucléique. Les produits de digestion sont ensuite 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 d'un excès d'insert de 3 fois par rapport au vecteur linéarisé. Les mélanges de ligation sont placés dans un bain à 16°C durant au minimum 4H.

Après ligation, la présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonies en utilisant cette fois-ci la Dynazyme. Après transformation de 50 μ L de cellules DH5 α compétentes avec 1 à 5 μ L de mélange réactionnel de ligation, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide. Puis un clone est placé dans 30 μ L d'eau distillée stérile. Le mélange réactionnel pour la PCR est ensuite préparé.

II. 1. 5. Préparation et transformation des bactéries compétentes

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5 α , BE002, BL21(DE3) et B834. Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 35 et 37°C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Elle est centrifugée et le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 30 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 1/10^{ème} du volume initial de solution TB, en présence de diméthyl sulfoxyde (7% final) et incubée 2H dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80°C (Inoue *et al.*, 1990).

La méthode classique de transformaton des bactéries compétentes (Sambrook *et al.*, 1989). La transformation est réalisée en mélangeant 1 ng de plasmide et 50 μ l de bactéries DH5 α compétentes. Après incubation sur glace, le mélange est soumis à un choc thermique de 40 secondes à 42°C puis les cellules sont régénérées 1H 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.

II. 2. Mutagenèse du matériel plasmidique

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du Kit «QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit» commercialisé par Stratagène. La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* (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 reliées.

Le produit de la réaction de PCR est ensuite traité avec l'endonucléase *DpnI* (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 DH5 α compétentes qui vont religer les extrémités du plasmide muté et l'amplifier. Après transformation de 50 μ L de cellules DH5 α compétentes par 1 à 5 μ L de mélange de PCR, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide.

III. Production et purification des Msr de *N. meningitidis* et des MsrB d'*E. coli* sauvages et "mutées"

III. 1. Production des protéines recombinantes

Les Msr de *N. meningitidis*, sauvages et mutées, non marquées produites dans une souche d'*E. coli* BE002 transformée par les plasmides recombinants pSKPILBMrA et pSKPILBMrB portant l'ORF de la protéine à produire sontensemencées au 1/50^{ème} à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB. Les cultures sont ensuite incubées pendant

24 heures à 37°C en milieu LB sous agitation avec comme antibiotique de résistance l'ampicilline (200 mg/l), la spectinomycine (25 mg/l) ou la kanamycine (50 mg/l).

Les cultures des cellules d'*E. coli* BL21(DE3) ou B834, transformées avec les vecteurs plasmidiques pET-MsrB permettant la surexpression des MsrB de *N. meningitidis* et d'*E. coli*, sont ensemencées au 1/50^{ème} à partir d'une préculture d'une nuit en milieu LB (protéine non marquée), minimum M9 (protéine marquée ¹⁵N et ¹⁵N- ¹³C) ou M9 modifié (protéine marquée à la sélénomet) et incubées à 37°C. L'antibiotique de résistance est la kanamycine (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 messenger correspondant à la protéine recombinante. La culture est arrêtée 3H après induction.

Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 g, sont lavées dans du tampon A (Saccharose 25%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) puis centrifugées et les culots cellulaires sont stockés à -20°C.

III. 2. Purification des protéines recombinantes

La purification de la protéine s'effectue en présence de DTT 50 mM. Le tampon de purification pour la MsrB d'*E. coli* dans laquelle du fer est coordonné par quatre Cys ne contient pas d'EDTA

III. 2. 1. Désintégration des cellules

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

III. 2. 2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

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

III. 2. 3. Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon puis déposé sur une colonne de filtration sur gel ACA54 (acrylamide 5%, agarose 4%, BIOSEPPRA[®]) 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 électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE, 15%). Les fractions contenant la protéine sont ensuite rassemblées.

Cette étape permet d'éliminer la majeure partie des protéines contaminantes présentes dans le culot de précipitation et une grande quantité d'acides nucléiques.

III. 2. 4. Chromatographie 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% sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium, Amersham Biosciences[®]) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 et couplée à un système FPLC (Amersham Biosciences[®]). L'élution se fait par un gradient linéaire croissant de KCl de 0 à 200 mM sous un débit de 5 ml/min. Les enzymes MsrA et MsrB de *N. meningitidis* sont éluées à environ 50 mM de KCl. La MsrB d'*E. coli* est élue à environ 150 mM de KCl.

Cette étape permet d'éliminer des contaminants protéiques et surtout beaucoup d'acides nucléiques.

III. 2. 5. Chromatographie hydrophobe

Les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions et contenant la MsrA ou la MsrB de *N. meningitidis* ou la MsrB d'*E. coli* sont amenées à une concentration finale de 1 M en (NH₄)₂SO₄. Cette solution est injectée sur une colonne Phenyl Sepharose préparative (agarose 6% comprenant des groupements phenyls, Amersham Biosciences[®]) équilibrée dans le tampon Tris-HCl 50 mM EDTA 2 mM, pH 8,0, (NH₄)₂SO₄ 1 M et couplée au système FPLC. L'enzyme est élue par un gradient linéaire décroissant de 1 à 0 M en (NH₄)₂SO₄, sous un débit de 5 ml/min. Cette dernière étape permet de purifier les Msr à homogénéité.

III. 2. 6. Concentration et conservation des protéines

Les solutions enzymatiques pures sont finalement concentrées par ultra-filtration sous pression à l'aide d'une membrane Amicon YM10 jusqu'à une concentration de l'ordre de 20-25 DO/mL. Les protéines sont ensuite précipitées en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70% de saturation) et de DTT (50 mM) puis conservées à -20°C .

III. 3. **Contrôle de la pureté et de la masse des protéines purifiées**

III. 3. 1. Electrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de chaque étape de purification. Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R-250.

III. 3. 2. Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon débarrassé de toute trace de sels, 500 μg de protéines sont dessalés sur une colonne de filtration sur gel (HiPrep 26/10 Desalting, Amersham Biosciences[®]) couplée au système FPLC. 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[®]).

IV. **Préparation des substrats sulfoxydes**

Deux méthodes ont été utilisées pour obtenir chacun des quatre isomères de la MetSO : l'une chimique et l'autre enzymatique comme décrit en détail dans le chapitre « Materials and Methods » de la publication Olry *et al.*, 2002.

La synthèse du substrat doublement protégé Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe est quand à lui décrit précisément dans le chapitre « Materials and Methods » de la publication Olry *et al* 2004.

V. Techniques d'étude enzymatique

Toutes nos études ont été effectuées avec des préparations enzymatiques réduites préalablement par 50 mM de DTT pendant 30 min qui subissent ensuite deux dialyses contre le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 sous un flux d'azote. Cette procédure permet d'obtenir des enzymes à l'état réduit et sans trace de DTT.

Toutes les expériences faisant intervenir de la MetSO ont été réalisées avec de la *D,L*-Met-*R,S*-SO. Le terme MetSO fait donc référence à ce mélange des 4 diastéréoisomères. La majorité des études enzymatiques ont été réalisées avec le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe, les Msr présentant une meilleure affinité vis-à-vis de ce substrat.

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire théoriques déterminés par la méthode de Gill et Von Hippel (Gill et Von Hippel, 1989): MsrA de *N. meningitidis* $\epsilon = 26200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; MsrB de *N. meningitidis* $\epsilon = 17730 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$; MsrB d'*E. coli* $\epsilon = 13730 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Les procédures expérimentales suivantes sont explicitées en détail dans les publications Olry *et al.*, 2002 et Olry *et al.*, 2004 :

- Dosage des groupements thiols libres par le 5, 5'-dithiobis (2-nitro) benzoate
- Détermination des paramètres cinétiques K_M et k_{cat} en présence du système réducteur Trx/Trx réductase/NADPH à l'état stationnaire
- Caractérisation de l'intermédiaire acide sulfénique
- Techniques de fluorescence sur la MsrB de *N. meningitidis*
- quantification et stoechiométrie de formation de la Met et de la Ac-*L*-Met-NHMe
- Cinétique d'apparition de l'Ac-*L*-Met-NHMe

V. 1. Détermination du mécanisme cinétique de la MsrB de *N. meningitidis*

Les études cinétiques sont réalisées dans le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 avec le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe et la Trx d'*E. coli* ou le DTT comme

réducteur. En présence de Trx comme réducteur, le mélange réactionnel contient 2 μM de MsrB, 1,28 μM de Trx réductase et 0,3 mM de NADPH. La concentration en Trx et en Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe varie respectivement de 20 à 60 μM et de 0,1 à 0,5 mM. Les mesures sont effectuées à 25°C par suivi de la décroissance de l'absorbance à 340 nm due à la disparition de NADPH.

Avec le DTT comme réducteur, les mesures sont réalisées à 25°C en suivant l'apparition de Ac-L-Met-NH-Me par chromatographie hydrophobe couplée à un système HPLC. Pour ce faire, des fractions aliquotes de mélange réactionnel contenant 10 μM de MsrB et des concentrations variables de Ac-L-Met-R,S-SO-NH-Me (0,5 à 3 mM) et de DTT (2,5 à 40 mM) sont incubés pendant différents temps et la réaction est stoppée par ajout de TFA 1%. Dans chaque aliquote, la quantité de Ac-L-Met-NHMe est mesurée.

V. 2. Etudes en fonction du pH

V. 2. 1. Vitesse de modification des Cys63 et Cys117 par le 2-PDS

La variation de la constante de second ordre d'alkylation k_2 ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) obtenue en divisant la vitesse observée k_{obs} à chaque pH par la concentration en 2-PDS a été suivie dans une gamme de pH allant de 7,25 à 9,5 dans le polytampon Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, Acide acétique 30 mM, à une force ionique constante et à une température de 25°C. La concentration en MsrB est fixée à 10 μM et la concentration en 2-PDS à 300 μM .

V. 2. 2. Etude de la première étape de réduction du substrat sulfoxyde

Le principe de la technique basée sur la différence d'amplitude d'émission de fluorescence entre les Msr sous forme réduite et oxydée est décrite en détails dans la publication Olry *et al.*, 2004. Les mesures sont réalisées à une concentration saturante en substrat dans la gamme de pH utilisée. Le polytampon utilisé est le Tris 120 mM, Imidazole 30 mM, Acide acétique 30 mM à force ionique constante et à une température de 25°C.

Les traces expérimentales obtenues sont ajustées à une équation de type monoexponentielle afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes.

V. 3. Mise en évidence de la Cys du pont disulfure dans la MsrB de *N. meningitidis* formant un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys32 de la Trx

V. 3. 1 Formation du complexe covalent MsrB sauvage-TrxCys35Ser et MsrBCys117Ser ou MsrBCys63Ser-TrxCys35Ser

La MsrB de *N. meningitidis* de type sauvage est oxydée sous forme de pont disulfure par ajout de MetSO 150 mM en excès pendant 10 min à 25°C. Puis, un excès de trois fois de TrxCys35Ser d'*E. coli* est ajoutée afin de déplacer l'équilibre en faveur du complexe.

L'ensemble des réactions est réalisé dans un tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Le complexe formé après 30 min est ensuite dénaturé par du SDS à une concentration finale de 1%. Un excès de dix fois d'IAM est alors ajouté, permettant ainsi de « marquer » la Cys de la MsrB qui n'a pas été attaquée par la Cys32 de la Trx.

Les complexes covalents artificiels MsrBCys63Ser-TrxCys35Ser et MsrBCys117Ser-TrxCys35Ser ont été utilisés comme témoins. La technique de formation de ces complexes est la suivante, 1) la Cys de ces deux MsrB mutées est dans un premier temps activée par le DTNB pour former un adduit MsrB-TNB, 2) l'excès de TNB- est éliminé en utilisant une colonne de gel filtration HiPrep60 (Amersham Biosciences®) et; 3) enfin l'ajout en quantité stoechiométrique de TrxCys35Ser permet de former le complexe covalent stable sous forme de pont disulfure.

La réaction est suivie par la libération de TNB- à une DO de 412nm au spectrophotomètre.

V. 3. 2. Purification du complexe MsrB sauvage-TrxCys35Ser

Le complexe covalent présent dans le mélange réactionnel contenant du SDS, de l'IAM, de la MsrB de type sauvage oxydée et de la TrxCys35Ser est purifié *via* l'utilisation d'une colonne SUPERDEX 75 (Pharmacia Biotech®) dont le domaine de fractionnement est compris entre 3 et 70 KDa. Le débit utilisé est de 0,4 ml/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, KCl 300 mM, pH 8,0. La pureté du complexe est vérifiée sur gel d'électrophorèse dénaturant SDS-PAGE 12,5%. Le marqueur de taille utilisé pour sélectionner les fractions pouvant contenir le complexe et mesurer le profil de migration sur

gel d'électrophorèse SDS-PAGE est constitué du complexe covalent sous forme de pont disulfure intermoléculaire MsrBCys63Ser-TrxCys35Ser et MsrBCys117Ser-TrxCys35Ser.

V. 3. 3. Analyse en spectrométrie de masse

Avant analyse, l'ensemble des échantillons est dessalé dans du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 7,6. Les expériences de spectrométrie de masse sont réalisées à l'aide du spectromètre ESI en temps de vol (LCT, Micromass[®], Altrincham, UK). La présence du complexe et sa pureté sont tout d'abord vérifiées par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes (voir chapitre III. 3. 2.). Puis, une quantité de l'ordre du µg est digérée par la protéase AspN.

Les peptides générés sont purifiés par chromatographie liquide hydrophobe couplée à un système HPLC en utilisant une colonne hydrophobe de type C₁₈ (Water[®], Atlantis) et leur masse est directement analysée en spectrométrie de masse MALDI en conditions dénaturantes. Pour obtenir la masse du complexe entre un peptide de la MsrB et la Trx qui n'est pas digérée par la protéase AspN, celui-ci est purifié par chromatographie hydrophobe couplée à un système HPLC en utilisant une colonne de type C₄ (Water[®], Atlantis) puis analysé en spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes.

V. 4. **Mise en évidence et caractérisation du métal coordiné dans les métalloMsrB**

V. 4. 1. Spectrométrie de masse

Le contenu en métal est déterminé *via* la technique de spectrométrie de masse par électrospray en conditions natives. Avant analyse, l'ensemble des échantillons est dessalé dans du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 7,6 en utilisant la colonne de filtration sur gel HiPrep 26/10 Desalting (Amersham-Biosciences[®]) équilibrée en tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 7,6. Les expériences de spectrométrie de masse sont réalisées à l'aide du spectromètre ESI en temps de vol (LCT, Micromass[®], Altrincham, UK). Les mesures sont effectuées en conditions non dénaturantes dans du tampon acétate 50 mM pH 6,8. Les enzymes sont diluées à une concentration de 10 pmol/µL dans un tampon acétate 10 mM pH 6,8 et continuellement injectées dans le spectromètre de masse à raison de 5 µL/min. Le voltage appliqué est de 80V. Les spectres de masse sont enregistrés en mode ion

Matériels et Méthodes

positif dans une gamme de masses comprise entre 1000 et 4000 m/Z après calibration de l'appareil avec de la myoglobine de cœur de cheval diluée à 2 pmol/ μ L dans une solution eau acétonitrile 1 : 1 (v/v) acidifiée avec 1% d'acide formique.

V. 4. 2. Spectrométrie d'émission atomique

Le contenu en métal est déterminé en utilisant la technique de spectrométrie atomique d'émission (SEA-DCP). Les échantillons sont préparés dans du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 (1 mg de protéine dans 2 ml de tampon). En parallèle, des échantillons témoins sont réalisés avec le tampon pour mesurer la concentration en métal de celui-ci.

V. 5. Préparation des formes apo-MsrB *E. coli* de type sauvage et *N. meningitidis* Asp45Cys/Ser48Cys/Ser94Cys/Ala97Cys

Les enzymes sont précipitées à température ambiante par ajout de TCA 10% (w/v) en présence de DTT 0,1 M. Le mélange est centrifugé 20 min à 12000 g et le culot repris dans un tampon Tris-HCl 500 mM, pH 8,0 contenant 0,1 M de DTT. La protéine est alors incubée 3H à température ambiante et précipitée une seconde fois par ajout de TCA 10% (w/v) contenant 0,1 M de DTT. Le précipité centrifugé 20 min à 12000 g est dissout dans un tampon Tris-HCl 500 mM urée 8 M pH 8,0. Puis la concentration en urée est amenée à 1 M par dilution dans un tampon Tris-HCl 500 mM, pH 8,0. L'urée et le DTT sont finalement éliminés par chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne Econo-pac EP 10DG (Biorad®) équilibrée en tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

V. 6. Techniques d'études du rôle structural du métal

V. 6. 1. Suivi de la fluorescence du Trp65 en fonction de la concentration en urée

Le message de fluorescence du Trp65 du site actif est suivi à l'aide d'un fluorimètre SAFAS® fluorimeter flx. Les mesures sont effectuées dans un tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0, la concentration en protéine est de 10 μ M. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 291 nm, les spectres d'émission de fluorescence sont mesurés entre 320 et 420 nm. Une moyenne de 6 spectres est réalisée pour chaque concentration en urée.

V. 6. 2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les mesures sont effectuées dans un tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0 sur un microcalorimètre VP-DSC microcalorimeter (Microcal[®], Inc), la concentration en protéine est de 10 μ M. Le tampon de dialyse est utilisé pour la cellule de référence et pour enregistrer la ligne de base. Avant toute mesure, les échantillons de protéine sont dégazés 2 fois pendant 7 min à l'aide d'une pompe à vide. La vitesse de scan est de 60 $^{\circ}$ C. h⁻¹. Les thermogrammes sont analysés par le logiciel Microcal ORIGIN[®] selon un modèle à deux états.

V. 6. 3. Dichroïsme circulaire

Les mesures sont effectuées dans un tampon KPi 10 mM pH 7,1 sur un spectrophotomètre Jobin-Yvon CD6, la concentration en protéine est de 5 μ M. Les spectres sont réalisés dans une gamme de longueur d'onde allant de 190 nm à 260 nm, avec un pas de 1 nm, à une température de 25 $^{\circ}$ C. Une moyenne de 6 spectres est réalisée pour chaque mesure.

Bibliographie

- A**brams, W. R., Weinbaum, G., Weissbach, L., Weissbach, H. et Brot, N. (1981). Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **78**, 7483-6.
- Abraham, N. G., Da Silva, J. L., Dunn, M. W., Kigasawa, K. et Shibahara, S. (1998). Retinal pigment epithelial cell-based gene therapy against hemoglobin toxicity. Int. J. Mol. Med., **1**, 657-63.
- Abulimiti, A., Qiu, X., Chen, J., Liu, Y. et 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.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A. et Radi, R. (1996). Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. Chem. Res. Toxicol., **9**, 390-6.
- Aminova, L. R., Kyslikova, E., Volfova, O. et Trotsenko, Y. A. (1991). Characterization of catalase-negative mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Folia Microbiol. (Praha), **36**, 158-63.
- Anantharamaiah, G. M., Hughes, T. A., Iqbal, M., Gawish, A., Neame, P. J., Medley, M. F. et 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. et Branlant, G. (2003). Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. J. Biol. Chem., **278**, 45352-7.
- Auchere, F. et Capeillere-Blandin, C. (2002). Oxidation of Cu, Zn-superoxide dismutase by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system: functional and structural effects. Free Radic. Res., **36**, 1185-98.
- Auchere, F., Sikkink, R., Cordas, C., Raleiras, P., Tavares, P., Moura, I. et Moura, J. J. (2004). Overexpression and purification of *Treponema pallidum* rubredoxin; kinetic evidence for a superoxide-mediated electron transfer with the superoxide reductase neelaredoxin. J. Biol. Inorg. Chem., **9**, 839-49.
- B**abior, B. M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A. et Wentworth, P., Jr. (2003). Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **100**, 3031-4.
- Baker, C. J., Harmon, G. L., Glazener, J. A. et Orlandi, E. W. (1995). A Noninvasive Technique for Monitoring Peroxidative and H₂O₂-Scavenging Activities during Interactions between Bacterial Plant Pathogens and Suspension Cells. Plant Physiol., **108**, 353-359.
- Banerjee, S. K. et Mudd, J. B. (1992). Reaction of ozone with glycophorin in solution and in lipid vesicles. Arch. Biochem. Biophys., **295**, 84-9.
- Barkats, M., Millecamps, S., Abrioux, P., Geoffroy, M. C. et Mallet, J. (2000). Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. J. Neurochem., **75**, 1438-46.
- Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A. et Getzoff, E. D. (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. Biochemistry, **43**, 8038-47.

Bibliographie

- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Konig, S., Fales, H. M., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B. et Chock, P. B.** (1999). Regulation of PTP1B *via* glutathionylation of the active site cysteine 215. Biochemistry, **38**, 6699-705.
- Beal, M. F.** (1994). Energy, oxidative damage, and Alzheimer's disease: clues to the underlying puzzle. Neurobiol. Aging, **15 Suppl 2**, S171-4.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. et Freeman, B. A.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **87**, 1620-4.
- Bergt, C., Fu, X., Huq, N. P., Kao, J. et Heinecke, J. W.** (2004). Lysine residues direct the chlorination of tyrosines in YXXK motifs of apolipoprotein A-I when hypochlorous acid oxidizes high density lipoprotein. J. Biol. Chem., **279**, 7856-66.
- Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S. et Andersen, J. K.** (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. Biochem Pharmacol., **64**, 1037-48.
- Bhuyan, K. C., Reddy, P. G. et Bhuyan, D. K.** (2002). Thioredoxin genes in lens: regulation by oxidative stress. Methods Enzymol., **347**, 421-35.
- Bielski, B. H., Richter, H. W. et Chan, P. C.** (1975). Some properties of the ascorbate free radical. Ann. N Y. Acad. Sci., **258**, 231-7.
- Bilodeau, J. F., Patenaude, A., Piedboeuf, B., Carrier, C., Petrov, P., Faure, R. et Mirault, M. E.** (2002). Glutathione peroxidase-1 expression enhances recovery of human breast carcinoma cells from hyperoxic cell cycle arrest. Free Radic. Biol. Med., **33**, 1279-89.
- Biteau, B., Labarre, J. et Toledano, M. B.** (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. Nature, **425**, 980-4.
- Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M. et Guarente, L.** (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. J. Biol. Chem., **278**, 38966-9.
- Boches, F. S. et Goldberg, A. L.** (1982). Role for the adenosine triphosphate-dependent proteolytic pathway in reticulocyte maturation. Science, **215**, 978-80.
- Borrelli, M. J., Lepock, J. R., Frey, H. E., Lee, Y. J. et Corry, P. M.** (1996). Excess protein in nuclei isolated from heat-shocked cells results from a reduced extractability of nuclear proteins. J. Cell Physiol., **167**, 369-79.
- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. et Branlant, G.** (2000). A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **275**, 35908-13.
- Boschi-Muller, S., Azza, S. et Branlant, G.** (2001). *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. Protein Sci., **10**, 2272-9.
- Bota, D. A. et Davies, K. J.** (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. Nat. Cell Biol., **4**, 674-80.
- Bota, D. A., Van Remmen, H. et Davies, K. J.** (2002). Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. FEBS. Lett., **532**, 103-6.

- Bott, R., Ultsch, M., Kossiakoff, A., Graycar, T., Katz, B. et Power, S.** (1988). The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin at 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation. J. Biol. Chem., **263**, 7895-906.
- Boveris, A., Alvarez, S. et Navarro, A.** (2002). The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. Free Radic. Biol. Med., **33**, 1186-93.
- Bowry, V. W., Stanley, K. K. et Stocker, R.** (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **89**, 10316-20.
- Bredt, D. S. et Snyder, S. H.** (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **87**, 682-5.
- Brennan, J. P., Wait, R., Begum, S., Bell, J. R., Dunn, M. J. et Eaton, P.** (2004). Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. J. Biol. Chem., **279**, 41352-60.
- Brot, N., Weissbach, L., Werth, J. et Weissbach, H.** (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **78**, 2155-8.
- Brot, N. et Weissbach, H.** (1991). Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. Biofactors, **3**, 91-6.
- Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et Nathan, C.** (2002). Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. Science, **295**, 1073-7.
- Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V. et Chumakov, P. M.** (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. Science, **304**, 596-600.
- Bulteau, A. L., Petropoulos, I. et Friguet, B.** (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. Exp. Gerontol., **35**, 767-77.
- Bump, E. A. et Brown, J. M.** (1990). Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Pharmacol. Ther., **47**, 117-36.
- Busse, E., Zimmer, G., Schopohl, B. et Kornhuber, B.** (1992). Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione *in vitro* and *in vivo*. Arzneimittelforschung, **42**, 829-31.
- Caldwell, P., Luk, D. C., Weissbach, H. et Brot, N.** (1978). Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **75**, 5349-52.
- Candeias, L. P., Stratford, M. R. et Wardman, P.** (1994). Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron(II) complex. Free Radic. Res., **20**, 241-9.
- Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Rancan, F. et Bohm, F.** (2003). Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. Arch. Biochem. Biophys., **412**, 47-54.
- Chander, M. et Demple, B.** (2004). Functional analysis of SoxR residues affecting transduction of oxidative stress signals into gene expression. J. Biol. Chem., **279**, 41603-10.

Bibliographie

- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. et Bahler, J.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. Mol. Biol. Cell., **14**, 214-29.
- Chen, L., Sharma, P., Le Gall, J., Mariano, A. M., Teixeira, M. et Xavier, A. V.** (1994). A blue non-heme iron protein from *Desulfovibrio gigas*. Eur. J. Biochem., **226**, 613-8.
- Chen, Q. et Vierling, E.** (1991). Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein. Mol. Gen. Genet., **228**, 328.
- Cheng, F. C., Jen, J. F. et Tsai, T. H.** (2002). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **781**, 481-96.
- Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorselaer, A., Leize-Wagner, E. et Rabilloud, T.** (2003). Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. J. Biol. Chem., **278**, 37146-53.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. et Ames, B. N.** (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell, **41**, 753-62.
- Christman, M. F., Storz, G. et Ames, B. N.** (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **86**, 3484-8.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. et Hoshi, T.** (1997). Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **94**, 9932-7.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. et Hoshi, T.** (1999). Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. FEBS. Lett., **442**, 48-52.
- Clemens, M. R. et Waller, H. D.** (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. Chem. Phys. Lipids, **45**, 251-68.
- Compan, I. et Touati, D.** (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., **175**, 1687-96.
- Constantinescu, A., Pick, U., Handelman, G. J., Haramaki, N., Han, D., Podda, M., Tritschler, H. J. et Packer, L.** (1995). Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. Biochem. Pharmacol., **50**, 253-61.
- Coulter, E. D. et Kurtz, D. M., Jr.** (2001). A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. Arch. Biochem. Biophys., **394**, 76-86.
- Crane, E. J., 3rd, Parsonage, D., Poole, L. B. et Claiborne, A.** (1995). Analysis of the kinetic mechanism of enterococcal NADH peroxidase reveals catalytic roles for NADH complexes with both oxidized and two-electron-reduced enzyme forms. Biochemistry, **34**, 14114-24.
- Crow, J. P., Spruell, C., Chen, J., Gunn, C., Ischiropoulos, H., Tsai, M., Smith, C. D., Radi, R., Koppenol, W. H. et Beckman, J. S.** (1994). On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. Free Radic. Biol. Med., **16**, 331-8.

- D**anel, C., Erzurum, S. C., Prayssac, P., Eissa, N. T., Crystal, R. G., Herve, P., Baudet, B., Mazmanian, M. et Lemarchand, P. (1998). Gene therapy for oxidant injury-related diseases: adenovirus-mediated transfer of superoxide dismutase and catalase cDNAs protects against hyperoxia but not against ischemia-reperfusion lung injury. Hum. Gene Ther., **9**, 1487-96.
- Datta, D., Vaidehi, N., Xu, X. et Goddard, W. A., 3rd.** (2002). Mechanism for antibody catalysis of the oxidation of water by singlet dioxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **99**, 2636-41.
- Davies, K. J. A.** (2001). Degradation of oxidized protein by the 20S proteasome. Biochimie, **83**, 301-10.
- 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.
- Davis, D. A., Newcomb, F. M., Moskovitz, J., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Kaufman, J., Fales, H. M., Levine, R. L. et Yarchoan, R.** (2000). HIV-2 protease is inactivated after oxidation at the dimer interface and activity can be partly restored with methionine sulfoxide reductase. Biochem. J., **346 Pt 2**, 305-11.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. et Davies, M. J.** (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J., **324 (Pt 1)**, 1-18.
- Demple, B.** (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon-a review. Gene, **179**, 53-7.
- Devasagayam, T. P., Steenken, S., Obendorf, M. S., Schulz, W. A. et 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. et Baseman, J. B.** (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. J. Bacteriol., **183**, 5645-50.
- Dizdaroglu, M. et Simic, M. G.** (1980). Separation of dipeptides by high-resolution gas chromatography on a fused silica capillary column after trimethylsilylation. Anal. Biochem., **108**, 269-73.
- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. et Actis, L. A.** (2004). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. Microbiology, **150**, 3657-67.
- Douglas, T., Daniel, D. S., Parida, B. K., Jagannath, C. et Dhandayuthapani, S.** (2004). Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages. J. Bacteriol., **186**, 3590-8.
- Dow, L. K., Changela, A., Hefner, H. E. et Churchill, M. E.** (1997). Oxidation of a critical methionine modulates DNA binding of the *Drosophila melanogaster* high mobility group protein, HMG-D. FEBS. Lett., **414**, 514-20.
- E**jiri, S. I., Weissbach, H. et Brot, N. (1979). Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **139**, 161-4.
- Ericsson, J. et Dallner, G.** (1993). Distribution, biosynthesis, and function of mevalonate pathway lipids. Subcell. Biochem., **21**, 229-72.

Bibliographie

Ezraty, B., Grimaud, R., Hassouni, M. E., Moinier, D. et Barras, F. (2004). Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*. Embo J., **23**, 1868-77.

Finstein, R. N. (1973). Studies of acatalasemia. Birth Defects Orig. Artic. Ser., **9**, 55-61.

Fernando, M. R., Nanri, H., Yoshitake, S., Nagata-Kuno, K. et Minakami, S. (1992). Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. Eur. J. Biochem., **209**, 917-22.

Ferrington, D. A., Sun, H., Murray, K. K., Costa, J., Williams, T. D., Bigelow, D. J. et Squier, T. C. (2001). Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. J. Biol. Chem., **276**, 937-43.

Flint, D. H., Smyk-Randall, E., Tuminello, J. F., Draczynska-Lusiak, B. et Brown, O. R. (1993). The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. J. Biol. Chem., **268**, 25547-52.

Flohe, L., Eisele, B. et Wendel, A. (1971). [Glutathion peroxidase. I. Isolation and determinations of molecular weight]. Hoppe Seylers Z Physiol. Chem., **352**, 151-8.

Foote, C. S., Shook, F. C. et Abakerli, R. B. (1984). Characterization of singlet oxygen. Methods Enzymol., **105**, 36-47.

Frelinger, A. L., 3rd et Zull, J. E. (1984). Oxidized forms of parathyroid hormone with biological activity. Separation and characterization of hormone forms oxidized at methionine 8 and methionine 18. J. Biol. Chem., **259**, 5507-13.

Fridovich, I. (1970). Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem., **245**, 4053-7.

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A. et Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. J. Biol. Chem., **271**, 9573-8.

Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C. et Heinecke, J. W. (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. J. Biol. Chem., **278**, 28403-9.

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

Galati, G., Teng, S., Moridani, M. Y., Chan, T. S. et O'Brien, P. J. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. Drug Metabol. Drug Interact., **17**, 311-49.

Gao, J., Yin, D., Yao, Y., Williams, T. D. et Squier, T. C. (1998a). Progressive decline in the ability of calmodulin isolated from aged brain to activate the plasma membrane Ca-ATPase. Biochemistry, **37**, 9536-48.

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

- Gao, J., Yao, Y. et Squier, T. C.** (2001). Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex. Biophys. J., **80**, 1791-801.
- Garner, M. H. et Spector, A.** (1980). Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **77**, 1274-7.
- Garrison, W. M., Jayko, M. E. et Bennett, W.** (1962). Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. Radiat. Res., **16**, 483-502.
- Gill, S. C. et Von Hippel; P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem., **182**, 319-26.
- Giulivi, C., Pacifici, R. E. et Davies, K. J.** (1994). Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. Arch. Biochem. Biophys., **311**, 329-41.
- Giulivi, C., Boveris, A. et Cadenas, E.** (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. Arch. Biochem. Biophys., **316**, 909-16.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. et Labarre, J.** (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., **273**, 22480-9.
- Goedert, M.** (1997). Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein. Nature, **388**, 232-3.
- Goedert, M.** (2001a). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Neurosci., **2**, 492-501.
- Goedert, M.** (2001b). Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. Clin. Chem. Lab. Med., **39**, 308-12.
- Goldberg, A. L. et Boches, F. S.** (1982). Oxidized proteins in erythrocytes are rapidly degraded by the adenosine triphosphate-dependent proteolytic system. Science, **215**, 1107-9.
- Gregroy, E. M., Yost, F. J., Jr. et Fridovich, I.** (1973). Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions. J. Bacteriol., **115**, 987-91.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J. et Barras, F.** (2001). Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. J. Biol. Chem., **276**, 48915-20.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M. et Davies, K. J.** (1995). Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. J. Biol. Chem., **270**, 2344-51.
- Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N. et Davies, K.** (2001). Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., **56**, B459-67.
- Gustavsson, N., Harndahl, U., Emanuelsson, A., Roepstorff, P. et Sundby, C.** (1999). Methionine sulfoxidation of the chloroplast small heat shock protein and conformational changes in the oligomer. Protein Sci., **8**, 2506-12.
- Gustavsson, N., Kokke, B. P., Harndahl, U., Silow, M., Bechtold, U., Poghosyan, Z., Murphy, D., Boelens, W. C. et Sundby, C.** (2002). A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. Plant J., **29**, 545-53.

Bibliographie

- H**addad, J. J. (2004). Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun., **316**, 969-77.
- Hansel, A., Kuschel, L., Hehl, S., Lemke, C., Agricola, H. J., Hoshi, T. et Heinemann, S. H. (2002). Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. Faseb. J., **16**, 911-3.
- Hansel, A., Heinemann, S. H. et Hoshi T. (2005). Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation. Biochim Biophys. Acta., **1703**, 239-47.
- Harndahl, U., Kokke, B. P., Gustavsson, N., Linse, S., Berggren, K., Tjerneld, F., Boelens, W. C. et Sundby, C. (2001). The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic alpha-helix. Biochim. Biophys. Acta., **1545**, 227-37.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature, **381**, 571-9.
- Hassan, H. M. et Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. J. Biol. Chem., **254**, 10846-52.
- Hassouni, M. E., Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F. et Barras, F. (1999). The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **96**, 887-92.
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I. et Davies, M. J. (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids, **25**, 259-74.
- Hazell, L. J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E. et Stocker, R. (1996). Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. J. Clin. Invest., **97**, 1535-44.
- Hazen, S. L., Zhang, R., Shen, Z., Wu, W., Podrez, E. A., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Mitra, S. N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P. A., Hoff, H. F. et Abu-Soud, H. M. (1999). Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. Circ. Res., **85**, 950-8.
- Hebuterne, X., Wang, X. D., Smith, D. E., Tang, G. et Russell, R. M. (1996). *In vivo* biosynthesis of retinoic acid from beta-carotene involves an eccentric cleavage pathway in ferret intestine. J. Lipid Res., **37**, 482-92.
- Henderson, J. P., Byun, J., Mueller, D. M. et Heinecke, J. W. (2001). The eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-bromide system of human eosinophils generates 5-bromouracil, a mutagenic thymine analogue. Biochemistry, **40**, 2052-9.
- Hiller, K. O., Maloch, B., Gobl, M. et Asmus, K. D. (1981). Mechanism of the OH[•] radical induced oxidation of methionine in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc., **103**, 2734-2743.
- Ho, Y. S., Dey, M. S. et Crapo, J. D. (1996). Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. Am. J. Physiol., **270**, L810-8.
- Hofmann, B., Hecht, H. J. et Flohe, L. (2002). Peroxiredoxins. Biol. Chem., **383**, 347-64.
- Hogg, N., Singh, R. J. et Kalyanaraman, B. (1996). The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. FEBS. Lett., **382**, 223-8.

- Hokenson, M. J., Uversky, V. N., Goers, J., Yamin, G., Munishkina, L. A. et Fink, A. L. (2004). Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *Biochemistry*, **43**, 4621-33.
- Hopkin, K. A., Papazian, M. A. et Steinman, H. M. (1992). Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24253-8.
- Hsu, Y. R., Narhi, L. O., Spahr, C., Langley, K. E. et Lu, H. S. (1996). *In vitro* methionine oxidation of *Escherichia coli*-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization. *Protein Sci.*, **5**, 1165-73.
- Huang, W., Escribano, J., Sarfarazi, M. et Coca-Prados, M. (1999). Identification, expression and chromosome localization of a human gene encoding a novel protein with similarity to the pilB family of transcriptional factors (pilin) and to bacterial peptide methionine sulfoxide reductases. *Gene*, **233**, 233-40.
- Hudson, A. J., Andrews, S. C., Hawkins, C., Williams, J. M., Izuhara, M., Meldrum, F. C., Mann, S., Harrison, P. M. et Guest, J. R. (1993). Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 985-95.
- I**mlay, J. A. et Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-9.
- J**ackson, C., Dench, J., Moore, A. L., Halliwell, B., Foyer, C. H. et Hall, D. O. (1978). Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur. J. Biochem.*, **91**, 339-44.
- Jenney, FE Jr., Verhagen, MF., Cui, X, et Adams, MW. (1999). Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science*, **286**, 306-9
- Jeong, W., Cha, M. K. et Kim, I. H. (2000). Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2924-30.
- Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., Tall, A. R. et Rothblat, G. H. (1998). Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5599-606.
- Jiang, Q., Griffin, D. A., Barofsky, D. F. et Hurst, J. K. (1997). Intraphagosomal chlorination dynamics and yields determined using unique fluorescent bacterial mimics. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1080-9.
- Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F. L., Kutchukian, P. S., Musah, R. A., Wink, D. A. et 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.
- Jovanovic, T., Ascenso, C., Hazlett, K. R., Sikink, R., Krebs, C., Litwiller, R., Benson, L. M., Moura, I., Moura, J. J., Radolf, J. D., Huynh, B. H., Naylor, S. et Rusnak, F. (2000). Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28439-48.
- Jung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T. et Heinemann, S. H. (2002). Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS. Lett.*, **527**, 91-4.

Bibliographie

- K**agan, V., Serbinova, E. et Packer, L. (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. Biochem. Biophys. Res. Commun., **169**, 851-7.
- Kalen, A., Norling, B., Appelkvist, E. L. et Dallner, G.** (1987). Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, **926**, 70-8.
- Kandaswami, C., Perkins, E., Drzewiecki, G., Soloniuk, D. S. et Middleton, E., Jr.** (1992). Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. Anticancer Drugs, **3**, 525-30.
- Kang, S. W., Baines, I. C. et Rhee, S. G.** (1998a). Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. J. Biol. Chem., **273**, 6303-11.
- Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C. et Rhee, S. G.** (1998b). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. J. Biol. Chem., **273**, 6297-302.
- Kanofsky, J. R.** (1983). Singlet oxygen production by lactoperoxidase. J. Biol. Chem., **258**, 5991-3.
- Kanofsky, J. R. et Sima, P.** (1991). Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. J. Biol. Chem., **266**, 9039-42.
- Kantorow, M., Hawse, J. R., Cowell, T. L., Benhamed, S., Pizarro, G. O., Reddy, V. N. et Hejtmancik, J. F.** (2004). Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **101**, 9654-9.
- Katsumi, H., Nishikawa, M., Ma, S. F., Yamashita, F. et Hashida, M.** (2004). Physicochemical, tissue distribution, and vasodilation characteristics of nitrosated serum albumin: delivery of nitric oxide *in vivo*. J. Pharm. Sci., **93**, 2343-52.
- Kauffmann, B., Favier, F., Olry, A., Boschi-Muller, S., Carpentier, P., Branlant, G. et Aubry, A.** (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **58**, 1467-9.
- Keck, R. G.** (1996). The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. Anal. Biochem., **236**, 56-62.
- Keele, B. B., Jr., McCord, J. M. et Fridovich, I.** (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. J. Biol. Chem., **245**, 6176-81.
- Kellogg, E. W., 3rd et Fridovich, I.** (1975). Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J. Biol. Chem., **250**, 8812-7.
- Kettle, A. J. et Winterbourn, C. C.** (1990). Superoxide enhances hypochlorous acid production by stimulated human neutrophils. Biochim. Biophys. Acta, **1052**, 379-85.
- Kim, E. J., Chung, H. J., Suh, B., Hah, Y. C. et Roe, J. H.** (1998). Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of sodN gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. Mol. Microbiol., **27**, 187-95.
- Kim, H. Y. et Gladyshev, V. N.** (2004). Characterization of mouse endoplasmic reticulum methionine-R-sulfoxide reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., **320**, 1277-83.

- Kim, I. K., Yim, Y. I., Kim, Y. M., Lee, J. W., Yim, H. S. et Kang, S. O. (2003). CbiX-homologous protein (CbiXhp), a metal-binding protein, from *Streptomyces seoulensis* is involved in expression of nickel-containing superoxide dismutase. FEMS. Microbiol. Lett., **228**, 21-6.
- King, D. A., Hannum, D. M., Qi, J. S. et Hurst, J. K. (2004). HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys., **423**, 170-81.
- Kitagawa, M., Matsumura, Y. et Tsuchido, T. (2000). Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett., **184**, 165-71.
- Koc, A., Gasch, A. P., Rutherford, J. C., Kim, H. Y. et Gladyshev, V. N. (2004). Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **101**, 7999-8004.
- Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. et Nakayama, K. (2000). A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). Biochem. J., **351**, 107-14.
- Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschutter, A. et Beisiegel, U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. J. Lipid Res., **37**, 1436-48.
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle.70 years later. Redox Rep., **6**, 229-34.
- Kozlov, A. V., Gille, L., Staniek, K. et Nohl, H. (1999). Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. Arch. Biochem. Biophys., **363**, 148-54.
- Krokan, H. E., Standal, R. et Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. Biochem. J., **325** (Pt 1), 1-16.
- Kroll, J. S., Langford, P. R., Wilks, K. E. et Keil, A. D. (1995). Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! Microbiology, **141** (Pt 9), 2271-9.
- Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. et Gladyshev, V. N. (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **99**, 4245-50.
- Kumar, R. A., Koc, A., Cerny, R. L. et Gladyshev, V. N. (2002). Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila methionine-R*-sulfoxide reductase. J. Biol. Chem., **277**, 37527-35.
- Kuschel, L., Hansel, A., Schonherr, R., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T. et Heinemann, S. H. (1999). Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). FEBS. Lett., **456**, 17-21.
- L**aurant, T. C., Moore, E. C. et Reichard, P. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. J. Biol. Chem., **239**, 3436-44.
- Lawrence, D. A. et Loskutoff, D. J. (1986). Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. Biochemistry, **25**, 6351-5.

Bibliographie

- Lee, H. J., Basran, J. et Scrutton, N. S.** (1998). Electron transfer from flavin to iron in the *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin reductase-rubredoxin electron transfer complex. Biochemistry, **37**, 15513-22.
- Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K. S., Kim, H. J., Kim, K. et Chae, H. Z.** (2001). Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. J. Biol. Chem., **276**, 29826-32.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. et Rhee, S. G.** (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. J. Biol. Chem., **273**, 15366-72.
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S. et Stadtman, E. R.** (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **93**, 15036-40.
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L. et Stadtman, E. R.** (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mech. Ageing Dev., **107**, 323-32.
- Levine, R. L., Moskovitz, J. et Stadtman, E. R.** (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. IUBMB. Life., **50**, 301-7.
- Li, K., Pasternak, C. et Klug, G.** (2003). Expression of the *trxa* gene for thioredoxin 1 in *Rhodobacter sphaeroides* during oxidative stress. Arch. Microbiol., **180**, 484-9.
- Li, H., Xia, N., Brausch, I., Yao, Y. et Forstermann, U.** (2004). Flavonoids from *artichoke* (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. J. Pharmacol. Exp. Ther., **310**, 926-32.
- Lin, T. Y.** (1999). Gly33Asp mutant thioredoxin primarily affects the kinetics of reaction with thioredoxin reductase. Probing the structure of the mutant protein. Biochemistry, **38**, 15508-13.
- Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R. A., Santos, C. X., Yamada, A. T. et Augusto, O.** (2001). Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. Free Radic. Biol. Med., **30**, 1234-42.
- Lindau-Shepard, B. A. et Shaffer, J. B.** (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage. Free Radic. Biol. Med., **15**, 581-8.
- Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M. et Ding, J. P.** (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. Ion Channels, **4**, 261-301.
- Loewen, P. C., Switala, J. et Triggs-Raine, B. L.** (1985). Catalases HPI and HP II in *Escherichia coli* are induced independently. Arch. Biochem. Biophys., **243**, 144-9.
- Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D. et Niviere, V.** (2000). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. J. Biol. Chem., **275**, 115-21.
- Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H. et Matthews, B. W.** (2000). Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. Biochemistry, **39**, 13307-13312.
- Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. et Matthews, B. W.** (2002). The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. Nat. Struct. Biol., **9**, 348-52.
- Maier, C. M. et Chan, P. H.** (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. Neuroscientist, **8**, 323-34.

- Maiorino, M., Gregolin, C. et Ursini, F.** (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol., **186**, 448-57.
- Maiorino, M., Zamburlini, A., Roveri, A. et Ursini, F.** (1995). Copper-induced lipid peroxidation in liposomes, micelles, and LDL: which is the role of vitamin E? Free Radic. Biol. Med., **18**, 67-74.
- Mallery, S. R., Lantry, L. E., Laufman, H. B., Stephens, R. E. et Brierley, G. P.** (1993). Modulation of human microvascular endothelial cell bioenergetic status and glutathione levels during proliferative and differentiated growth. J. Cell Biochem., **53**, 360-72.
- Mann, T. et Keilin, D.** (1939). Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci., **126**, 303.
- Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L. et Jialal, I.** (1999). Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. Free Radic. Biol. Med., **27**, 1114-21.
- Martin, M. E., Byers, B. R., Olson, M. O., Salin, M. L., Arceneaux, J. E. et Tolbert, C.** (1986). A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. J. Biol. Chem., **261**, 9361-7.
- Marx, J.** (2002). Immunology. Antibodies kill by producing ozone. Science, **298**, 1319.
- Maskos, Z., Rush, J. D. et Koppenol, W. H.** (1992). The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan. Arch. Biochem. Biophys., **296**, 521-9.
- Maskos, Z., Rush, J. D. et Koppenol, W. H.** (1992). The hydroxylation of tryptophan. Arch. Biochem. Biophys., **296**, 514-20.
- Matsugo, S., Konishi, T., Matsuo, D., Tritschler, H. J. et Packer, L.** (1996). Reevaluation of superoxide scavenging activity of dihydrolipoic acid and its analogues by chemiluminescent method using 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo-[1,2-a]pyrazine-3-one (MCLA) as a superoxide probe. Biochem. Biophys. Res. Commun., **227**, 216-20.
- McCord, J. M. et Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J. Biol. Chem., **244**, 6049-55.
- Mehlen, P., Preville, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R. et Arrigo, A. P.** (1995). Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. J. Immunol., **154**, 363-74.
- Merényi, G. et Lind, J.** (1998). Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO-) system. Chem. Res. Toxicol., **11**, 243-6.
- Messner, K. R. et Imlay, J. A.** (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **274**, 10119-28.
- Messner, K. R. et Imlay, J. A.** (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. J. Biol. Chem., **277**, 42563-71.
- Michaelis, M. L., Bigelow, D. J., Schoneich, C., Williams, T. D., Ramonda, L., Yin, D., Huhmer, A. F., Yao, Y., Gao, J. et Squier, T. C.** (1996). Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain. Life Sci., **59**, 405-12.

Bibliographie

- Miller, B. L., Kuczera, K. et Schoneich, C.** (1998). One-electron photooxidation in 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.
- Miranda-Vizueté, A., Damdimopoulos, A. E., Gustafsson, J. et Spyrou, G.** (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. J. Biol. Chem., **272**, 30841-7.
- Misra, H. P. et Fridovich, I.** (1971). The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. J. Biol. Chem., **246**, 6886-90.
- Misra, H. P. et Fridovich, I.** (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J. Biol. Chem., **247**, 6960-2.
- Mohsenin, V. et Gee, J. L.** (1989). Oxidation of alpha 1-protease inhibitor: role of lipid peroxidation products. J. Appl. Physiol., **66**, 2211-5.
- Moini, H., Packer, L. et Saris, N. E.** (2002). Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxicol. Appl. Pharmacol., **182**, 84-90.
- Montenegro, M. A., Nazareno, M. A., Durantini, E. N. et Borsarelli, C. D.** (2002). Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. Photochem. Photobiol., **75**, 353-61.
- Moskovitz, J., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jursky, F., Weissbach, H. et Brot, N.** (1996). Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **93**, 3205-8.
- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. et Stadtman, E. R.** (1997). The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **94**, 9585-9.
- Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M. et Stadtman, E. R.** (1998). Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **95**, 14071-5.
- Moskovitz, J., Poston, J. M., Berlett, B. S., Nosworthy, N. J., Szczepanowski, R. et Stadtman, E. R.** (2000). Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. J. Biol. Chem., **275**, 14167-72.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S. et Stadtman, E. R.** (2001). Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **98**, 12920-5.
- Moskovitz, J., Singh, V. K., Requena, J., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K. et Stadtman, E. R.** (2002). Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity. Biochem. Biophys. Res. Commun., **290**, 62-5.
- Moura, I., Tavares, P., Moura, J. J., Ravi, N., Huynh, B. H., Liu, M. Y. et LeGall, J.** (1990). Purification and characterization of desulfoferredoxin. A novel protein from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) and from *Desulfovibrio vulgaris* (strain Hildenborough) that contains a distorted rubredoxin center and a mononuclear ferrous center. J. Biol. Chem., **265**, 21596-602.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. et Soave, C.** (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. Plant J., **38**, 940-53.

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

Neiens, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2004). Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. J. Biol. Chem., **279**, 42462-8.

Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G. et Stadtman, E. R. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. J. Biol. Chem., **271**, 15315-21.

Nieva, J. et Wentworth, P., Jr. (2004). The antibody-catalyzed water oxidation pathway--a new chemical arm to immune defense? Trends Biochem. Sci., **29**, 274-8.

Niki, E. (1987). Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. Br. J. Cancer Suppl., **8**, 153-7.

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

Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M. et Flohe, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. Biol. Chem., **378**, 827-36.

Noguchi, N., Nakada, A., Itoh, Y., Watanabe, A. et Niki, E. (2002). Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite. Arch. Biochem. Biophys., **397**, 440-7.

Oakhill, J. S., Joannou, C. L., Buchanan, S. K., Gorringer, A. R. et Evans, R. W. (2002). Expression and purification of functional recombinant meningococcal transferrin-binding protein A. Biochem. J., **364**, 613-6.

Oldreive, C., Zhao, K., Paganga, G., Halliwell, B. et Rice-Evans, C. (1998). Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds. Chem. Res. Toxicol., **11**, 1574-9.

Olivares-Corichi, I. M., Ceballos, G., Ortega-Camarillo, C., Guzman-Grenfell, A. M. et Hicks, J. J. (2005). Reactive oxygen species (ROS) induce chemical and structural changes on human insulin *in vitro*, including alterations in its immunoreactivity. Front. Biosci., **10**, 838-43.

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

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

Packer, J. E., Slater, T. F. et Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature, **278**, 737-8.

Packer, L., Rimbach, G. et Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. Free Radic. Biol. Med., **27**, 704-24.

Bibliographie

- Packer, L., Witt, E. H. et Tritschler, H. J.** (1995). alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic. Biol. Med., **19**, 227-50.
- Parker, R. S.** (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. Faseb. J., **10**, 542-51.
- Parsonage, D., Miller, H., Ross, R. P. et Claiborne, A.** (1993). Purification and analysis of streptococcal NADH peroxidase expressed in *Escherichia coli*. J Biol Chem, **268**, 3161-7.
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizueté, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A. et Spyrou, G.** (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. J. Biol. Chem., **275**, 16296-301.
- Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M. et Friguet B.** (2001). Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. Biochem J., **355**, 819-25.
- Pianzola, M. J., Soubes, M. et 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.
- Poole, L. B., Reynolds, C. M., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Ellis, H. R. et Li Calzi, M.** (2000). AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem., **267**, 6126-33.
- Poss, K. D. et Tonegawa, S.** (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **94**, 10925-30.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. et Beckwith, J.** (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. J. Biol. Chem., **272**, 15661-7.
- Pryor, W. A., Jin, X. et Squadrito, G. L.** (1994). One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **91**, 11173-7.
- R**abilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P. et Lunardi, J. (2002). Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for *in vivo* overoxidation of peroxiredoxins at their active site. J. Biol. Chem., **277**, 19396-401.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D. et Freeman, B. A.** (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., **266**, 22028-34.
- Raha, S., McEachern, G. E., Myint, A. T. et Robinson, B. H.** (2000). Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. Free Radic. Biol. Med., **29**, 170-80.
- Rahman, M. A., Moskovitz, J., Strassman, J., Weissbach, H. et Brot, N.** (1994). Physical map location of the peptide methionine sulfoxide reductase gene on the *Escherichia coli* chromosome. J. Bacteriol., **176**, 1548-9.
- Rajagopalan, P. T. et Pei, D.** (1998). Oxygen-mediated inactivation of peptide deformylase. J. Biol. Chem., **273**, 22305-10.

- Rapoport, S., Hartel, B. et Hausdorf, G.** (1984). Methionine sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase. Eur. J. Biochem., **139**, 573-6.
- Ratnasinghe, D., Tangrea, J. A., Andersen, M. R., Barrett, M. J., Virtamo, J., Taylor, P. R. et Albanes, D.** (2000). Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. Cancer Res., **60**, 6381-3.
- Reddy, V. Y., Desorchers, P. E., Pizzo, S. V., Gonias, S. L., Sahakian, J. A., Levine, R. L. et Weiss, S. J.** (1994). Oxidative dissociation of human alpha 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. J. Biol. Chem., **269**, 4683-91.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J. et Grune, T.** (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. Biochem. J., **335 (Pt 3)**, 637-42.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. et Zhang, L.** (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. Med. Res. Rev., **4**, 519-34.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Netto, L. E., Seo, M. S. et Stadtman, E. R.** (1999). A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. Biofactors, **10**, 207-9.
- Ribeiro, D. T., De Oliveira, R. C., Di Mascio, P. et Menck, C. F.** (1994). Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a single-stranded shuttle vector replicated in monkey cells. Free Radic. Res., **21**, 75-83.
- Rice-Evans, C. A. et Miller, N. J.** (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochem. Soc. Trans., **24**, 790-5.
- Rice-Evans, C.** (2001). Flavonoid antioxidants. Curr. Med. Chem., **8**, 797-807.
- Rodriguez, A. M., Carrico, P. M., Mazurkiewicz, J. E. et Melendez, J. A.** (2000). Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. Free Radic. Biol. Med., **29**, 801-13.
- Romao, C. V., Liu, M. Y., Le Gall, J., Gomes, C. M., Braga, V., Pacheco, I., Xavier, A. V. et Teixeira, M.** (1999). The superoxide dismutase activity of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. Eur. J. Biochem., **261**, 438-43.
- Rose, C., Devamanoharan, P. S. et Varma, S. D.** (1995). Dehydroascorbate reductase activity in bovine lens. Int. J. Vitam. Nutr. Res., **65**, 40-4.
- Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M. L., Joiner, M. L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Iverson, L., Wu, C. F. et Hoshi, T.** (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **99**, 2748-53.
- Russel, M. et Model, P.** (1986). The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins. J. Biol. Chem., **261**, 14997-5005.
- Sadanandom, A., Piffanelli, P., Knott, T., Robinson, C., Sharpe, A., Lydiate, D., Murphy, D. et Fairbairn, D. J.** (1996). Identification of a peptide methionine sulphoxide reductase gene in an oleosin promoter from *Brassica napus*. Plant J., **10**, 235-42.
- Sadanandom, A., Poghosyan, Z., Fairbairn, D. J. et Murphy, D. J.** (2000). Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. Plant Physiol., **123**, 255-64.

Bibliographie

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Salmeen, A., Andersen, JN., Myers, MP., Meng, TC., Hinks, JA., Tonks, NK. et Barford, D.** (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. Nature, **423**, 769-773.
- Sato, E., Koyama, S., Camhi, S. L., Nelson, D. K. et Robbins, R. A.** (2001). Reactive oxygen and nitrogen metabolites modulate fibronectin-induced fibroblast migration *in vitro*. Free Radic Biol Med, **30**, 22-9.
- Sayed, A. A. et Williams, D. L.** (2004). Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem, **279**, 26159-66.
- Schoneich, C., Aced, A. et D., A. 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.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H. et Rhee, S. G.** (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J. Biol. Chem., **275**, 20346-54.
- Shao, B., Bergt, C., Fu, X., Green, P., Voss, J. C., Oda, M. N., Oram, J. F. et Heinecke, J. W.** (2004). Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. J. Biol. Chem., **280**, 5983-93.
- Shen, Z., Mitra, S. N., Wu, W., Chen, Y., Yang, Y., Qin, J. et Hazen, S. L.** (2001). Eosinophil peroxidase catalyzes bromination of free nucleosides and double-stranded DNA. Biochemistry, **40**, 2041-51.
- Sies, H.** (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic. Biol. Med., **27**, 916-21.
- Sigalov, A. B. et 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.
- Silva, G., Oliveira, S., Gomes, C. M., Pacheco, I., Liu, M. Y., Xavier, A. V., Teixeira, M., Legall, J. et Rodrigues-pousada, C.** (1999). *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin. A novel superoxide dismutase integrated in a putative oxygen sensory operon of an anaerobe. Eur J Biochem, **259**, 235-43.
- Simon, D. I., Stamler, J. S., Jaraki, O., Keaney, J. F., Osborne, J. A., Francis, S. A., Singel, D. J. et Loscalzo, J.** (1993). Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. Arterioscler. Thromb., **13**, 791-9.
- Singh, V. K., Jayaswal, R. K. et Wilkinson, B. J.** (2001a). Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. FEMS. Microbiol. Lett., **199**, 79-84.
- Singh, V. K., Moskovitz, J., Wilkinson, B. J. et Jayaswal, R. K.** (2001b). Molecular characterization of a chromosomal locus in *Staphylococcus aureus* that contributes to oxidative defence and is highly induced by the cell-wall-active antibiotic oxacillin. Microbiology, **147**, 3037-45.
- Singh, V. K. et Moskovitz, J.** (2003). Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. Microbiology, **149**, 2739-47.

- Skaar, E. P., Tobiasson, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. et Seifert, H. S.** (2002). The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **99**, 10108-13.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. et Nathan, C.** (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **98**, 9901-6.
- Steinbeck, M. J., Khan, A. U. et Karnovsky, M. J.** (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. J. Biol. Chem., **267**, 13425-33.
- Steinman, H. M., Weinstein, L. et Brenowitz, M.** (1994). The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. J. Biol. Chem., **269**, 28629-34.
- Stief, T. W., Aab, A. et Heimbürger, N.** (1988). Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor. Thromb. Res., **49**, 581-9.
- Stief, T. W. et Heimbürger, N.** (1988). Inactivation of serine proteinase inhibitors (serpins) in human plasma by reactive oxidants. Biol. Chem. Hoppe Seyler, **369**, 1337-42.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. et Ames, B. N.** (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science, **235**, 1043-6.
- Stone, J. R. et Collins, T.** (2002). The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. Endothelium, **9**, 231-8.
- Sun, H., Gao, J., Ferrington, D. A., Biesiada, H., Williams, T. D. et Squier, T. C.** (1999). Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. Biochemistry, **38**, 105-12.
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. et Finkel, T.** (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. Science, **270**, 296-9.
- Sundby, C., Harndahl, U., Gustavsson, N., Ahrman, E. and Murphy, DJ.** (2005). Conserved methionines in chloroplasts. Biochim Biophys Acta, **1703**, 191-202.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J. et Sevanian, A.** (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic. Biol. Med., **22**, 269-85.
- Tabor, S. et Richardson, C. C.** (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **84**, 4767-4771
- Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N. G., Wehr, N., Moss, J. et Levine, R. L.** (2000). Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. J. Biol. Chem., **275**, 27258-65.
- Taha, M.K., So, M., Seifert, H.S., Billyard, E. et Marchal, C.** (1988). Pilin expression in *Neisseria gonorrhoeae* is under both positive and negative transcriptional control. EMBO J., **7**, 4367-78.
- Taha, M. K. et Marchal, C.** (1990). Conservation of *Neisseria gonorrhoeae* pilus expression regulatory genes pilA and pilB in the genus *Neisseria*. Infect. Immun., **58**, 4145-8.

Bibliographie

- Taha, M.K., Dupuy, B., Saurin, W., So, M. et Marchal, C.** (1991). Control of pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae* as an original system in the family of two-component regulators. Mol. Microbiol., **5**, 137-48.
- Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S. et Hart, P. J.** (2003). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. J. Bacteriol., **185**, 4119-26.
- Teh, L. C., Murphy, L. J., Huq, N. L., Surus, A. S., Friesen, H. G., Lazarus, L. et Chapman, G. E.** (1987). Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin. Effects on receptor binding and biological activities. J. Biol. Chem., **262**, 6472-7.
- Tête-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. et Aubry, A.** (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. Structure Fold. Des., **8**, 1167-78.
- Thom, S. R. et Elbuken, M. E.** (1991). Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. Free Radic. Biol. Med., **10**, 413-26.
- Thomas, E. L., Bozeman, P. M., Jefferson, M. M. et King, C. C.** (1995). Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. J. Biol. Chem., **270**, 2906-13.
- Thureau, A., Olry, A., Coudeville, N., Azza, S., Boschi-Muller, S., Branlant, G. et Cung, M. T.** (2004). (1)H, (13)C and (15)N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*. J. Biomol. NMR., **30**, 223-4.
- Tien, M., Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B. et Stadtman, E. R.** (1999). Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **96**, 7809-14.
- Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S. S. et Levi, R.** (1992). A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. J. Pharmacol. Exp. Ther., **262**, 343-7.
- Truscott, R. J. et Augusteyn, R. C.** (1977). Changes in human lens proteins during nuclear cataract formation. Exp. Eye Res., **24**, 159-70.
- Uc, A., Kooy, N. W., Conklin, J. L. et Bishop, W. P.** (2003). Peroxynitrite inhibits epidermal growth factor receptor signaling in Caco-2 cells. Dig. Dis. Sci., **48**, 2353-9.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. et Flohe, L.** (1995). Diversity of glutathione peroxidases. Methods Enzymol., **252**, 38-53.
- Van den Bosch, H., Schutgens, R. B., Wanders, R. J. et Tager, J. M.** (1992). Biochemistry of peroxisomes. Annu. Rev. Biochem., **61**, 157-97.
- Van der Geer, P., Hunter, T. et Lindberg, R. A.** (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu. Rev. Cell. Biol., **10**, 251-337.
- Van der Vliet, A., O'Neill, C. A., Halliwell, B., Cross, C. E. et Kaur, H.** (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. FEBS. Lett., **339**, 89-92.

- VanBogelen, R. A., Acton, M. A. et Neidhardt, F. C.** (1987). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. Genes Dev., **1**, 525-31.
- Vargas, F., Martinez Volkmar, I., Sequera, J., Mendez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velasquez, M. et 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.
- Verhagen, M. F., Voorhorst, W. G., Kolkman, J. A., Wolbert, R. B. et Hagen, W. R.** (1993). On the two iron centers of desulfoferrodoxin. FEBS. Lett., **336**, 13-8.
- Vouquier, S., Mary, J. et Friguet, B.** (2003). Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA): evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells. Biochem. J., **373**, 531-7.
- Wagener, F. A., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Verhofstad, A., Abraham, N. G., Adema, G., van Kooyk, Y., de Witte, T. et Figdor, C. G.** (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood, **98**, 1802-11.
- Wagner, C. R., Hamana, K. et Elgin, S. C.** (1992). A high-mobility-group protein and its cDNAs from *Drosophila melanogaster*. Mol. Cell. Biol., **12**, 1915-23.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J. et Selkoe, D. J.** (2002). Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. Biochem. Soc. Trans., **30**, 552-7.
- Wardman, P. et von Sonntag, C.** (1995). Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. Methods Enzymol., **251**, 31-45.
- Wardman, P. et Candeias, L. P.** (1996). Fenton chemistry: an introduction. Radiat. Res., **145**, 523-31.
- Weisiger, R. A. et Fridovich, I.** (1973). Superoxide dismutase. Organelle specificity. J. Biol. Chem., **248**, 3582-92.
- Weisiger, R. A. et Fridovich, I.** (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J. Biol. Chem., **248**, 4793-6.
- Weiss, S. J., Test, S. T., Eckmann, C. M., Roos, D. et Regiani, S.** (1986). Brominating oxidants generated by human eosinophils. Science, **234**, 200-3.
- Wentworth, P., Jr., Wentworth, A. D., Zhu, X., Wilson, I. A., Janda, K. D., Eschenmoser, A. et Lerner, R. A.** (2003). Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **100**, 1490-3.
- Whitelegge, J. P., Penn, B., To, T., Johnson, J., Waring, A., Sherman, M., Stevens, R. L., Fluharty, C. B., Faull, K. F. et Fluharty, A. L.** (2000). Methionine oxidation within the cerebroside-sulfate activator protein (CSAct or Saposin B). Protein Sci., **9**, 1618-30.
- Wizemann, T. M., Moskovitz, J., Pearce, B. J., Cundell, D., Arvidson, C. G., So, M., Weissbach, H., Brot, N. et Masure, H. R.** (1996). Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **93**, 7985-90.
- Wong, B. S., Wang, H., Brown, D. R. et Jones, I. M.** (1999). Selective oxidation of methionine residues in prion proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun., **259**, 352-5.
- Wong, P. S. et Travis, J.** (1980). Isolation and properties of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun., **96**, 1449-54.

Bibliographie

- Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K. et Rhee, S. G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. Science, **300**, 653-6.
- Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T. S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S. et Rhee, S. G. (2004). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. J. Biol. Chem.,
- Wu, C. H., Tsai-Wu, J. J., Huang, Y. T., Lin, C. Y., Liou, G. G. et Lee, F. J. (1998). Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. FEBS. Lett., **439**, 192-6.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. et Branlant, G. (2005). The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. J. Biol. Chem., **280**, 12344-50.
- Y**amin, G., Uversky, V. N. et Fink, A. L. (2003). Nitration inhibits fibrillation of human alpha-synuclein *in vitro* by formation of soluble oligomers. FEBS. Lett., **542**, 147-52.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. et Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu. Rev. Nutr., **21**, 381-406.
- Yeh, A. P., Hu, Y., Jenney, F. E., Jr., Adams, M. W. et Rees, D. C. (2000). Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. Biochemistry, **39**, 2499-508.
- Yost, F. J., Jr. et Fridovich, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **248**, 4905-8.
- Youn, H. D., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, Y. C. et Kang, S. O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* Biochem. J., **318 (Pt 3)**, 889-96.
- Yu, H. et Schreiber, S. L. (1995a). Cloning, Zn²⁺ binding, and structural characterization of the guanine nucleotide exchange factor human Mss4. Biochemistry, **34**, 9103-10.
- Yu, H. et Schreiber, S. L. (1995b). Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface. Nature, **376**, 788-91.
- Z**hang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. et Davies, K. J. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. J. Biol. Chem., **265**, 16330-6.
- Zhang, Y. Y., Xu, A. M., Nomen, M., Walsh, M., Keaney, J. F., Jr. et Loscalzo, J. (1996). Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity. J. Biol. Chem., **271**, 14271-9.
- Zheng, M. et Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. Biochem. Pharmacol., **59**, 1-6
- Zhu, Z., Dumas, J. J., Lietzke, S. E. et Lambright, D. G. (2001). A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release. Biochemistry, **40**, 3027-36.

L'oxydation des résidus méthionine (Met) en méthionine sulfoxyde (MetSO) constitue une modification post-traductionnelle majeure dans les protéines, qui peut conduire à une dérégulation de leur fonction voire à une perte totale de leur activité. Il est donc indispensable pour tout organisme d'avoir un mécanisme capable de réverser cette oxydation. Ceci est assuré par les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) A et B. Les Msr sont décrites être impliquées dans la résistance des cellules au stress oxydant, et dans la pathogénicité de certaines bactéries type *Neisseria*.

Mon projet a concerné, dans un premier temps, la caractérisation de la fonction de deux des trois domaines de la protéine PilB de *N. meningitidis* : le domaine central, apparenté aux MsrA, et le domaine C-terminal, qui était de fonction inconnue lorsque ce projet a démarré en 2000. Les résultats montrent que le domaine central porte une activité MsrA dont le mécanisme procède en trois étapes avec implication de la chimie de l'acide sulfénique et réduction du pont disulfure Cys51-Cys198 par la thiorédoxine. La partie C-terminale, quant à elle porte une activité MsrB dont le mécanisme est identique au niveau de la chimie à celui des MsrA. Ceci montre la généralité de l'implication de la chimie de l'acide sulfénique dans les mécanismes de réduction des sulfoxydes par les thiols. Au niveau spécificité structurale, la MsrA et la MsrB de *N. meningitidis* réduisent respectivement l'isomère *S* et *R* de la fonction sulfoxyde de la MetSO avec une meilleure efficacité catalytique pour les MetSO incluses dans une protéine.

La seconde partie de mon projet a été consacrée à l'étude des MsrB au niveau catalyse et spécificité structurale. La caractérisation cinétique des étapes limitante et non-limitantes montre que 1) la vitesse de l'étape réductase conduisant à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique et de la Met est rapide, 2) la vitesse de formation du pont disulfure intramoléculaire est limitée par celle de l'étape réductase et; 3) l'étape cinétiquement limitante est associée à la réduction du pont disulfure par la Trx, plus particulièrement au niveau du relargage de la Trx oxydée après l'échange de pont disulfure. Au niveau catalyse dans l'étape réductase, les résultats montrent que la Cys117 catalytique est activée lors de la formation du complexe Michaélien, et que le catalyseur acide/base qui intervient notamment pour augmenter le caractère électrophile du soufre du sulfoxyde est probablement l'His103. Au niveau reconnaissance entre Msr et Trx, les études cinétiques montrent qu'il existe une reconnaissance spécifique entre la MsrB oxydée et la Trx réduite, le mécanisme de recyclage procédant *via* l'attaque de la Cys32 de la Trx sur la Cys117 du pont disulfure Cys117-Cys63 de la MsrB. Enfin, nous avons montré que 50 % des MsrB, dont celle d'*E. coli*, fixe très fortement un atome de zinc au niveau de deux motifs CXXC. Le site à métal et le site actif ne semblent pas structurellement indépendants.

Mots-clés : Méthionine sulfoxyde réductase B, acide sulfénique, étape limitante, site à métal, thiorédoxine, spécificité structurale.