



Enzymologie du mécanisme de régulation des Peroxyrédoxines par suroxydation au cours de la signalisation cellulaire redox

Alexandre Kriznik

► To cite this version:

Alexandre Kriznik. Enzymologie du mécanisme de régulation des Peroxyrédoxines par suroxydation au cours de la signalisation cellulaire redox. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0083 . tel-02962966

HAL Id: tel-02962966

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02962966>

Submitted on 9 Oct 2020

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>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Alexandre KRIZNIK

**Enzymologie du mécanisme de régulation des Peroxyrédoxines par
suroxydation au cours de la signalisation cellulaire redox**

Le 22 juin 2020

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Marie Thérèse GUIDICI ORTICONI	Directeur de recherche, CNRS, Marseille
Mme Corinne LIONNE	Directeur de recherche, CNRS, Montpellier

Examineurs :

M. Nicolas ROUHIER	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
M. Bastien DOUMECHÉ	Maitre de conférences, HDR, Univ. de Lyon

Invité :

Mme Catherine CORBIER	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
-----------------------	---

Directeur de thèse :

Mme Sophie RAHUEL-CLERMONT	Directeur de recherche, CNRS, Nancy
----------------------------	-------------------------------------

*« Tremblez politiques et décideurs, devant le pouvoir sombre de la **viscosité** des sociétés humaines, qui annihilera toute votre énergie et la dissipera en frottements, en débats, en disputes, jusqu'à ce que vous ne reconnaissiez rien de votre plan si bien conçu. »*

Cédric Villani, Mathématicien et Député, *Immersion de la Science au Parlement*,
Flammarion, 2019.

Je remercie le Pr. Jean Yves Jouzeau, directeur du laboratoire IMoPA de m'avoir accordé la possibilité de suivre une formation doctorale adossée à mes fonctions d'Ingénieur au sein de l'unité.

Je remercie les Pr. Kira Weissman et Sandrine Boschi-Muller, responsables de l'équipe Enzymologie Moléculaire.

Je remercie le Dr. Sophie Rahuel Clermont, ma directrice de thèse et responsable hiérarchique au sein de la structure pour m'avoir confié ce projet de thèse, et pour m'avoir formé en tant qu'étudiant chercheur. Merci pour ton implication constante, ta patience, tes conseils avisés, et pour toutes les valeurs que tu m'as transmises pendant ma formation : rigueur, exigence, éthique scientifique, respect des connaissances et de ses pairs.

Je remercie les membres du jury pour avoir évalué mon travail, dans des conditions inhabituelles...2020 restera dans nos mémoires...

Un grand merci à nos collaborateurs, le Dr. Michel Toledano, directeur du laboratoire Stress Oxydant et Cancer, I2BS au CEA Saclay, et le Dr. Marouane Libiad, pour leur apport de haute valeur au projet. Tu vois Marouane, on a enfin publié ensemble !

Merci à Hélène Le Cordier pour ton soutien technique appuyé, j'ai toujours eu totale confiance dans la valeur de tes résultats. Merci au Dr. Hortense Mazon pour son expertise et ses analyses en spectrométrie de masse.

Merci à mes amis doctorants devenus docteurs et ayant embrassé des fonctions dans la recherche ou des voies connexes : Fabrice Neiers, Alexandre Olry, Xavier Roussel, Samia Boukhenouna, Antoine Bersweiler, Jean-Christophe Lec, Florent Canonico : merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis à travers vous et vos projets, d'acquérir de solides compétences scientifiques et de gestion de projet, compétences qui m'auront été essentielles pour mener à bien mon doctorat.

Je remercie le Pr. Pascal Reboul, avec qui nous collaborons depuis 4 ans dans une aventure parallèle, en lien avec l'innovation. Un moment formidable de ma carrière couplé d'une relation chaleureuse et bienveillante.

Au Dr. Marc Quinternet mon colocataire de bureau pour ces grands moments de partage, et d'échanges scientifiques ou autres, liés à l'effet charge mentale du Doc : "Marty ?"

A tous mes amis et collègues du laboratoire IMoPA et de l'UMS IBSLor, un grand merci pour votre soutien.

Au Dr. Jean Michel Girardet, mon compère, mon exemple, un ami, désintéressé et prévenant.

Une dédicace à Alexandra Elbakyan, pour son formidable outil permettant un accès sans barrières au savoir scientifique.

Et bien sûr, à ma famille : mes parents, mon frère Stéphane soutien moral de la première heure, mes beaux-parents et leurs petites attentions toujours bienvenues, ma petite femme Kahina : merci pour ton soutien sans faille, et nos loulous (notre plus belle manip n'est-ce pas ?) Arylès, Mélina et Naël qui ont dû supporter quelques absences.

Bonne lecture !

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-Cys-Prx	peroxyrédoxine à 2 Cys typique
ε	coefficient d'extinction molaire
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
C _{Hyp1%}	Index de suroxydation
C _P	Cys peroxydatique des 2-Cys-Prx typiques
C _R	Cys de recyclage des 2-Cys-Prx typiques
Cys-Gpx	glutathion-peroxydase à Cys catalytique
DO _{Xnm}	absorbance à "X" nm
DTT	dithiothrétol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERO	espèce réactive de l'oxygène
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FF	forme Fully Folded des Prx : complètement structurée
FPLC	chromatographie liquide moyenne pression
GR	glutathion réductase
Grx	glutarédoxine
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
HPLC	chromatographie liquide haute performance
<i>hPrx1</i>	peroxyrédoxine 1 humaine
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
k_{SOH}	constante de vitesse de formation de l'acide sulfénique ou sulfénate
k_{SO2}	constante de vitesse de suroxydation ou sulfinylation ou formation de l'acide sulfinique
K_M	constante de Michaelis
LB	milieu de culture Luria Bertani
LU	forme Locally Unfolded des Prx : localement déstructurée
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NOX	NADPH oxydase
PAGE	électrophorèse en gel polyacrylamide
PM	poids moléculaire
Prx	peroxyrédoxine
SDS	sodium dodécyl sulfate
SOD	superoxyde dismutase
SOH	fonction acide sulfénique
SO ₂ H	fonction acide sulfinique

SO ₃ H	fonction acide sulfonique
Srx	sulfirédoxine
TFA	acide trifluoroacétique
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trx	thiorédoxine
TR	thiorédoxine reductase
Tsa1	thiol-specific antioxidant 1 ou 2-Cys-Prx typique ou Prx1 majeure de <i>S. cerevisiae</i>
Tsa1 ^{AA}	Tsa1 mutant A177S A178D
Tsa1 ^{C171A}	Tsa1 mutant C171A (cystéine de recyclage)
Tsa1 ^{CAA}	Tsa1 mutant C171A A177S A178D
Tsa1 ^W	Tsa1 mutant W161F
Tsa1 ^{WC}	Tsa1 mutant W161F C171A
Tsa1 ^{YF}	Tsa1 mutant Y190G F191G
Tsa1 ^{FF}	Tsa1 sous forme FF
Tsa1 ^{LU}	Tsa1 sous forme LU
Tsa1 ^{red}	Tsa1 wt réduite SH
Tsa1 ^{SS}	Tsa1 wt oxydée S-S
Tsa1 ^{SO2}	Tsa1 wt suroxydée SO ₂

Les abréviations internationales utilisées pour désigner les acides aminés (nomenclature à 3 lettres ou à une lettre) ne sont pas incluses dans cette liste

Table des matières

INTRODUCTION	4
I. LES PEROXYDES, DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE, IMPLIQUEES DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE.....	7
1. <i>Des molécules réactives à double tranchant.....</i>	7
A. Les différentes ERO	7
B. Réactivité chimique relative des différentes ERO	8
C. Toxicité du peroxyde d'hydrogène.....	9
D. Pourquoi H ₂ O ₂ peut porter un rôle de messenger	10
2. <i>Origine de H₂O₂ et des autres peroxydes.....</i>	11
A. Le radical anion superoxyde	11
B. Le peroxyde d'hydrogène	12
C. Les peroxydes lipidiques.....	15
D. Autres peroxydes :	16
a) Le peroxydinitrite	16
b) Le peroxymonocarbonate	17
3. <i>Les enzymes impliquées dans le catabolisme des peroxydes.....</i>	18
A. Les peroxydases à hème : catalases et cytochrome c peroxydase	18
B. Les Glutathion peroxydases.....	19
4. <i>La chimie des thiols à la base de la signalisation cellulaire redox.....</i>	21
A. L'acide sulfénique	21
B. Le pont disulfure.....	22
C. Les formes acide sulfinique et acide sulfonique.....	23
a) Le système Thiorédoxine/Thiorédoxine réductase	25
b) Le système Glutathion/Glutarédoxine	27
II. LES PEROXYREDOXINES.....	28
1. <i>Historique de la découverte des Prxs.....</i>	28
2. <i>Classification.....</i>	29
A. Vue d'ensemble du mécanisme catalytique	29
B. Nouvelle classification.....	31
3. <i>Structure des Prx</i>	33
A. Repliement	33
B. L'unité active : le dimère	35
C. Architecture oligomérique	36
4. <i>Mécanisme catalytique des Prx.....</i>	37
A. Une réactivité exceptionnelle de la Cystéine peroxydasique C _P	37
B. Le cycle catalytique peroxydase des Prxs de type Prx1	39
III. LA SUROXYDATION DES PRX: PERTE OU GAIN DE FONCTION ?	41
1. <i>Le phénomène de suroxydation : une modification post-traductionnelle.....</i>	41
A. Découverte.....	41
B. La suroxydation est dépendante de motifs structuraux conservés	43
C. Une sensibilité à la suroxydation intra et inter espèces variable.	46
D. La suroxydation est réversible	48
E. Régulation des Prx par suroxydation.....	51
2. <i>Importance biologique de la suroxydation des Prxs.....</i>	51
A. Fonction dans la signalisation redox	52
a) L'hypothèse du "floodgate"	52
b) Rôle de la régulation de la signalisation redox médiée par H ₂ O ₂	52
c) Participation des Prx suroxydées à des complexes de signalisation.....	54
B. Régulation de l'état redox des systèmes cellulaires réducteurs.....	55
C. Participation à la maintenance des rythmes circadiens.....	56
D. L'activité chaperon des Prxs suroxydées	58
3. <i>Le modèle mécanistique de la suroxydation.....</i>	63
A. Le modèle.....	63
B. Approches expérimentales de la sensibilité à la suroxydation.....	65
OBJECTIFS.....	67
RÉSULTATS	69

I.	PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DE Tsa1 SOUS DIFFERENTS ETATS REDOX	70
1.	<i>Spectre de fluorescence intrinsèque des formes redox de Tsa1</i>	70
2.	<i>Spectre CD des formes redox de Tsa1</i>	72
II.	CARACTERISATION DES DIFFERENTES ETAPES DU MECANISME CATALYTIQUE DE Tsa1 PAR DES METHODES DE CINETIQUE RAPIDE.....	73
1.	<i>Cinétique réactionnelle de Tsa1 avec H₂O₂ à l'état préstationnaire suivie par fluorescence</i>	73
2.	<i>Attribution de la phase 1 dans le cycle catalytique</i>	75
3.	<i>Attribution des phases 2 et 3</i>	77
4.	<i>La phase 2 est associée à la transition conformationnelle FF/LU</i>	80
A.	Cinétiques en présence de viscogène	81
B.	Suivi de la cinétique réactionnelle par dichroïsme circulaire.....	83
5.	<i>Etude de la Prx1 humaine</i>	85
III.	CORRELATION ENTRE SENSIBILITE A LA SUROXYDATION ET TRANSITION FF/LU.....	87
1.	<i>Design de mutants de Tsa1 de sensibilité variable à la suroxydation</i>	87
A.	Choix des mutations.....	87
B.	Détermination de l'activité peroxydase des variants de Tsa1.....	88
C.	Caractérisation des variants de Tsa1 par CD.....	89
2.	<i>Classification des Prx selon leur sensibilité à la suroxydation : paramètre C_{Hyp1%}</i>	90
A.	Principe de la méthode	90
B.	Mise au point pour la Tsa1	92
C.	Quantification de la sensibilité à la suroxydation de Tsa1, de ses mutants et de hPrx1.....	93
3.	<i>Caractérisation cinétique du mécanisme catalytique des Tsa1 mutées</i>	95
IV.	EXISTE-T-IL UNE COMPETITION DIRECTE ENTRE SUROXYDATION ET TRANSITION FF/LU ?	98
1.	<i>Mesure directe de la cinétique de suroxydation de Tsa1 à l'état pré-stationnaire</i>	98
A.	La cinétique d'oxydation du mutant Tsa1 ^{C171A} révèle une phase correspondant à la suroxydation	98
B.	Détermination de la constante de vitesse k ₄ des mutants Tsa1	100
2.	<i>Utilisation de peroxydes organiques</i>	101
A.	Quantification de la sensibilité à la suroxydation de Tsa1 par les peroxydes organiques.....	102
B.	Cinétiques à l'état préstationnaire.....	103
C.	Détermination de la constante de vitesse de suroxydation k ₄	105
D.	Cinétiques à fortes concentrations en substrat	106
3.	<i>Analyse des cinétiques par ajustement global</i>	109
V.	COUPLAGE DU MECANISME CATALYTIQUE ET DE LA SENSIBILITE A LA SUROXYDATION	112
VI.	ETUDE <i>IN VIVO</i> CHEZ LA LEVURE DE LA SENSIBILITE RELATIVE A LA SUROXYDATION DES PRXS.....	116
	DISCUSSION-CONCLUSION	119
	MATÉRIEL & MÉTHODES	127
I.	MATERIEL.....	128
1.	<i>Les souches bactériennes d'Escherichia coli</i>	128
2.	<i>Les souches de la levure Saccharomyces cerevisiae</i>	128
3.	<i>Plasmides d'expression des protéines recombinantes</i>	129
4.	<i>Culture des bactéries et levures</i>	130
5.	<i>Les tampons et solutions d'usage courant</i>	131
6.	<i>Les oligonucléotides de clonage ou mutagenèse</i>	132
II.	METHODES.....	133
1.	<i>Mutagenèse dirigée par PCR</i>	133
2.	<i>Production et purification des enzymes étudiées</i>	133
A.	Production et purification de Tsa1 recombinante portant une étiquette 6xHis	133
a)	Extraction	134
b)	Chromatographie d'affinité sur résine à métal immobilisé Ni ²⁺ (IMAC).....	134
c)	Concentration et conservation.....	134
B.	Production et purification de hPrx1 recombinante portant une étiquette 6xHis.....	135
a)	Extraction	135
b)	Chromatographie d'affinité sur résine à métal immobilisé Ni ²⁺ (IMAC).....	135
c)	Concentration et conservation.....	136
C.	Production et purification de la Trx1 d'E. coli.....	136
a)	Extraction	136
b)	Précipitation au sulfate d'ammonium	136
c)	Filtration sur gel (ACA54).....	136
d)	Chromatographie échangeuse d'anions	137
e)	Concentration et conservation.....	137
3.	<i>Caractérisation biochimique des protéines</i>	137

INTRODUCTION

A.	Analyse des protéines recombinantes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).	137
B.	Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes.	137
C.	Dosage des groupements thiols libres par le 5,5-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB).	137
D.	Détermination de la masse moléculaire des protéines par spectrométrie de masse	138
4.	<i>Caractérisation enzymatique</i>	138
A.	Suroxydation de la cystéine catalytique d'une 2-Cys Prx sous forme acide sulfinique	138
B.	Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire	138
a)	Test d'activité peroxydase des Prx via le système couplé Trx1/TR/NADPH.	138
b)	Mesure de la sensibilité à la suroxydation des Prx via le système couplé Trx1/TR/NADPH.	139
C.	Détermination des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire.	140
a)	Cinétique rapide par stopped-flow avec suivi de fluorescence intrinsèque.	140
b)	Cinétique rapide par stopped flow avec suivi du signal de dichroïsme circulaire.	141
c)	Détection des espèces par ESI-MS après séparation par chromatographie en phase inverse C8.	142
5.	<i>Caractérisation biophysique des protéines</i>	142
A.	Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain.	142
B.	Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche.	143
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	144
	ANNEXE PUBLICATION :	153

INTRODUCTION

Préambule

Fruits d'une lente évolution, les organismes aérobies ont su tirer profit du fort pouvoir oxydant de l'oxygène atmosphérique, O₂, dégagé lors de la "Grande Oxydation" survenue au Paléoproterozoïque (-2,4 à -2,1 milliards d'années) par des organismes photosynthétiques, les cyanobactéries (Lyons et al., 2014). Revers de la médaille, la respiration génère des sous-produits, les espèces réactives de l'oxygène ou ERO qui peuvent être à l'origine d'effets délétères sur les molécules biologiques. L'évolution, dans ce nouvel environnement oxydant a conduit à la sélection de biomolécules capables d'éliminer ces ERO comme par exemple des enzymes antioxydantes ; cependant, à faible dose, la réactivité de ces ERO peut également être mise à profit à des fins de signalisation cellulaire en tant que messagers, générant ainsi un transfert d'information particulier : la signalisation cellulaire redox qui opère majoritairement *via* la chimie des thiols.

Sous l'impulsion du Pr. Guy Branlant au début des années 2000, l'équipe d'enzymologistes moléculaires de notre laboratoire a développé une thématique de recherche sur les systèmes enzymatiques redox liés à la chimie du soufre. Tout d'abord par l'étude structurale et mécanistique des Méthionine sulfoxyde réductases, parallèlement à l'étude des systèmes couplés Thiorédoxines/Thiorédoxines Réductases, puis en 2008 sur le mécanisme de la Sulfirédoxine. Cette enzyme découverte en 2003 par le Dr. Michel Toledano à Saclay, réduit la forme suroxydée en acide sulfinique d'une cystéine chez une famille d'enzymes antioxydantes, responsables de la réduction des peroxydes : les peroxyrédoxines ou Prx. La complexité du mécanisme catalytique des Prx, et surtout du phénomène de suroxydation, provoque de vifs débats au sein de la communauté redox car ce phénomène régule les activités multiples de ces enzymes. Il fait intervenir un événement de changement conformationnel dont la dynamique n'a jamais pu être abordée. Cette question a motivé le projet de thèse que j'ai développé, sous la direction du Dr. Sophie Rahuel Clermont, intitulé **Enzymologie du mécanisme de régulation des Peroxyrédoxines par suroxydation au cours de la signalisation cellulaire redox.**

L'introduction de mon mémoire se divise en trois parties : dans un premier temps, je présenterai l'état actuel des connaissances concernant les peroxydes en tant que molécules de signalisation, je dresserai ensuite un portrait détaillé des

peroxyrédoxines et expliciterai le phénomène de modification par sulfinylation, son rôle biologique et sa formation. Suite à cette partie introductive, je présenterai les objectifs de mes travaux de recherche, ainsi que la stratégie adoptée pour répondre à ces questions. La partie Résultats & Discussion est divisée en six volets et décrit l'ensemble du travail effectué et nos interprétations. En fin de ce manuscrit, une partie Matériel & Méthodes permet de consigner et détailler l'ensemble des expérimentations effectuées. La publication issue de ces travaux dans le journal ACS Catalysis est présentée en annexe, elle consigne notre contribution à la compréhension du mécanisme enzymatique des Peroxyrédoxines.

I. Les peroxydes, des espèces réactives de l'oxygène, impliquées dans la signalisation cellulaire

Les ERO, sous-produits de la respiration ou produits finaux de nombreuses réactions métaboliques, sont à la fois des espèces délétères pour les organismes vivants, d'où de nombreuses voies d'élimination existantes, mais jouent également un rôle de messagers cellulaires essentiels dans des voies de signalisation cellulaire dites redox.

1. Des molécules réactives à double tranchant

A. Les différentes ERO

Les ERO découlent de la réduction mono ou bi-électronique du dioxygène (O_2). De par leur nature, les ERO sont classées en deux groupes, les espèces radicalaires et les espèces non radicalaires. Les ERO formées successivement par réduction monoélectronique du dioxygène sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$). Une multitude d'ERO (radicalaires et non radicalaires) dérivent de ces espèces initiales et sont présentées dans la Fig 1. Comme nous le verrons par la suite, la molécule H_2O_2 a acquis au cours de l'évolution une fonction de signalisation. Pour comprendre l'origine de cette fonction, il est essentiel de connaître les caractéristiques de cette molécule, au niveau de sa chimie, de sa durée de vie et de sa réactivité, en comparaison avec les autres ERO.

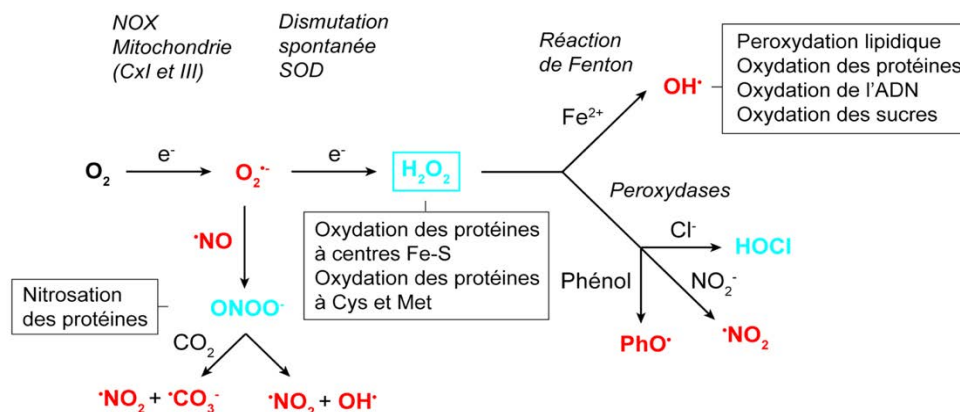


Fig. 1. Schéma général décrivant la formation et la diversité des ERO : O_2 : oxygène moléculaire, $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde, $OH^{\bullet}$: radical hydroxyle, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $NO^{\bullet}$: monoxyde d'azote, $ONOO^{\bullet}$: peroxynitrite, $^{\bullet}NO_2$: dioxyde d'azote, $^{\bullet}CO_3$: radical carbonate, $HOCl$: acide hypochloreux, $PhO^{\bullet}$: radical phénoxy. Les espèces radicalaires sont représentées en rouge, les espèces non radicalaires en bleu. L'origine des ERO est indiquée en italique, leurs effets sur les biomolécules est encadré. (Winterbourn, 2008), (Bersweiler, A, Thèse 2015)

B. Réactivité chimique relative des différentes ERO

L'anion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$ possède un potentiel standard redox (couple $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$) de 0,9 V. Malgré cette valeur plutôt élevée, il réagit avec relativement peu de composés biologiques car à pH physiologique, cette espèce est chargée négativement ce qui limite sa diffusibilité à travers les membranes biologiques et sa réactivité avec les centres riches en électrons. De ce fait, la réaction de dismutation spontanée de l'anion superoxyde en H_2O_2 et O_2 , caractérisée par une constante de vitesse de $10^5 M^{-1}.s^{-1}$ est en général plus rapide que sa réaction avec d'autres composés. Par conséquent $O_2^{\bullet-}$ représente surtout une espèce précurseur de H_2O_2 .

Le radical hydroxyle, $OH^{\bullet}$ est l'un des plus forts oxydants connus. Cette espèce radicalaire réagit avec tous les types de biomolécules de façon non spécifique et très rapidement, pouvant engendrer des réactions radicalaires en chaîne. Elle est donc limitée à son lieu de formation (demi-vie de $OH^{\bullet} = 10^{-9} s$). Le radical hydroxyle ne peut donc pas être considéré comme une molécule de signalisation.

Comparé à d'autres ERO, H_2O_2 est relativement stable avec un temps de demi-vie de quelques μs contre respectivement 10^{-6} et 10^{-9} s pour $\text{O}_2^{\bullet-}$ et $\text{OH}^\bullet$ (Tableau 1). Sa concentration moyenne *in vivo* est submicromolaire, de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} M. H_2O_2 est un faible oxydant avec un potentiel standard redox de 0,32 V à pH 7. Il est faiblement réactif avec la plupart des molécules biologiques, en raison d'une barrière énergétique d'activation élevée, à l'opposé de celle de $\text{OH}^\bullet$. Sa réactivité est ainsi contrôlée par la cinétique plutôt que par la thermodynamique. H_2O_2 joue le rôle d'électrophile au cours de réactions de substitution nucléophile impliquant des thiols, activés sous forme thiolate ($-\text{S}^-$). Cette chimie originale lui permet d'oxyder spécifiquement certaines cibles cellulaires et ainsi de modifier l'activité d'enzymes, de protéines ou encore d'influencer l'activité de facteurs de transcription.

ROS				
	$\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}$			
Redox potentiel (V)	0.94	0.32	2.31	
$T_{1/2}$ (sec)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-9}	
<i>In vivo</i> Concentration (M)	10^{-10}	10^{-7}	10^{-15}	

Cellular effect		
10^{-8}	10^{-6}	10^{-4}
Prolifération	Growth arrest	Apoptosis

Tableau 1. Comparaison des paramètres physico-chimiques de différents ERO. (Giorgio et al., 2007)

C. Toxicité du peroxyde d'hydrogène

Les effets délétères d' H_2O_2 résultent essentiellement de la formation du radical hydroxyle $\text{OH}^\bullet$ lors de la réaction de Fenton/Haber-Weiss en présence de Fe^{2+} :



Parmi les biomolécules sensibles à l'oxydation, l'ADN par exemple peut être affecté par des modifications des bases, des coupures simple-brin ou des pontages protéine-ADN, lipide-ADN. Les acides aminés peuvent être oxydés au niveau des chaînes latérales ou de leur chaîne principale, avec des conséquences sur la structure et/ou

la fonction de la protéine (Berlett and Stadtman, 1997). Au sein des protéines, ce sont essentiellement les acides aminés soufrés qui vont réagir (méthionine et cystéine) mais également des acides aminés aromatiques ou les histidines. Certains de ces résidus portant une fonction catalytique, cela peut conduire à l'inactivation des enzymes oxydées. Dans le cas de l'oxydation des chaînes latérales des résidus Met, la réparation est possible par l'action d'enzymes de réparation, les Méthionine sulfoxyde réductases MsrA et MsrB, qui réduisent les deux stéréoisomères de Met oxydées (MetO) au sein d'une chaîne polypeptidique (Etienne et al., 2003; Neiers et al., 2004; Olry et al., 2002) ou la fRMsR qui réduit la R-MetO libre (Gruez et al., 2010).

D. Pourquoi H_2O_2 peut porter un rôle de messenger

Pour répondre à cette question, il faut d'abord identifier les qualités essentielles d'un messenger cellulaire. Ainsi, pour jouer un rôle de messenger, une molécule doit i) présenter une relative stabilité chimique donc une réactivité modérée, limitant d'éventuels effets toxiques ; c'est le cas de H_2O_2 , comme nous l'avons montré au § I.1B; ii) posséder une bonne diffusibilité, ou un passage facilité à travers les membranes cellulaires. En effet seules des molécules neutres ne sont pas bloquées par la barrière naturelle que constituent les membranes. Dans le cas de H_2O_2 , sa diffusion à travers les membranes est limitée et pourrait être facilitée par les aquaporines en modulant son efflux intra et intercellulaire (Appenzeller-Herzog et al., 2016; Bienert and Chaumont, 2014). Fig 3 ; iii) voir sa concentration contrôlée par des enzymes spécifiques (§I.3) ; et iv) être induit spécifiquement par des stimuli cellulaires.

Le rôle de second messenger de H_2O_2 a été mis en évidence par des études sur cellules de mammifère dans les années 1990. Les travaux fondateurs de Finkel (Finkel et al., 1995) ont montré une fonction de médiateur de H_2O_2 suite à la stimulation de cellules musculaires lisses vasculaires de rat par le facteur de croissance PDGF. L'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de H_2O_2 induit une réponse impliquant par exemple l'activation des MAP kinases qui est inhibée lorsque la production intracellulaire de H_2O_2 est bloquée par la catalase. Ces résultats ont par la suite été confirmés dans d'autres types cellulaires ref. Ainsi, H_2O_2 est aujourd'hui reconnu comme un messenger cellulaire (Paulsen and Carroll, 2010). Chez les

mammifères, H_2O_2 peut induire l'expression de gènes du cycle cellulaire voire de l'apoptose, affectant la prolifération et la différenciation cellulaire. Il induit chez la levure, une augmentation de l'expression des gènes codant des protéines antioxydantes (Jamieson, 1998). Il joue le rôle de second messenger dans plusieurs voies de signalisation cellulaires clés, y compris dans d'autres organismes eucaryotes comme les levures (Delaunay et al., 2002a; Sobotta et al., 2015; Stöcker et al., 2018). Nous verrons qu'il est produit, et régulé de façon spécifique, par les NADPH oxydases (NOX) en réponse à divers stimuli (Lambeth, 2004). Cette fonction de médiateur de signal, implique l'existence de cibles ou de relais, capables de réagir spécifiquement avec les faibles concentrations intracellulaires d' H_2O_2 . C'est le cas de certaines protéines à Cys, dont l'oxydation réversible permet la transmission du signal redox, comme les peroxydases à Cys, qui possèdent à la fois une activité peroxydase et un rôle de relais.

2. Origine de H_2O_2 et des autres peroxydes

A. Le radical anion superoxyde

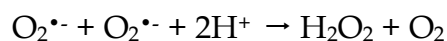
Chez les organismes aérobies, de nombreux compartiments cellulaires sont générateurs d' $O_2^{\bullet-}$ à partir du dioxygène O_2 . C'est notamment le cas de la réaction de la xanthine oxydase cytosolique, de la cytochrome P450-monooxygénase dans le réticulum endoplasmique, de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie (par des fuites électroniques des complexes I et III) et des NADPH oxydases (NOX).

Les NOX jouent un rôle particulièrement important dans la signalisation redox. Ce sont des complexes enzymatiques intégrés aux membranes, soit dans la membrane plasmique, soit au niveau de la membrane des phagolysosomes. Les NOX catalysent le transfert d'un électron à partir du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) à travers la membrane cellulaire *via* le cofacteur FAD et deux groupements hèmes pour générer $O_2^{\bullet-}$ dans le compartiment externe. $O_2^{\bullet-}$ peut donc être généré dans le milieu intra et extra cellulaire. A l'extérieur de la cellule, il peut être réimporté dans le cytosol par le transporteur d'ions Chlorure CLC-3 (Meitzler et al., 2014). Initialement décrites chez les macrophages, les NOX ont été

découvertes dans plusieurs type de tissus, suggérant le rôle spécifique de cette enzyme dans la signalisation cellulaire. En effet, les NOX produisent l'anion superoxyde en réponse à une variété de stimuli comme des médiateurs inflammatoires, des infections microbiennes, des facteurs de croissance ou des cytokines chez les mammifères (Paulsen and Carroll, 2010). Au sein des phagocytes, les myéloperoxydases utilisent ensuite H_2O_2 pour produire de l'acide hypochloreux en réponse aux infections bactériennes (Folkes et al., 1995) (Fig.2).

B. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est majoritairement issu de la dismutation du radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. La réaction de dismutation est spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases (SOD) (Wang et al., 2018) selon la réaction :



La réactivité des SOD est extrêmement élevée, de l'ordre de $10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, soit supérieure de 3 ordres de grandeur par rapport à la dismutation spontanée (Forman and Fridovich, 1973). Chez les mammifères, il existe trois SOD, regroupées en fonction de leur cofacteur métallique (Manganèse ou cuivre/Zinc) et de leur séquence. La MnSOD est localisée dans la mitochondrie et les Cu/ZnSOD dans le cytoplasme. De plus certaines SODs sont exportées dans le compartiment extracellulaire (Valko et al., 2006).

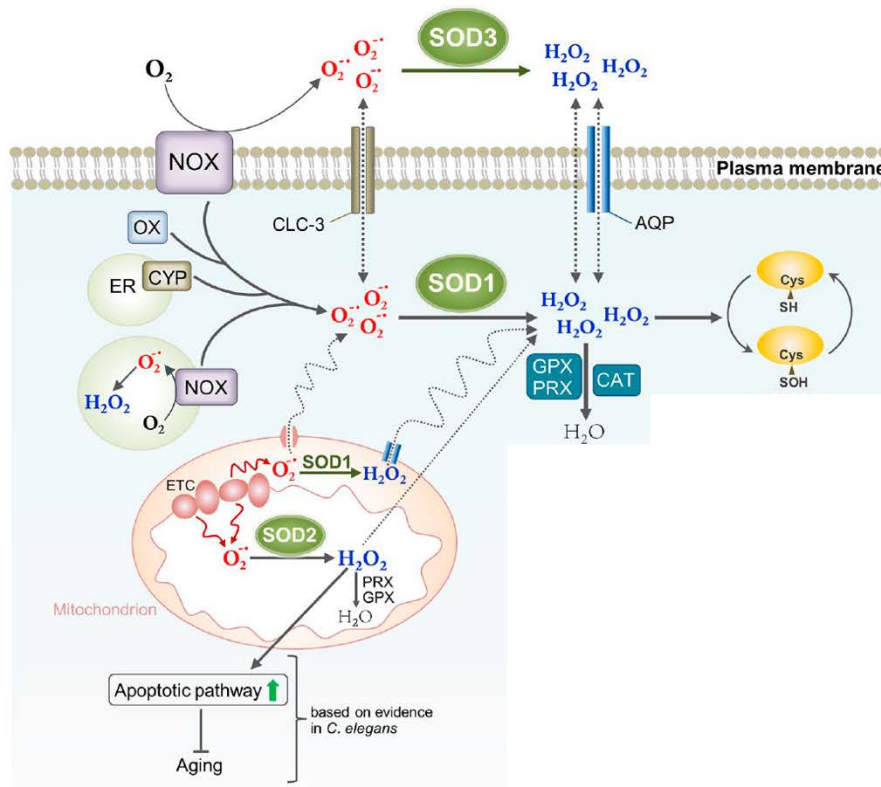


Fig. 2. Sources, localisation des ERO et en particulier de H_2O_2 à partir de $O_2^{\bullet-}$, rôles dans la signalisation cellulaire chez les mammifères. Dans les cellules, de nombreuses voies conduisent à la production d' $O_2^{\bullet-}$ (en rouge) : voie cytosolique avec la xanthine oxydase (OX), les cytochrome-P450-monooxygénases (CYP) dans le réticulum endoplasmique (ER), au sein de la mitochondrie dans la chaîne respiratoire (ETC) et les NADPH oxydase (NOX) membranaires. H_2O_2 (en bleu) est majoritairement produit par les superoxydes dismutases 1 (SOD1) dans le cytoplasme et SOD3 dans le milieu extracellulaire. AQP, aquaporine ; CAT, catalase (Wang et al., 2018)

Puisque l'activité principale des SODs est d'éliminer les anions superoxydes en générant H_2O_2 , la question se pose de savoir quel est leur rôle biologique principal, dans la protection contre les dommages oxydatifs ou dans la signalisation cellulaire. Des expériences de knockout sur divers organismes et leur impact sur la longévité fournissent quelques indices. Par exemple, la suppression des 5 SODs chez *C. elegans* n'induit pas d'effet sur la durée de vie de l'organisme (Van Raamsdonk and Hekimi, 2012). De plus, dans certains cas la perte d'un ou plusieurs gènes codant des SOD a été montré n'ayant aucun effet sur la durée de vie du ver (Veal et al., 2018). Ce résultat est en défaveur d'un rôle des SOD dans la défense contre les dommages oxydatifs. A contrario, une étude ayant consisté à surexprimer la SOD-1 chez *C. elegans*, induit un allongement de la durée de vie du ver (Cabreiro et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la production accrue de H_2O_2 induit l'activation d'une

réponse transcriptionnelle des défenses antioxydantes, et non une protection contre les dommages oxydatifs, en faveur d'un rôle des SOD dans les mécanismes de signalisation associés à H_2O_2 .

Une autre enzyme découverte dans la mitochondrie, $p66^{shc}$, est également impliquée dans la production mitochondriale d' H_2O_2 en réponse à des signaux pro-apoptotiques comme l'absence de facteurs de croissance, un stress oxydant ou encore une irradiation aux UV. Située dans l'espace intermembranaire, $p66^{shc}$ catalyse le transfert des électrons de la chaîne respiratoire, du cytochrome c à O_2 , produisant de l' $O_2^{\bullet-}$. Cette génération de H_2O_2 induisant l'apoptose, confère à $p66^{shc}$ un rôle dans la durée de vie des cellules. Son activation s'effectue par oxydation sous forme de ponts disulfures, provoquant son passage d'un état dimérique (inactif) à tétramérique (actif) (Georgio et al, 2005) (Fig.3).

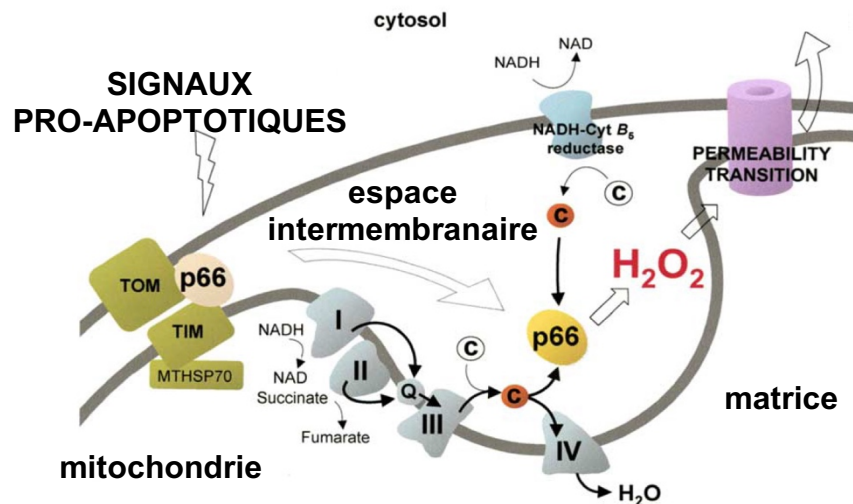


Fig. 3. Activation de l'apoptose cellulaire par $p66^{shc}$. La production d' H_2O_2 génère une augmentation de la perméabilité cellulaire, conduisant à la mort cellulaire. (Georgio et al, 2005) (A, Bersweiler, thèse 2015).

C. Les peroxydes lipidiques

Les lipides sont également des cibles des radicaux par le processus de peroxydation lipidique. La réaction débute par l'attaque du radical sur une double liaison d'un acide gras polyinsaturé ou PUFA, ce qui déclenche une réaction radicalaire en chaîne (Gaschler and Stockwell, 2017)(Fig.4).

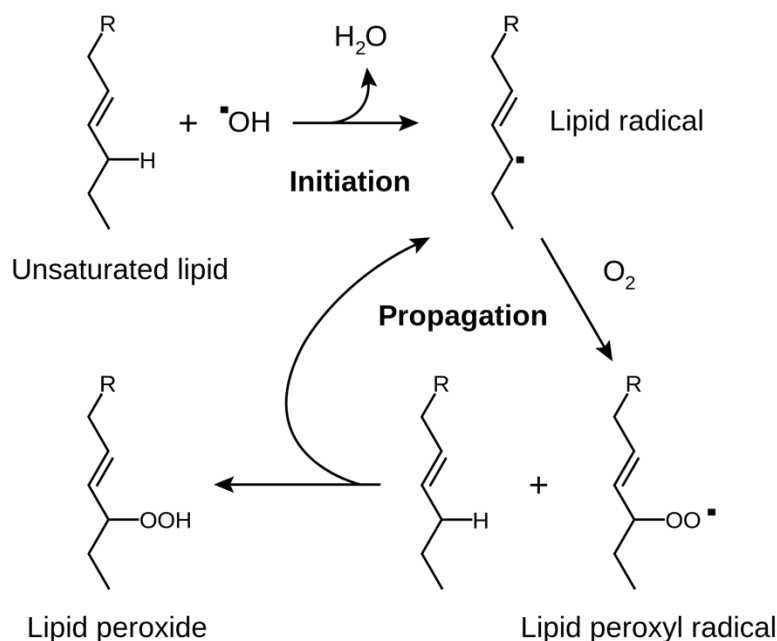


Fig 4. Mécanisme général de peroxydation des PUFA. Initiation : attaque du radical sur une double liaison d'un acide gras polyinsaturé puis la chaîne s'isomérisse pour former le diène conjugué le plus stable avant de réagir avec l'oxygène moléculaire. Propagation : réaction en chaîne aboutissant à la formation d'un peroxyde lipidique et d'un nouveau radical lipidique. (Young et al., 2001).

Les mitochondries sont fortement affectées par la formation de ces peroxydes d'acide gras qui sont des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative (Damiani et al., 1994; Watanabe and Nakamura, 1979) et qui altèrent la perméabilité des membranes à certains cations (Augustin et al., 1979). Ainsi, la formation des hydroperoxydes d'acides gras (FA-OOH) est impliquée dans le vieillissement et certaines pathologies, conduisant à des dommages des membranes cellulaires par augmentation de leur perméabilité (Wong-ekkabut et al., 2017). En présence de métaux de transition, ils peuvent former des radicaux alcoyle ($\text{LO}\cdot$) ou peroxyde ($\text{LOO}\cdot$) capables de modifier d'autres biomolécules. Réagissant par exemple avec les groupements

amines des protéines, il en résulte une altération de leurs fonctions (Kato, 2014). Ces réactions de peroxydation lipidique oxydent les acides gras insaturés de manière aspécifique. A l'inverse certaines enzymes catalysent la peroxydation d'acides gras comme les lipoxygénases ou cyclooxygénases avec une haute régio- et stéréosélectivité, et produisent des peroxydes souvent associés aux voies de signalisation (Tobin and Ramakrishnan, 2013). Des composés organiques synthétiques comme le tert-butyl hydroperoxyde (t-BOOH) ou le cumène hydroperoxyde (Cu-OOH) sont fréquemment utilisés comme analogues des peroxydes lipidiques (Fig.5). Les LOOH évoluent et sont également sources d'autres produits comme le 4-hydroxy-2-nonenal qui joue un rôle de signalisation (Higdon et al., 2012)

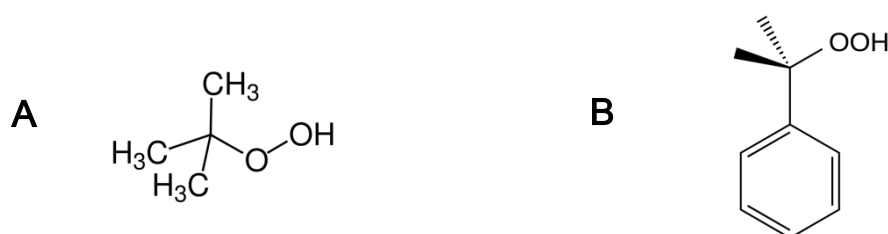
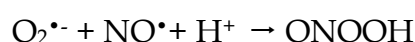


Fig 5. Structures chimiques d'analogues de LOOH. A. t-BOOH ; B. Cu-OOH

D. Autres peroxydes :

a) Le peroxynitrite

Un autre peroxyde d'intérêt biologique est l'acide peroxynitrique (ONOOH), le conjugué acide de l'anion peroxynitrique (ONOO⁻). Il se forme par recombinaison entre O₂^{•-} et l'oxyde nitrique (NO[•]) (Beckman and Freeman, 1990; Truzzi et al., 2019). Le terme peroxynitrite traduit la somme de ONOOH et ONOO⁻. Le peroxynitrite est formé principalement au niveau des sources de O₂^{•-}, en particulier dans les phagosomes et dans les mitochondries (Packer and Murphy, 1995).

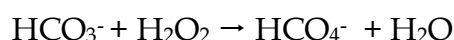


La formation de peroxynitrite est essentielle dans la lutte contre les infections pour éliminer les pathogènes dans les phagosomes des macrophages (Prolo et al.,

2014). Les thiols ou sélénols des peroxydases, très réactives (cf chapitre II) sont les principales cibles de ce peroxyde dans les systèmes biologiques. En étudiant les différentes constantes de vitesse de réaction et les concentrations intracellulaires, et connaissant la demi-vie du peroxydinitrite estimée à 1 s dans un tampon physiologique, une distance de diffusion de l'ordre de 100 μm est possible en fonction du compartiment cellulaire et des conditions métaboliques (Marla et al., 1997). L'acide peroxydinitrique peut diffuser au travers des membranes lipidiques avec une constante de diffusion de l'ordre de 2.10^3 s^{-1} alors que l'anion peroxydinitrique préférera traverser les membranes par des canaux anioniques (Denicola et al., 1998).

b) Le peroxymonocarbonate

Dans les cellules, le couple dioxyde de carbone/bicarbonate dissous $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former du peroxymonocarbonate HCO_4^- lors d'une réaction de perhydratation (Bakmutova-Albert et al., 2010).



La formation de peroxymonocarbonate est assurée par des enzymes à cofacteur métallique comme les xanthine oxydases ou la Cu/Zn SOD. La Cu/Zn SOD réduit efficacement HCO_4^- en CO_3^{2-} . L'activité des SOD est augmentée en tampon bicarbonate. (Medinas et al., 2009)

Les réactions impliquant HCO_4^- sont 100 fois plus rapides que celles avec H_2O_2 car CO_3^{2-} est un bien meilleur groupe partant que OH^- (Trindade et al., 2006). Dans les cellules les métalloprotéines mais également le GSH sont les principales cibles de ce peroxyde. Les peroxydases à thiol (cf chapitre II) réagissent avec HCO_4^- avec une constante de vitesse extrêmement élevée ($10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour AhpE de *M.tuberculosis*), ce qui suggère que d'autres thiol peroxydases l'acceptent comme substrat (Reyes et al., 2011; Truzzi et al., 2019). Finalement avec sa charge négative, le peroxymonocarbonate ne traverse pas aisément les membranes et doit utiliser des canaux anioniques pour sa diffusion. Son rôle dans les voies de régulation redox est actuellement mal connu.

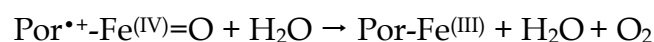
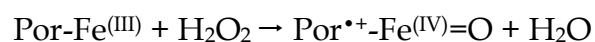
3. Les enzymes impliquées dans le catabolisme des peroxydes

A. Les peroxydases à hème : catalases et cytochrome c peroxydase

Les peroxydases à hème sont un groupe d'enzymes utilisant un hème pour catalyser le transfert d'électrons et ainsi réduire les peroxydes en eau ou en alcools. Chez les mammifères la majorité des catalases est localisée dans les peroxysomes, des organelles au sein desquelles l'oxydation d'acides gras conduit à la génération d' H_2O_2 . Des catalases sont aussi localisées dans le cytosol. Chez la levure, la Cyt c peroxydase CCP est responsable de la réduction du niveau d'ERO dans l'espace inter-membranaire des mitochondries (Martins et al., 2014).

Les catalases se répartissent en trois familles d'enzymes selon leur structure, leur site actif et leur mécanisme catalytique. Deux de ces familles regroupent les métallo-enzymes à hème avec les catalases typiques et les catalases-peroxydases. La première exerce une activité de type catalase et est présente dans tout le règne du vivant alors que les catalases-peroxydases ne sont pas retrouvées chez les plantes et les animaux. La troisième famille est un petit groupe d'enzymes uniquement bactériennes, les Mg-catalases, possédant un site actif avec deux Mg^{2+} .

Le mécanisme des catalases à hème est en deux étapes, avec transfert de deux électrons de l'hème vers H_2O_2 aboutissant à un hème oxydé et à la libération d'une molécule d'eau, puis une seconde molécule d'eau intervient en tant que réducteur. Cette réaction est très efficace avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.



Por : groupement prosthétique porphyrine

De nombreuses études ont été menées dans le but de manipuler le niveau de catalase dans les cellules afin d'identifier leur importance biologique. De manière surprenante, la perte du gène *CTL1* chez la levure, augmente sa durée de vie (de

Carvalho et al., 2017). Il est donc clair que les catalases ne sont pas les seules défenses antioxydantes des cellules et ne sont pas impliquées dans la signalisation.

B. Les Glutathion peroxydases

Les Glutathion peroxydases sont des enzymes ubiquitaires qui réduisent les peroxydes par l'intermédiaire d'une cystéine ou d'une sélénocystéine catalytique. Cet acide aminé catalytique réagit de manière très spécifique avec les peroxydes, conduisant à la formation d'un acide sulfénique/séléinique ensuite réduit par attaque d'une molécule de glutathion. Ceci conduit à la formation d'un pont disulfure ou sélénio-sulfure, réduit par un système couplé utilisant le GSH comme donneur d'électrons pour retrouver son état réduit initial.

Chez les vertébrés, la glutathion peroxydase est l'une des enzymes comportant une sélénocystéine. La présence de cet acide aminé est une part de l'évolution encore mal comprise. Des études récentes ont montré que la présence d'une sélénocystéine est peut-être importante pour éviter l'inhibition de l'enzyme par suroxydation (cf chapitre III) (Ingold and Conrad, 2018).

Il y a huit isoformes GPx chez l'homme. L'enzyme GPx4 est le principal réducteur des peroxydes lipidiques (Fig.6). GPx4 réduit les peroxydes lipidiques par l'attaque nucléophile de la Se-Cys sur l'oxygène terminal du peroxyde lipidique, libérant un hydroxyde lipidique (Takebe et al., 2002). L'inhibition ou la suppression de GPx4 entraîne la mort des cellules par ferroptose et l'accumulation de peroxydes lipidiques (Gaschler and Stockwell, 2017).

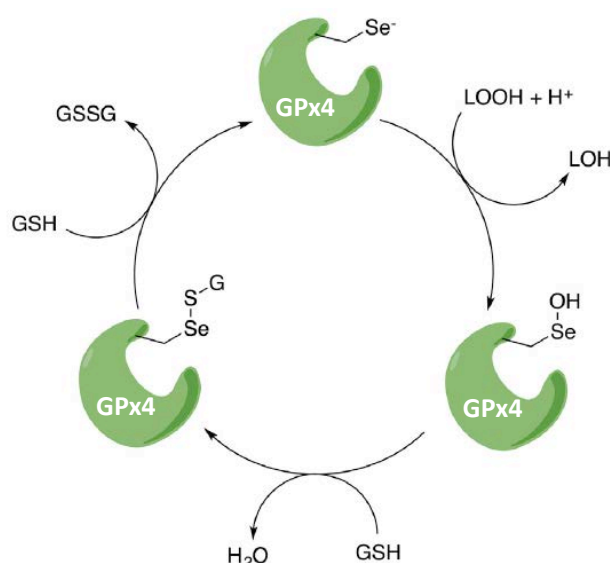


Fig. 6. Mécanisme catalytique de la réduction des peroxydes lipidiques (LOOH) par GPx4 (en vert). La sélénocystéine réalise une attaque nucléophile sur le peroxyde, générant un intermédiaire acide sélénique et un hydroxyde de lipide. L'acide sélénique est réduit ensuite par deux équivalents de glutathion (Gaschler and Stockwell, 2017).

Chez *C. elegans*, il existe huit gènes codant des GPxs. Un mutant dans lequel quatre de ces gènes ont été supprimés a vu son espérance de vie raccourcie (Sakamoto et al., 2014). Chez la souris aucune étude ne montre qu'une surexpression de GPx aurait un effet contre le vieillissement. Ainsi, comme pour les catalases, le rôle antioxydant des GPxs est avéré mais il apparaît que les GPxs ne sont pas impliquées dans le rôle de signalisation cellulaire.

La levure possède également trois glutathion peroxydases à thiol : Gpx1, Gpx2 et Gpx3 (ou Orp1 ou Hyr1) (Delaunay et al., 2002b; Inoue et al., 1999; Tanaka et al., 2005). Orp1 est un cas particulier, plus proche d'une peroxydase à thiol Trx-dépendante d'un point de vue fonctionnel. Orp1 porte une fonction de signalisation essentielle en tant que relais redox, en transmettant les équivalents oxydants de H₂O₂ au facteur de transcription Yap1. La forme Yap1 oxydée induit l'expression de gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant, jouant un rôle majeur dans la réponse de la levure à H₂O₂ (Bersweiler et al., 2017).

Une autre famille de peroxydase à thiol, faisant l'objet de cette étude, sera abordée dans un chapitre dédié (Chapitre II) consacré aux Peroxyrédoxines (Prx).

4. La chimie des thiols à la base de la signalisation cellulaire redox

La signalisation cellulaire redox médiée par H_2O_2 est un phénomène dans lequel la réactivité de la fonction thiol des résidus Cys joue un rôle central. Allant de -2 à +4, ces oxoformes sont ou non, réversibles par des rédoxines, représentant autant de mécanismes potentiels à l'origine de la régulation des protéines de signalisation redox (Fig. 7).

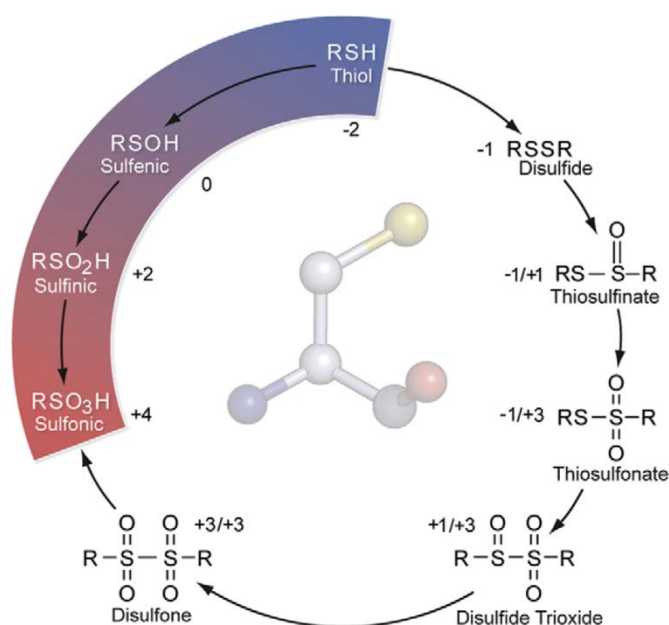
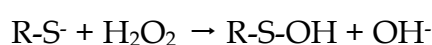


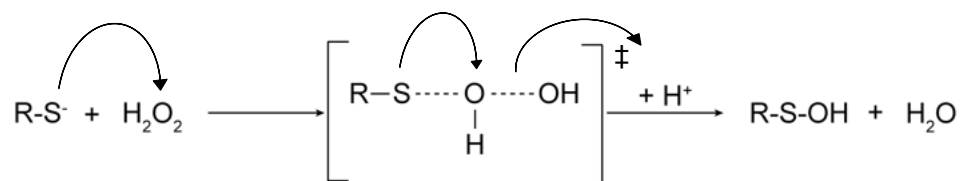
Fig. 7. Représentation des différents oxoformes de la fonction thiol du résidu Cys. Le degré d'oxydation de chaque oxoforme est indiqué (Reddie and Carroll, 2008).

A. L'acide sulfénique

La première forme d'oxydation de la fonction thiol est l'acide sulfénique (SOH) avec un degré d'oxydation 0 du soufre. Cette forme constitue un intermédiaire central, considérée comme une plaque tournante, à l'origine de nombreuses autres formes oxydées.



Le résidu Cys réagit avec le peroxyde selon une réaction de substitution nucléophile de type 2 ou S_N2, sous forme déprotonée.

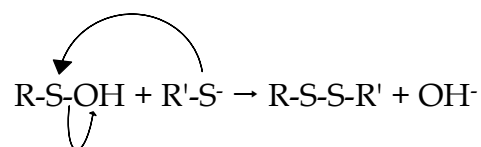


Il est crucial que la fonction thiol soit activée sous sa forme déprotonée pour activer le caractère nucléophile du soufre et permettre la réaction avec le peroxyde. Pourtant, à pH physiologique, le pK_a de la fonction thiol des cystéines libres ou du glutathion est de l'ordre de 8,3 et 8,8, ce qui implique que plus de 90% des thiols sont sous forme protonée, ce qui est le cas de la plupart des résidus Cys au sein des protéines. Au sein des protéines effectrices de la signalisation redox, la forme thiolate doit donc être stabilisée par l'environnement immédiat de la Cys : des acides aminés proches formant une paire d'ion avec le groupement thiolate, des dipôles d'hélice α ou des interactions faibles de type liaisons hydrogène. Ce microenvironnement conduit à stabiliser, mais également activer la fonction thiolate, permettant d'accélérer la réaction avec les peroxydes de 2,9 M⁻¹.s⁻¹ pour la forme thiol libre à >10⁷ M⁻¹.s⁻¹ dans une peroxydase à thiol. Dans ce dernier cas, le site permet en outre d'aligner et polariser la liaison peroxyde de façon optimale pour l'attaque comme nous le verrons dans le chapitre III (Winterbourn and Metodiewa, 1999).

L'acide sulfénique est un groupement instable et qui possède une réactivité à la fois en tant que nucléophile et électrophile. C'est donc généralement un état intermédiaire qui va évoluer soit vers la formation d'un pont disulfure soit vers un état d'oxydation supérieur de type acide sulfinique. La réaction de deux acides sulféniques peut aussi conduire à la formation d'un thiosulfinate.

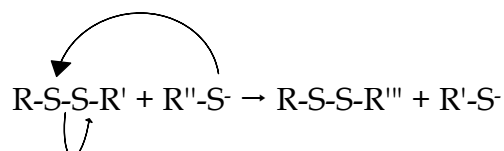
B. Le pont disulfure

Étant électrophile, l'acide sulfénique peut réagir avec un thiolate à proximité par une réaction de substitution nucléophile, pour former un pont disulfure (R-SS-R'), le degré d'oxydation -1 du soufre.



Le pont disulfure est une modification des cystéines très répandue. Il permet de stabiliser la structure d'une protéine, de stabiliser des interactions entre complexes protéiques, de modifier la structure des protéines pour activer ou inactiver leur site actif ou de réguler leur activité biologique (Gruez and Branlant, 2012).

Comparé au thiolate, la réactivité du pont disulfure est faible, cet état d'oxydation est donc stable. Son clivage est possible par l'attaque nucléophile d'un autre thiolate, ce qui conduit à un échange de pont disulfure :

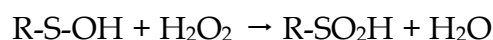


Cette réaction est très répandue *in vivo* et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires : repliement des protéines, métabolisme, activation de chaperons, processus catalytiques enzymatiques et lors de la signalisation redox médiée par H_2O_2 .

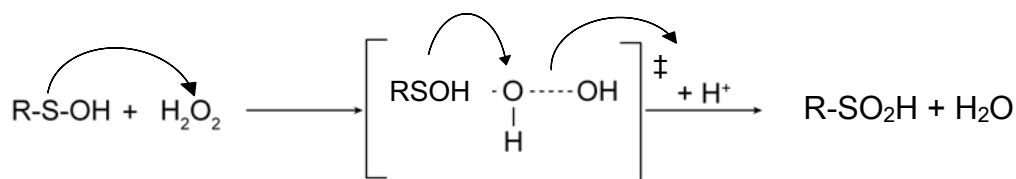
Le pont disulfure est totalement réduit en deux fonctions thiols par les oxydo-réductases comme la Trx (voir D.).

C. Les formes acide sulfinique et acide sulfonique

L'acide sulfinique est généré après réaction entre un acide sulfénique et une molécule de peroxyde.



Dans cette réaction, un doublet électronique du soufre attaque, c'est donc le caractère nucléophile de la fonction sulfénique qui opère. A nouveau, la vitesse de cette réaction dépend de l'activation du peroxyde.



Cette forme d'oxydation (degré d'oxydation +2 du soufre) est stable et peut être identifiée et caractérisée. L'acide sulfinique ne peut être réduit par les oxydoréductases comme la Trx car l'atome de soufre se comporte comme un électrophile dur qui réagit faiblement avec les nucléophiles mous tels que les thiols. La sulfinylation des cystéines, appelée également suroxydation, a longtemps été considérée comme irréversible avant que ne soit découverte une enzyme catalysant sa réduction, la Sulfirédoxine (Srx), spécifique d'une famille de peroxydases à thiol, les Prx (cf Chap III).

La sulfinylation joue un rôle essentiel dans la régulation des Prx, mais des rôles fonctionnels ont également été proposés pour d'autres protéines telles que la D-amino-acide oxydase DAO ou la protéine impliquée dans la maladie de Parkinson DJ-1. Dans une étude récente, de nombreuses protéines sujettes à la sulfinylation en réponse à un traitement cellulaire à H_2O_2 ont été caractérisées dans les cellules humaines, dont certaines réductibles par Srx. Ceci suggère que cette modification aurait un impact beaucoup plus important que celui accepté jusqu'alors, la communauté scientifique n'hésitant plus à qualifier cette fonction de modification post-traductionnelle (Akter et al., 2018).

La forme sulfonique résulte de l'attaque d'une molécule de peroxyde d'hydrogène par un acide sulfinique ou sulfinate, cette forme SO_3H correspond au degré le plus élevé d'oxydation du soufre : +4. Souvent observée *in vitro*, son existence *in vivo* reste débattue.

D. Les rédoxines : Thiorédoxine et Glutarédoxine

Les rédoxines sont des protéines dont le site catalytique possède un motif CXXC. Les premières rédoxines caractérisées sont les Trx et les glutarédoxines (Grx). Ces enzymes sont des disulfures oxydoréductases ubiquitaires et permettent,

respectivement, la réduction des ponts disulfures et des protéines glutathionylées. Les deux systèmes redox sont complémentaires et jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la balance redox cellulaire. En régénérant les formes réduites des protéines oxydées, ils sont en bout de chaîne des voies de signalisation dépendantes de H_2O_2 en régénérant la forme réduite des protéines effectrices et en induisant l'arrêt du signal. Ils ont en commun l'utilisation du NADPH comme source d'électron (potentiel redox de -315 mV) (Fig. 8).

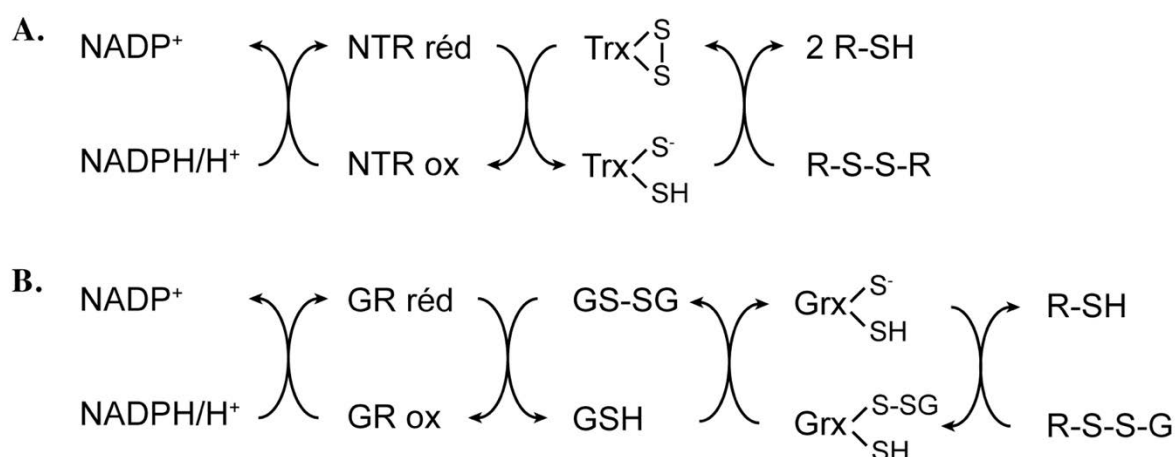


Fig. 8. A. Le système thiorédoxine (Trx)/thiorédoxine réductase (NTR), **B.** Le système glutathion (GSH)/ glutarédoxine (Grx)/ glutation réductase (GR) (Bersweiler, A, Thèse 2015).

a) Le système Thiorédoxine/Thiorédoxine réductase

La Trx est une disulfure oxydo-réductase essentielle et abondante, découverte en 1963 par E.C. Moore and P. Reichard. Son repliement particulier, composé de cinq brins β centraux et quatre hélices α de part et d'autre, est en fait une structure primitive retrouvée chez de nombreuses familles d'enzymes comme les Grx, GPx et Prx (Copley et al., 2004) (Fig.9). Le potentiel redox de la Trx est de -270 mV ce qui permet à l'enzyme de réduire les ponts disulfures de nombreux partenaires protéiques. Seuls quelques exemples de substrats comme BASI, PAPS réductase, ArsC, ou MsrA ont été caractérisées du point de vue structural en complexe avec Trx, montrant que la reconnaissance se fait dans l'environnement immédiat du pont disulfure. L'affinité relativement faible de la Trx pour ses partenaires et donc la faible spécificité de substrat, permet à cette oxydoréductase de cibler un large spectre de

protéines (Gruez and Branlant, 2012). La reconnaissance dépend de la rigidité conformationnelle inhérente conférée par le pont disulfure aux cibles oxydées. De manière significative, des études thermodynamiques par microcalorimétrie à titration isotherme, ont montré des contributions entropiques favorables en tant que force de reconnaissance principale dictant ces interactions protéine-protéine (Palde and Carroll, 2015).

La première étape de la réduction consiste en l'attaque du pont disulfure de la cible par la Cys catalytique (Cys 32) de la Trx, conduisant à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire, puis la seconde Cys du motif catalytique (CGPC) appelée Cys de recyclage (Cys 35) attaque le pont disulfure mixte. La Trx se retrouve alors sous forme oxydée et le partenaire réduit est libéré. La régénération de Trx s'effectue finalement par une enzyme à FAD, la thiorédoxine réductase ou TR, NADPH dépendante (Fig. 8).

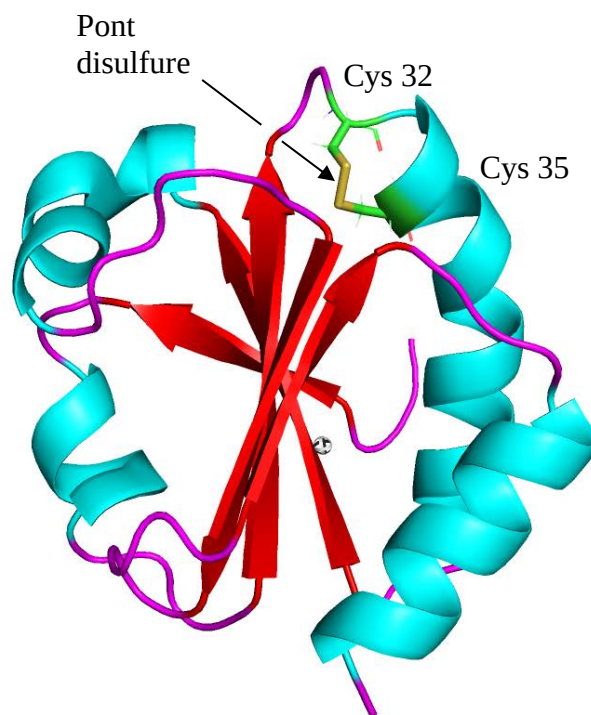


Fig. 9. Structure tridimensionnelle de Trx1 d'*E.coli* obtenue par RMN, sous forme oxydée contenant un pont disulfure (en jaune). Code PDB : 1XOA (Jeng et al., 1994).

b) Le système Glutathion/Glutarédoxine

Le glutathion (GSH) est un tripeptide comportant un résidu Cys et donc une fonction thiol, capable de glutathionyler une protéine sur une cystéine cible. Les protéines glutathionylées sont des intermédiaires catalytiques ou sont générées suite à un stress oxydatif par réaction entre l'acide sulfénique et le GSH. Le GSH est peu réactif mais très abondant, et peut glutathionyler de nombreuses protéines. Il joue également un rôle essentiel dans le métabolisme du fer (Berndt and Lillig, 2017).

Les Grx sont des petites protéines possédant un repliement de type Trx, capables de réduire le pont disulfure mixte entre une protéine cible et le GSH (protéine-SSG) avec un potentiel redox de -233 mV. La Grx est ensuite réduite par la glutathion réductase (GR), une enzyme à FAD, NADPH dépendante. Le système GSH/Grx/GR est essentiel dans le métabolisme du soufre et dans l'assemblage des protéines à centre Fe-S. L'équipe de M.Toledano a démontré qu'une souche de levure auxotrophe en GSH n'est pas viable, contrairement à la bactérie *E.coli*. Il est également indispensable au recyclage des GPx à sélénium, et à de nombreuses enzymes comme la MsrB à une Cys et la Srx à une Cys de mammifère (Boukhenouna et al., 2015; Tarrago et al., 2009).

II. Les peroxyrédoxines

Les Prx sont des protéines ubiquitaires et abondantes, associées à la résistance au stress oxydatif, possédant une activité peroxydase permettant la réduction d'un large spectre de peroxydes comme le peroxyde d'hydrogène, les peroxydes lipidiques, le peroxynitrite et le peroxymonocarbonate (Takebe et al., 2002). Il est admis que les Prx sont responsables de l'élimination de près de 90% des peroxydes cellulaires (Adimora et al., 2010; Winterbourn, 2008). Il a également été démontré que les Prx agissent comme récepteurs/relais de la signalisation cellulaire redox (Toledano et al., 2004), possèdent une activité chaperon (Jang et al., 2004), activité ayant par exemple, un rôle central dans le vieillissement et le cycle réplcatif de la levure *S.cerevisiae*. Quelle est l'origine de ces multiples fonctions ? Comment sont-elles régulées ? Par quelle(s) modification(s) ? C'est ce que nous allons présenter dans les deux prochains chapitres de cette introduction.

1. Historique de la découverte des Prxs

En 1988, Rhee et ses collègues purifient chez la levure une protéine d'une taille apparente de 25 kDa sur gel dénaturant de type SDS-PAGE. Cette enzyme, capable de protéger la glutamine synthase de l'oxydation est initialement décrite comme capable de réduire plus efficacement les espèces réactives du soufre ($RS^\bullet$, $RSSR^\bullet$ ou $RSOH$) que les espèces réactives de l'oxygène ($O_2^\bullet$, H_2O_2 , ou $ROOH$). Elle fut donc nommée thiol-specific antioxydant ou Tsa. Contrairement aux enzymes déjà décrites réduisant les ERO, Tsa ne requiert aucun cofacteur redox tels qu'un ion métallique, un hème ou une flavine. Pour être régénérée, Tsa requiert l'activité réductrice de son partenaire donneur de protons, la Trx (Kim et al., 1988).

Au même moment, une activité peroxydase permettant la réduction d'un peroxyde organique, l'hydroperoxyde de cumène $CuOOH$, fut détectée chez la bactérie *S. typhimurium*. Un couple de protéines, l'Alkyl hydroperoxydase, AhpF, une flavoprotéine NAD(P)H dépendante de 52 kDa, et AhpC, de masse apparente 22 kDa, furent proposées comme utilisant la chimie rédox du soufre pour réduire les

peroxydes par transfert d'électrons "entre dithiols et pont disulfure" (Jacobson et al., 1989).

Avec l'avancée des méthodes d'alignement et de comparaison de séquences dans les années 90, les séquences de Tsa et AhpC se sont révélées très proches, démontrant qu'une nouvelle classe de peroxydase avait été découverte (Tartaglia 1990). Ces analyses révéleront également que AhpF est un homologue de la thiorédoxine réductase (TR) (Chae et al., 1994). La peroxydase Tsa fut donc renommée TPx pour thiorédoxine peroxydase. Suite à la découverte de membres de cette famille ne possédant qu'une cystéine, ne pouvant donc pas être réduites par une Trx, le nom choisi pour cette famille fut changé en peroxydoxine. Actuellement le nom recommandé par le Comité de la nomenclature de l'*International Union of Biochemistry and Molecular Biology* est **peroxyrédoxine** abrégé **Prx** (Chae et al., 1994) (Toledano, 2016 et Rhee, 2016 pour revue).

2. Classification

A. Vue d'ensemble du mécanisme catalytique

Les Prxs ont vu leur mécanisme élucidé en 1997 par l'équipe du Dr. Poole. A partir de l'enzyme AhpC de *Salmonella typhimurium*, Poole et ses collaborateurs ont identifié la Cys catalytique conservée chez toutes les Prxs : la C_P ou Cys Peroxydasique. Cette Cys essentielle est responsable de l'attaque du peroxyde et forme un intermédiaire acide sulfénique SOH. Une seconde Cys essentielle au mécanisme catalytique réduit ensuite cet intermédiaire sous forme de pont disulfure. Cette seconde Cys est dénommée Cys de recyclage ou de résolution C_R, puisqu'elle permet *in fine* de régénérer la C_P à son état initial réduit grâce à un partenaire réducteur. Dans le cas de AhpC, cette Cys C_R est portée par une seconde sous unité de l'enzyme au sein d'un dimère (cf § II.3.B). En utilisant un mutant de la Cys C_R (ci-dessous) pour stabiliser l'intermédiaire acide sulfénique instable, sa formation a pu être mise en évidence par des réactifs spécifiques, le NBD-Cl et la dimédone, identifiées par leurs propriétés chromophores ou par spectrométrie de masse, respectivement (Ellis and Poole, 1997a, 1997b) (Fig. 10).

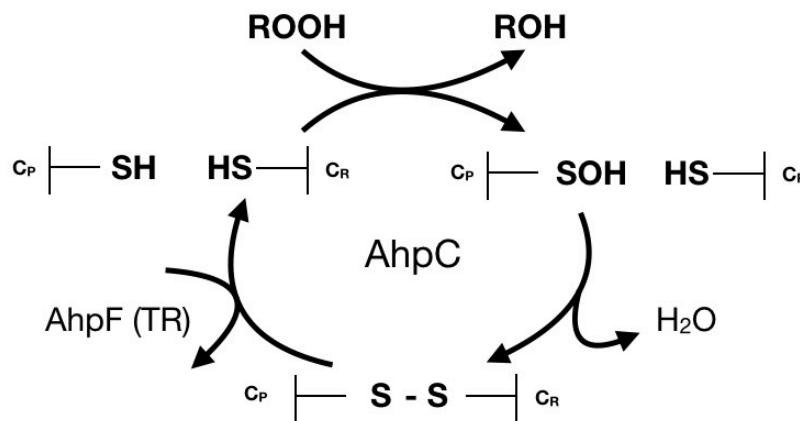


Fig. 10. Cycle peroxydase d'AhpC, mis en évidence par Ellis et Poole (1997). ROOH : peroxyde ; C_P : Cys Peroxydasique,; C_R: Cys de recyclage ; AhpF est une TR NAD(P)H dépendante.

Les Prxs furent classées initialement en fonction de la présence ou non de la Cys C_R, définissant ainsi trois sous-familles : la sous-famille des 2-CysPrx typiques, dont la C_R forme un pont disulfure inter-monomères avec la C_P, comme c'est le cas pour AhpC ; la sous-famille des 2-CysPrx atypiques, caractérisée par la formation d'un pont disulfure intra-moléculaire autrement dit les deux cystéines se situent sur le même monomère ; et les 1-CysPrxs, réduites par un autre système réducteur comme le glutathion ou une Cys provenant d'un autre partenaire (Chae et al., 1994; Wood et al., 2003a), Fisher 2011) (Fig.11). L'espèce oxydée formée (Trx par exemple) est ensuite réduite par un système de recyclage spécifique. Ainsi il est intéressant de comparer les Prx à "un système couplé de réactions redox en cascade" (Pillay et al., 2009).

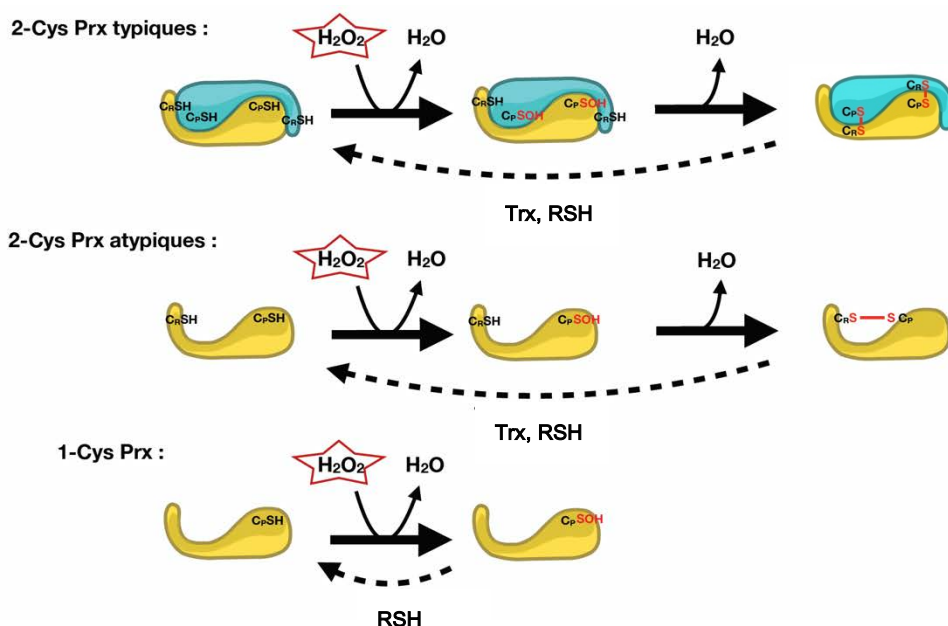


Fig. 11. Mécanisme catalytique des trois types de Prx. Le résidu Cys peroxydasique C_P réagit avec le substrat peroxyde. Chez les 2-CysPrx typiques, la C_P réagit avec le résidu Cys C_R sur la deuxième sous-unité du dimère (A), tandis que chez les 2-CysPrx atypiques, la C_R est située sur la même chaîne polypeptidique (B). Le dérivé d'acide sulfénique des 1-CysPrx est régénéré directement par un donneur d'électrons sous forme thiol (C). ROOH : peroxyde ; RSH : donneur d'électrons ; Trx : thiorédoxine (Rhee et al., 2005).

B. Nouvelle classification

Cette approche est fondée sur l'identification dans les structures tridimensionnelles de fragments de séquences situés dans l'environnement du site actif de l'enzyme. Ces fragments rassemblés en motifs, sont ensuite utilisés pour rechercher et classer des sous-familles apparentées dans les banques de séquences. Une base de données en ligne a également été créée, PREX pour Peroxiredoxin Classification Index (Soito et al., 2011). Cette étude a permis de décrire six sous-familles de Prx : Prx1, Prx5, Prx6, PrxQ, Tpx et AhpE. Leur distribution phylogénétique est présentée dans le tableau 2. La présence et la **position de la C_R** est prise en compte pour distinguer les Prx, mettant en évidence par exemple la présence d'une extension C-terminale chez les Prx1 et Prx6. Les membres de la sous-famille Prx1 (AhpC/Prx1) correspondent à la sous-famille des 2-CysPrx typiques, incluant notamment AhpC de *S. typhimurium*, Tsa1 et 2 de *S. cerevisiae*, les 2-CysPrx d'*A. thaliana*, les PrxI à IV des mammifères. Les PrxV et PrxVI de mammifères

appartiennent respectivement aux sous-familles Prx5 et Prx6. Les mammifères n'ont pas de représentants des familles PrxQ, Tpx et AhpE. Les PrxD de plante comme *Populus trichocarpa* appartiennent à la famille des Prx5 (Rouhier et al., 2004) (Tableau 2).

Sous-famille	Nombre de membres	Membres canoniques	Distribution phylogénétique	Position de la C _R si présente
AhpC/Prx1	1059	<i>S. typhimurium</i> AhpC <i>H. sapiens</i> PrxI à PrxIV <i>S. cerevisiae</i> Tsa1 et 2 <i>A. thaliana</i> 2-Cys Prx	Archées, Bactéries, Plantes, Eucaryotes	C-terminale
Prx5	517	<i>H. sapiens</i> PrxV <i>S. cerevisiae</i> Ahp1 <i>P. trichocarpa</i> PrxD	Bactéries, Plantes, Eucaryotes	Hélice α 5
Prx6	493	<i>H. sapiens</i> PrxVI <i>S. cerevisiae</i> mTpx1, nTpx1 <i>A. thaliana</i> 1-Cys Prx	Archées, Bactéries, Plantes, Eucaryotes	Pas de C _R
PrxQ/BCP	1115	<i>E. coli</i> PrxQ Plantes PrxQ	Bactéries, Plantes	Hélice α 2
TPx	307	<i>E. coli</i> TPx	Bactéries	Hélice α 3
AhpE	25	<i>M. tuberculosis</i> AhpE	Bactéries	Pas de C _R

Tableau 2. Tableau récapitulatif des sous familles de Prx d'après l'outil de classement PREX. <https://csb.wfu.edu/prex/>. Adapté de (Nelson et al., 2011) dernière mise à jour : juin 2012.

La levure *S.cerevisiae* possède cinq Prx : Tsa1 (la plus abondante et constitutive) et Tsa2 (inductible) toutes deux cytosoliques et appartenant à la famille des 2-CysPrx typiques ou Prx1 ; Ahp1 (cytosolique), nTpx (nucléaire) appartenant à la famille des 2-CysPrx atypiques ou Prx5 ; et enfin mTpx (mitochondriale) appartenant à la famille Prx6 (Fourquet et al., 2008; Lee et al., 1999; Park et al., 2000) (Tableau 3). Chez la levure comme dans les autres organismes, les Prx cytosoliques de la famille Prx1 comptent parmi les protéines les plus fortement exprimées dans la cellule. Ainsi, malgré leur découverte bien plus tardive que la catalase ou les Gpx, les Prx sont fortement majoritaires et sont les peroxydases primordiales chez la plupart des organismes.

Enzyme	Nombre de molécules/cellule	Famille Prx	Localisation cellulaire
Tsa1	378 000	Prx1	Cytosolique
Tsa2	4800	Prx1	Cytosolique
Ahp1	16 200	Prx5	Cytosolique
mTpx	4500	Prx6	Mitochondriale
nTpx	1840	Prx6	Nucléaire
GPx1	Faible détection		
GPx2	2000		
Gpx3	8100		
Catalases	1200		

Tableau 3. Estimation des niveaux d'expression en comparaison avec les GPx et les catalases chez *S.cerevisiae*. Les cinq Prx de la levure sont citées. La concentration intracellulaire de Tsa1 est de l'ordre de 20 μ M (Karplus, 2015).

3. Structure des Prx

A. Repliement

Depuis leur découverte, plus de 200 structures cristallographiques et en solution (RMN) de Prx ont été résolues. Leur site actif et leur état oligomérique sont désormais clairement documentés. Les Prx dérivent toutes d'un repliement ancestral de type Trx (Copley et al., 2004; Martin, 1995) (Fig.12).

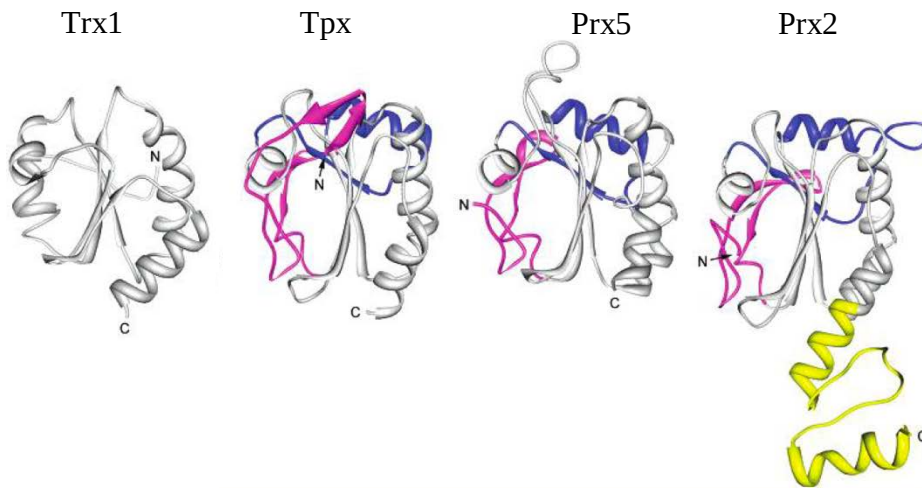


Fig. 12. Structures tridimensionnelles de *E.coli* Trx1 (1XOA), *S.pneumoniae* Tpx (1PSQ), hPrx5 (1HD2) et hPrx2 (1QMV) montrant le repliement canonique Trx en gris et les extensions ou insertions en rouge, bleu et jaune (seuls les monomères sont représentés). (Copley et al., 2004)

Les Prx possèdent donc un repliement commun composé de cinq hélices α et sept brins β antiparallèles formant un feuillet central. La C_P est située dans le premier tour d'hélice α_2 . L'hélice α_2 est plaquée contre les brins β_3 et β_4 , flanquée des hélices α_3 et α_5 . Chez les Prx1, la C_R se trouve dans la région C-terminale (non représentée dans la Fig. 13). Ceci implique que les deux résidus se trouvent à une distance incompatible avec la formation d'un pont disulfure intra monomère, et explique la formation d'une structure active en dimère.

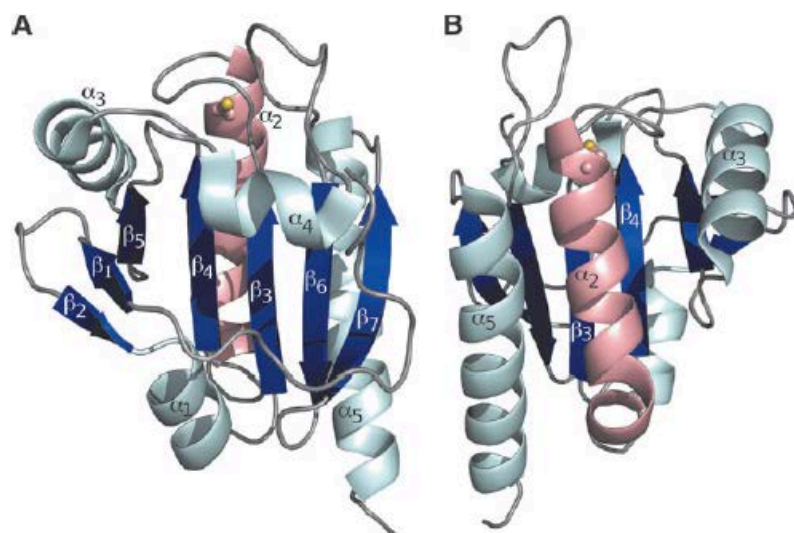


Fig. 13. Structure tridimensionnelle d'une Prx monomérique de la famille BCP. Les hélices α sont représentées en bleu ciel, l'hélice α_2 qui contient la C_P est en rose (représentée en mode "ball and stick"), les brins β sont en bleu foncé. Les vues A et B sont l'effet d'une rotation à 180° autour de l'axe y (Hall et al., 2011).

B. L'unité active : le dimère

Mis à part les enzymes de la famille BCP, les Prx s'associent sous forme d'homodimères. Les dimères de type B (pour β -sheet) s'associent via les brins $\beta 7$ des deux sous-unités, de sorte à former un large feuillet β twisté à 14 brins. Dans cette organisation, les deux sous-unités présentent une symétrie « tête-bêche » (Fig. 14). En revanche, les dimères de type A (pour ancien ou alternatif) s'associent principalement *via* des boucles au niveau des extrémités C-terminales des brins $\beta 3$ à $\beta 7$. Les Prx des sous-classes Tpx, PrxQ et Prx5 sont des dimères tête-bêche de type A, les Prxs des sous-classes AhpE et Prx6 sont des dimères de type B (Fig. 15). Chez les Prx1, le dimère constitue l'unité active de base permettant la formation du site actif. En effet la configuration tête-bêche des deux monomères résulte en la formation de deux sites actifs comportant la C_P d'un monomère en capacité de réagir avec la C_R de la seconde sous-unité du dimère.

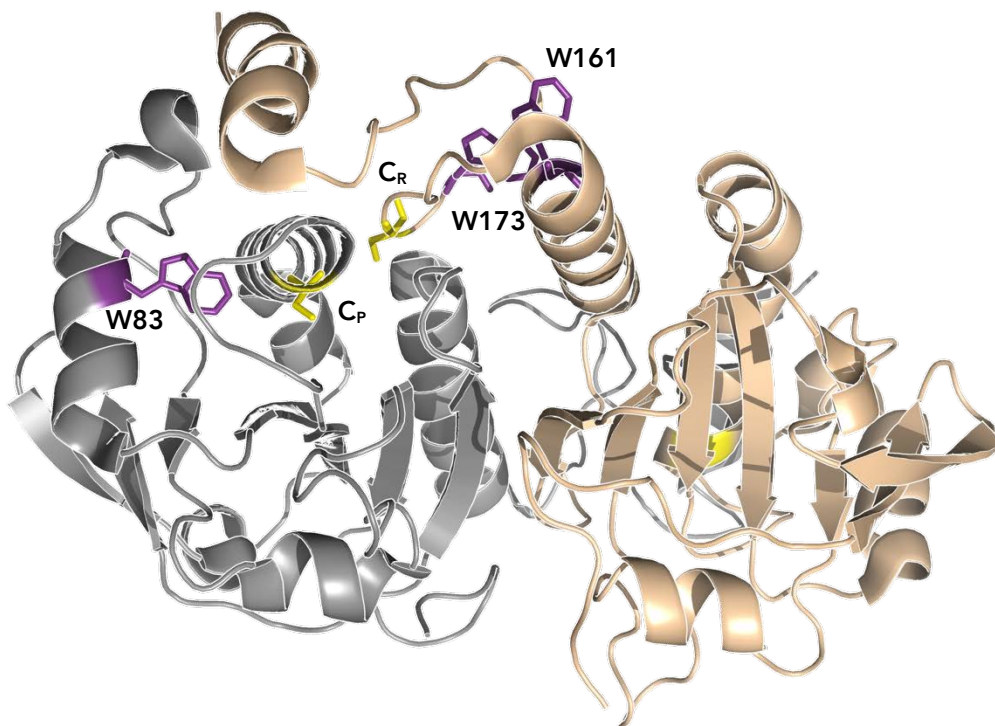


Fig. 14. Représentation de la structure de l'unité dimérique de type B de Tsa1 sous forme réduite. Les monomères sont en gris et beige, les Cys sont indiquées en jaune, la distance entre la C_P et la C_R est d'environ 10 Å (les Trp proches du site actif sont en violet) code pdb:3SBC.

C. Architecture oligomérique

Plus étonnante a été la découverte de la conformation en anneau ou tore ou "doughnut", des Prx de la sous-famille Prx1. Observés plusieurs années en amont par microscopie électronique de fantômes d'érythrocytes (Cao et Lindsay 2018, pour revue), ces anneaux sont le résultat de l'assemblage au niveau de l'interface A, de 5 voire 6 unités dimériques de Prx et sont donc des décamères ou des dodécamères (Fig. 15 et Tableau 4). Ces multimères de haut poids moléculaire (>200kDa) laissent imaginer d'autres fonctions liées à cette structure particulière.

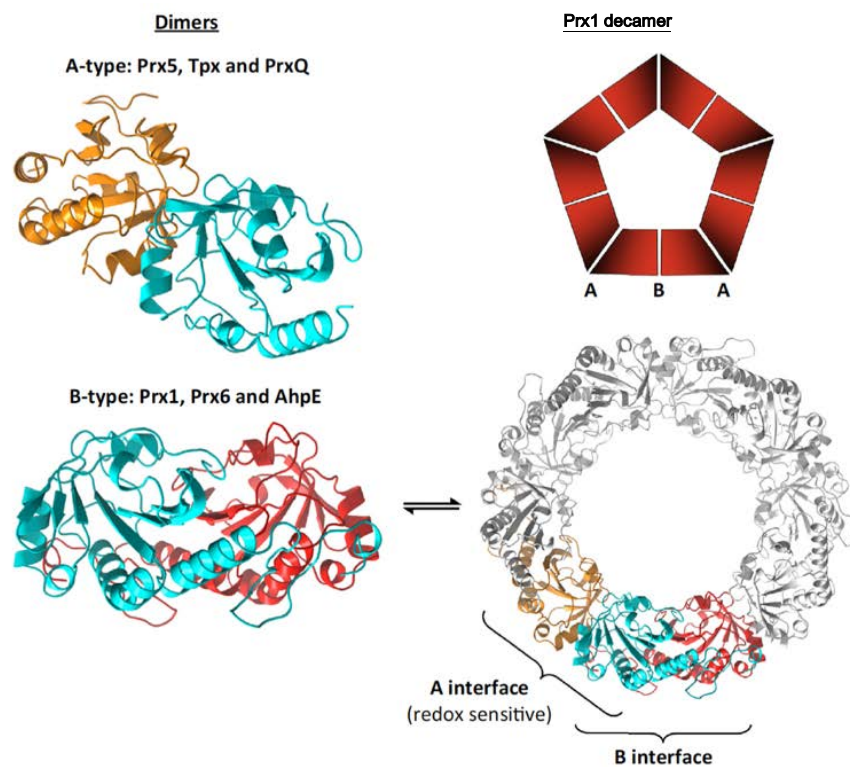


Fig. 15. Structures quaternaires des Prxs. Les structures représentées sont celles de la PrxQ de *A. pernix* pdb:4GQF (dimère de type-A) et de AhpC de *S. typhimurium* pdb:4MA9 (dimère de type-B puis décimère). (Perkins et al., 2015)

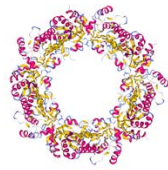
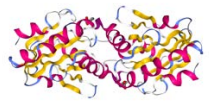
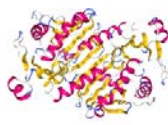
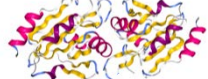
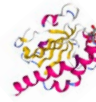
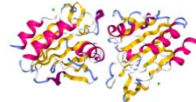
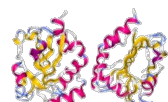
Prx	Sous-famille	Etat oligomérique	PDB	
Tsa1 <i>S.cerevisiae</i>	Prx1	décamère	3SBC (Tairum et al., 2012)	
AhpC <i>S.typhimurium</i>	Prx1	décamère	4MA9 (Perkins et al., 2013)	
Prx5 <i>H.sapiens</i>	Prx5	Dimère A-type	2VL2 (Smeets et al., 2008)	
Prx6 <i>H.sapiens</i>	Prx6	Dimère B-Type	5B6M (Kim et al., 2016)	
PrxQ <i>S.todokaii</i>	PrxQ	Dimère A-type	4G2E (Perkins et al., 2012)	
BCP <i>S.solfataricus</i>	PrxQ	Monomère	3DRN (D'Ambrosio et al., 2009)	
Tpx <i>E.coli</i>	Tpx	Dimère A-type	3HVX (Hall et al., 2009)	
AhpE <i>M.tuberculosis</i>	AhpE	Dimère B-Type	1XXU (Li et al., 2005)	

Tableau 4: Liste non exhaustive des structures de Prxs en fonction de leur sous-famille respective (source: Protein Data Bank.org)

4. Mécanisme catalytique des Prx

A. Une réactivité exceptionnelle de la Cystéine peroxydasique C_P

La première étape du mécanisme catalytique est l'attaque nucléophile du groupement thiol de la Cys C_P sur le substrat peroxyde. La principale caractéristique de ce résidu est sa capacité à être oxydé par les peroxydes avec une constante de vitesse de second ordre très élevée mesurée entre 10^5 et $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Peskin et al., 2007; Winterbourn, 2013; Winterbourn and Hampton, 2008). Cette constante de vitesse est plus élevée de 5 à 7 ordres de grandeur comparée à la réactivité de la Cys libre, les

thiols, ou encore de petits composés comme l'iodoacétamide ou des composés oxydants comme les chloramines. Comme nous l'avons vu précédemment, cela implique que ce thiol soit activé au sein du site actif. Par exemple, le pKa de la C_P de Tsa1 de *S. cerevisiae* au sein du site actif de l'enzyme est fortement abaissé par rapport à un résidu Cys non activé (pK 8,9 dans le glutathion), ce qui lui permet d'être sous forme thiolate à pH physiologique (pKa = 5,4) (Ogusucu et al., 2007).

Cependant, l'abaissement du pKa seul ne suffit pas à expliquer une telle réactivité avec les peroxydes. Des études structurales et de mutagenèse dirigée ont élégamment montré que l'environnement de la C_P était corrélé à cette constante de vitesse très élevée (Hall et al., 2010; Nagy et al., 2011). Au sein du site actif, des résidus conservés tels qu'une Arginine et une Thréonine, ainsi que des groupements NH appartenant à la chaîne peptidique (résidus C_P et C_P-1) participent à la stabilisation de l'état de transition en formant des liaisons hydrogène avec le peroxyde ; une Pro conservée protège le thiol et oriente les chaînes principales des résidus précités. Ces interactions facilitent la polarisation et la rupture de la liaison O-O conduisant à l'oxydation du thiolate de la C_P en acide sulfénique (SOH). De plus, le positionnement de la C_P au sein du premier tour d'hélice α 2 est essentiel pour la présentation des groupements NH des résidus C_P et C_P-1 (Fig. 16) (Hall et al., 2010).

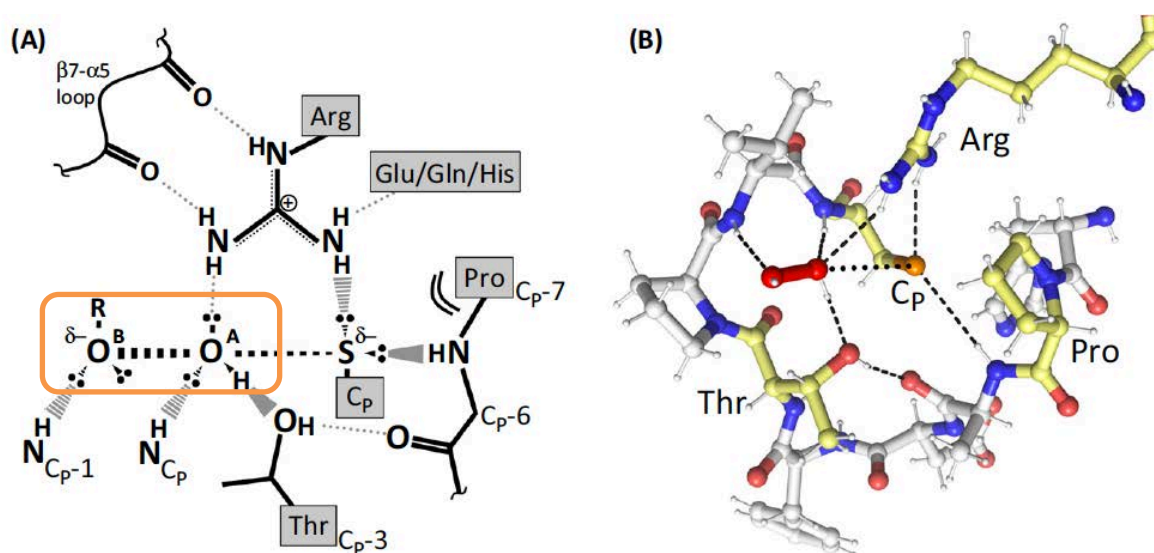


Fig. 16. Représentation du site actif de ApTPx. A. Les liaisons hydrogène générées par les acides aminés essentiels autour du substrat peroxyde (cadre orange) sont indiqués en gris. Le positionnement du substrat est ainsi optimal pour l'attaque de la C_P (réaction de type S_N2) (Hall et al., 2010) B. Représentation d'une molécule de peroxyde d'hydrogène lié au site actif avec les quatre résidus conservés (jaune pâle), les liaisons H sont indiquées par des tirets.

L'interaction entre la C_P et l'atome d'oxygène de H₂O₂ attaqué par le thiolate est représentée par des points ronds. *ApTPx*, code pdb: 3A2V (Perkins et al., 2015).

B. Le cycle catalytique peroxydase des Prxs de type Prx1

Au cours de la réaction peroxydase, l'intermédiaire acide sulfénique formé est réduit par attaque d'un thiol, qui dans le cas des enzymes de type Prx1, est porté par une Cys C_R située sur la seconde sous-unité du dimère. Or, à l'état réduit, les structures 3D de ce type de Prx montrent que les Cys C_P et C_R sont situées à des distances et orientations incompatibles avec la formation d'un pont disulfure. (Fig. 14).

Ceci implique un important **changement conformationnel** au cours duquel la région C-terminale contenant la Cys C_R et l'hélice α 2 contenant la Cys C_P, subissent un dépliement partiel pour permettre la seconde étape chimique du cycle, la réduction de l'intermédiaire C_P–SOH par la C_R. Ainsi, des études structurales ont révélé l'existence de deux conformations distinctes, définies dans la suite du mémoire par **FF** (fully folded, correspondant à la conformation de l'enzyme réduite) et **LU** pour locally unfolded (correspondant à la conformation adoptée par la forme contenant un pont disulfure C_P-C_R) (Wood et al., 2003b, 2003a).

Ainsi, la réaction enzymatique des Prx suit un cycle catalytique comprenant les différentes étapes suivantes : l'attaque de la cystéine peroxydasique C_P sur le substrat peroxyde conduisant à la formation d'un acide sulfénique sur le résidu Cys catalytique ; une étape de changement conformationnel **FF**→**LU** (qui sera développée dans le Chap.III), qui permet la formation d'un pont disulfure inter-monomères entre la C_P et la C_R et finalement le recyclage du pont disulfure par la Trx. La Trx oxydée sera finalement réduite par la TRNADPH-dépendante (Fig. 17) (Karplus, 2015; Wood et al., 2003b). Dans le cas d'AhpC, une Prx1 bactérienne, une étape supplémentaire a été proposée sur la base d'études en cinétiques rapides, impliquant la reconnaissance et la fixation du substrat au sein du site actif (Parsonage et al., 2015).

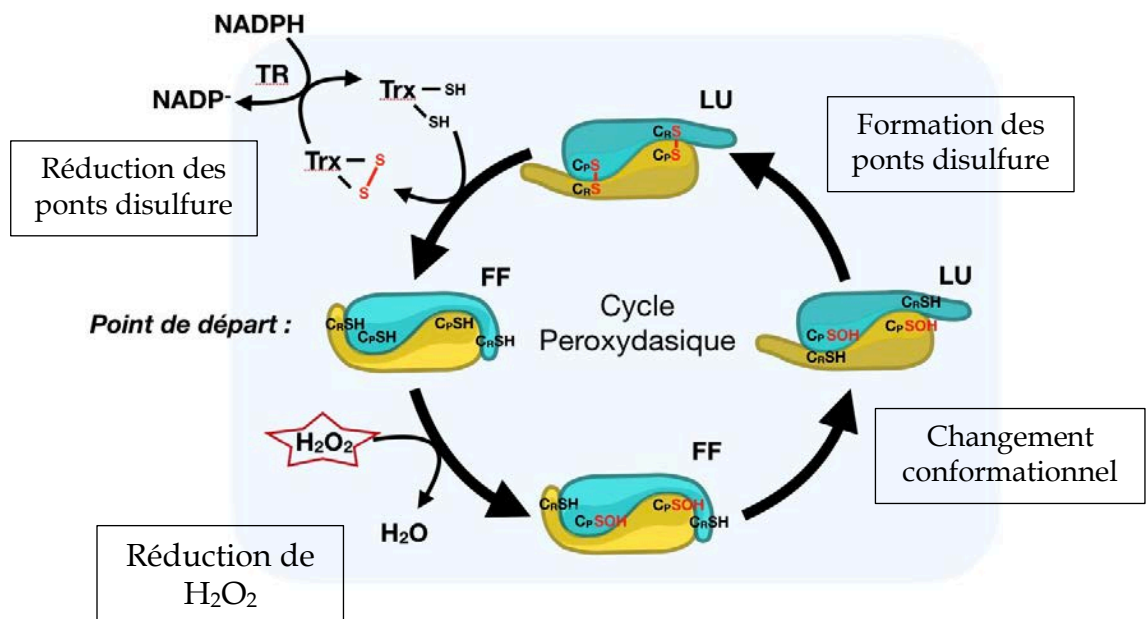


Fig. 17. Schéma représentant le cycle peroxydasique et les différents états redox et conformationnels des Prx de type Prx1. L'unité catalytique est le dimère tête-bêche représenté en jaune et vert. Trx = thiorédoxine, TR = thiorédoxine reductase, FF = fully folded, LU = locally unfolded. Adapté de (Karplus, 2015)

III. La Suroxydation des Prx: perte ou gain de fonction ?

1. Le phénomène de suroxydation : une modification post-traductionnelle

A. Découverte

Les Prxs sont exceptionnellement réactives avec les peroxydes, néanmoins l'inactivation progressive de leur activité peroxydase au cours du temps a été observée dès le début des études *in vivo* et *in vitro* (Yang et al., 2002)(Woo et al., 2003). Une étude protéomique réalisée en 2002 par Rabilloud et coll., a révélé que les Prx humaines de la famille des Prx1 (précédemment nommées 2-CysPrx typiques) sont sensibles à une "suroxydation" de leur cystéine catalytique C_P. En effet, le traitement de cellules humaines par des concentrations croissantes d'H₂O₂ analysé par électrophorèse bidimensionnelle couplée à une identification des espèces protéiques par spectrométrie de masse, a permis de conclure à la formation d'une espèce suroxydée sous forme acide sulfinique sur le thiol de la C_P (Fig. 18).

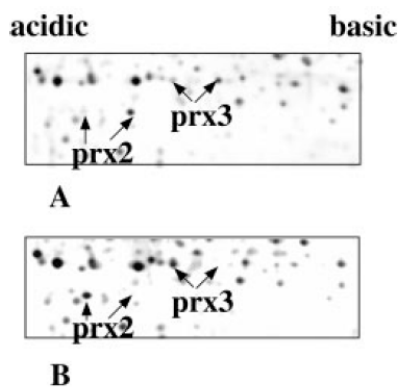


Fig. 18. Détection par électrophorèse bidimensionnelle d'une forme acide sulfinique des Prx. A. conditions normales de culture de cellules Jurkat. **B.** conditions de stress oxydant : apparition des formes acides de Prx2 et Prx3.

Comment interpréter ce résultat ? Lors de la catalyse, la C_P des Prx de type Prx1 (2-Cys Prx) sous sa forme acide sulfénique SOH, peut réagir à nouveau avec une deuxième molécule de peroxyde avant la formation du pont disulfure. Cette réaction conduit à la formation d'un nouvel état redox de la C_P sous forme acide sulfinique SO₂H (Rabilloud et al., 2002) (Fig. 19). Certaines études ont montré qu'une réaction avec une troisième molécule de peroxyde pouvait conduire à la formation d'une C_P

sous forme acide sulfonique SO_3H (Woo et al., 2003). L'apparition des formes suroxydées des Prxs peut être détectée *in vivo* et *in vitro* car cette forme inactivée porte une charge négative supplémentaire permettant sa séparation sur gel d'électrophorèse bidimensionnel ou monodimensionnel à focalisation isoélectrique. Il existe également des anticorps spécifiques de la modification SO_2/SO_3 pour les Prx de type Prx1, largement utilisés pour quantifier par Western Blot les formes sulfinylées, en fonction des conditions ou des traitements appliqués aux cellules (Woo et al., 2003) (Cao et al., 2014).

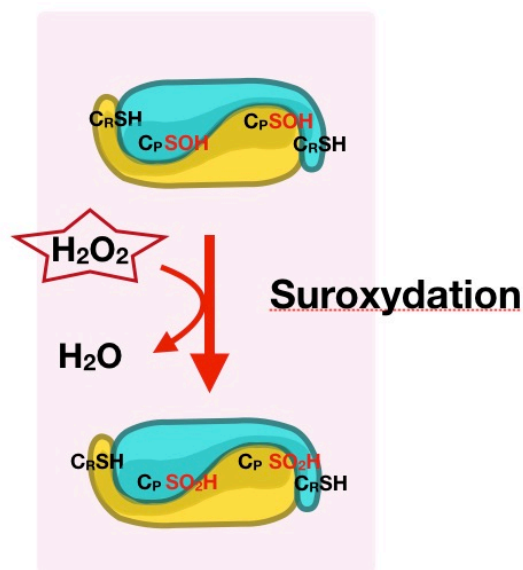


Fig. 19. Schéma représentant la voie de suroxydation des Prx de type Prx1. L'unité catalytique est le dimère tête-bêche représenté en jaune et vert. La C_P sous forme SOH (en rouge) se suroxyde en acide sulfinique SO_2H (Karplus, 2015).

Dans ces états d'oxydation, la Prx perd nécessairement sa fonction peroxydase. L'existence de cette suroxydation a été clairement établie non seulement pour les Prx1 humaines, mais également dans la plupart des organismes eucaryotes. Cependant, son rôle physiologique restait encore à être éclairci et les différentes hypothèses encore débattues seront développées §III.2.

B. La suroxydation est dépendante de motifs structuraux conservés

Dans l'article séminal de Wood et al 2003, la sensibilité à la suroxydation des Prx de type Prx1 a été associée à des propriétés structurales particulières. En effet les Prx1 eucaryotes possèdent deux motifs conservés dans l'environnement du site actif, absents chez les Prx résistantes à la suroxydation comme les Prx d'origine procaryote. Le premier motif est une boucle portant la séquence GGLG à proximité immédiate de la C_P, et le second est localisé dans l'hélice $\alpha 5$ C-terminale contenant le motif hydrophobe YF (Fig. 20). Au cours du cycle catalytique, ces éléments structuraux doivent impérativement se réorganiser pour permettre la transition conformationnelle FF→LU et la formation du pont disulfure entre les C_P et C_R. La présence de ces éléments structuraux confèrerait à la conformation FF des Prx1 eucaryotes plus de rigidité comparée aux Prx1 dites robustes ou résistantes (Fig. 20). L'intermédiaire CP-SOH formé serait stabilisé, ce qui augmenterait la probabilité de l'attaque d'une deuxième molécule de peroxyde d'hydrogène et permettrait la compétition avec la formation du pont disulfure.

Concrètement lors de la transition conformationnelle, suite à la formation de l'acide sulfénique sur la C_P initialement en conformation FF, il se produit un dépliement partiel de l'hélice $\alpha 2$ faisant sortir la C_P-SOH du site actif (rotation à 180°) et un dépliement partiel de la région C-terminale et de l'hélice $\alpha 5$ auparavant bien structurée (Perkins et al., 2016). L'absence des motifs GGLG et de l'hélice contenant le motif YF, faciliterait ces changements. Ces motifs sont conservés chez toutes les Prx1 sensibles à la suroxydation, comme l'illustre un alignement de séquence présentant les différences entre les séquences de Prx1 sensibles à la suroxydation (Tsa1, Prx1 à 3 humaines) et résistante à la suroxydation (AhpC) (Fig. 21).

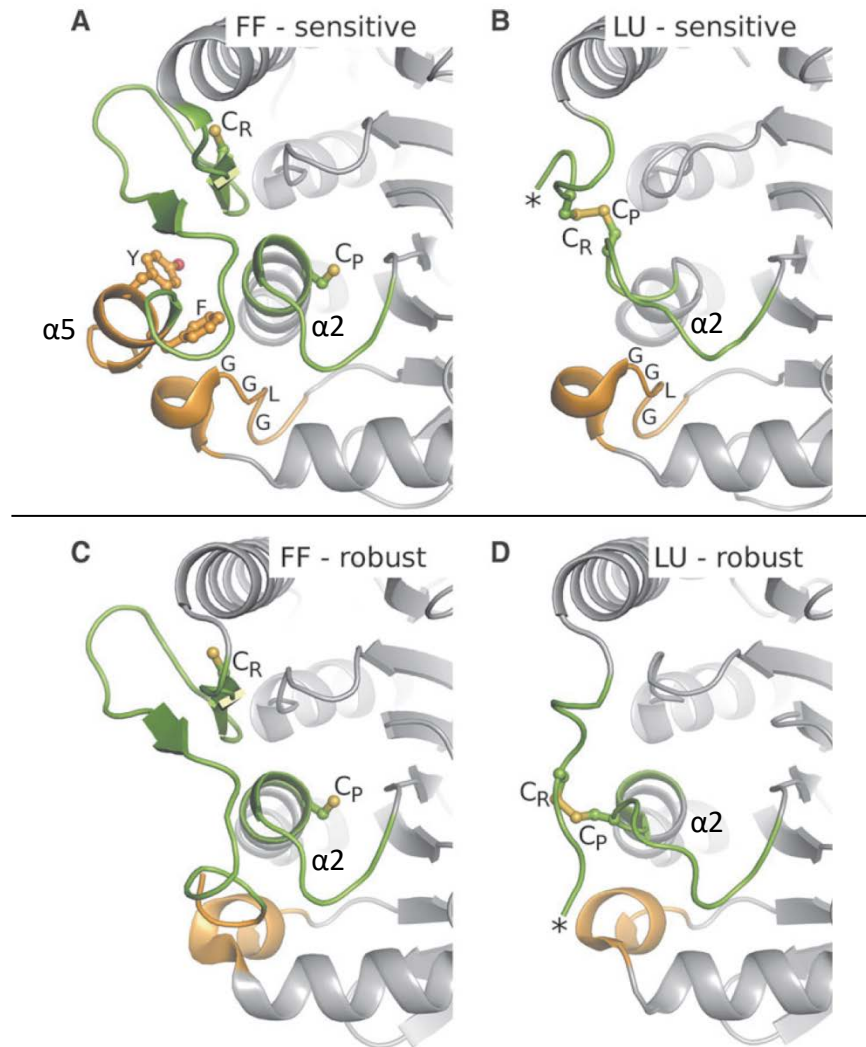


Fig. 20. Représentation des différences structurales entre Prx sensible ou résistante à la suroxydation : **A.** forme réduite et **B.** forme oxydée pont disulfure de la Prx1 de rat, enzyme sensible à la suroxydation, présence des motifs YF et GGLG (en orange). **C.** forme réduite et **D.** forme oxydée pont disulfure de AhpC de *S. typhimurium*, une enzyme résistante à la suroxydation, ne possédant pas les motifs YF et GGLG. (Hall et al., 2011)

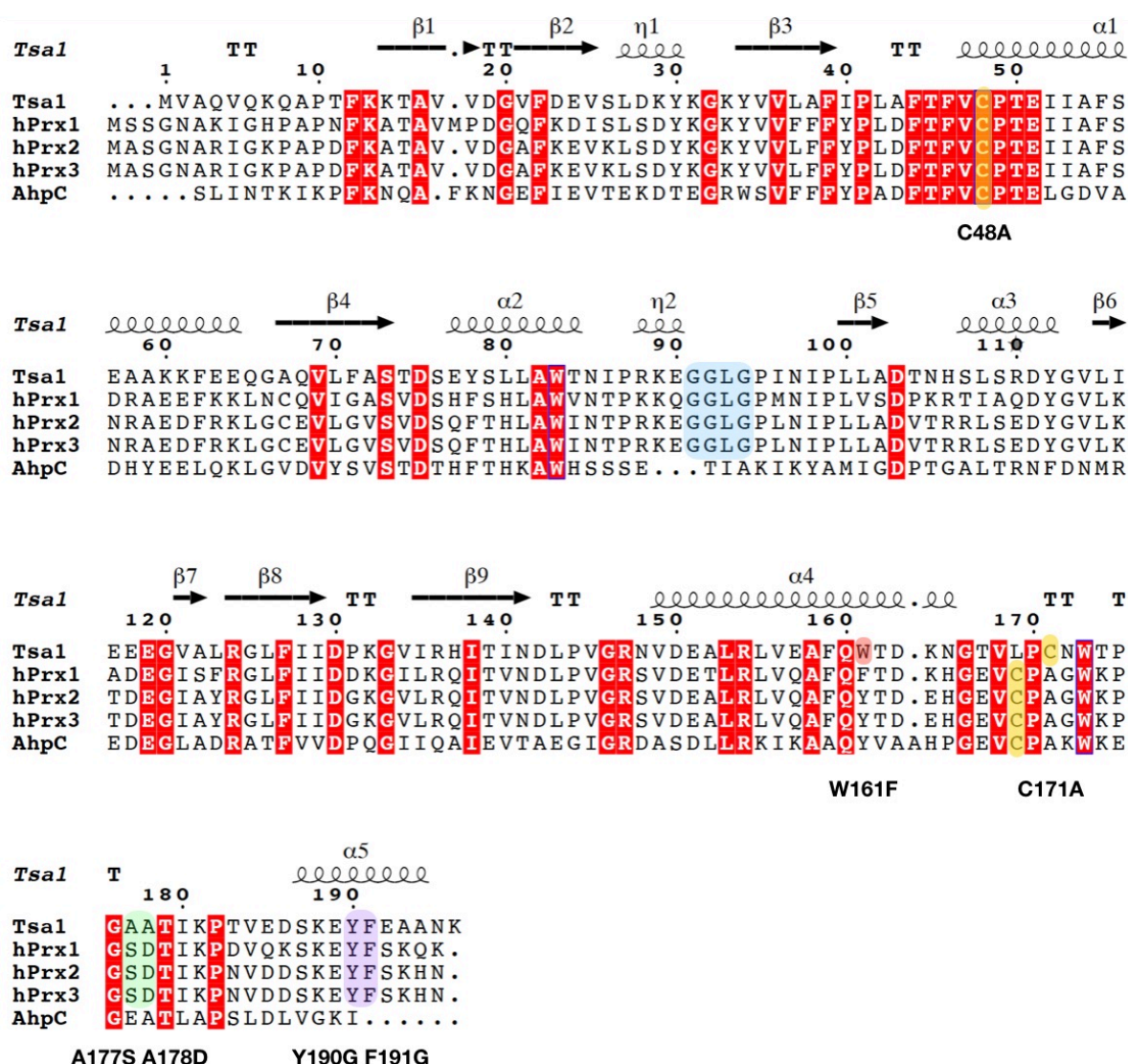


Fig. 21. Alignement de séquences de Prx1. Les Cys C_P (C48) et C_R (C171) sont représentées en jaune. Les différences structurales entre Prx sensibles ou résistantes à la suroxydation consistent en la présence des motifs YF (violet) et GGLG (bleu). Les mutants utilisés dans la suite de notre étude sont : Tsa1 C48A (orange), C171A (jaune), W161F (rouge), A177S A178D (vert), Y190G F191G (violet). Numérotation basée sur la Tsa1 *S. cerevisiae*. Les éléments de structure secondaire de la structure de Tsa1 sous forme réduite sont indiqués au-dessus de l'alignement (code pdb: 3sbc).

C. Une sensibilité à la suroxydation intra et inter espèces variable.

Initialement, le phénomène de suroxydation a été décrit et présenté comme une propriété binaire : les Prx1 eucaryotes étaient sensibles, les Prx1 procaryotes étaient résistantes. Cependant il est apparu par la suite que toutes les Prx n'étaient pas égales face à ce phénomène et possédaient, en réalité un niveau de sensibilité à la suroxydation propre.

Le phénomène a d'abord été observé *in vivo* : chez l'Homme, les Prx1, 2 et 3 ont été caractérisées pour leur propension à s'oxyder soit sous forme pont disulfure, soit sous forme suroxydée. Les formes redox étaient détectées par leur mobilité électrophorétique, la forme disulfure étant un dimère, et par immunoblot, avec des anticorps anti SO₂/SO₃ (Cox et al., 2009)(Fig. 22). Cette approche a ensuite été améliorée pour l'étude de la sensibilité de ces enzymes *in vitro* sur les protéines recombinantes, en utilisant la spectrométrie de masse pour quantifier plus précisément la fraction de chaque forme oxydée. En utilisant un modèle simplifié, qui ne tenait pas compte de la transition FF/LU, l'étude a conclu que la Prx3 mitochondriale possède la constante de vitesse de formation du pont disulfure la plus élevée. Étant donné sa localisation mitochondriale et son environnement plus oxydant, les auteurs ont proposé qu'au sein de Prx3, le pont disulfure est formé plus rapidement pour limiter la suroxydation et l'inactivation (Haynes et al., 2013a; Peskin et al., 2013).

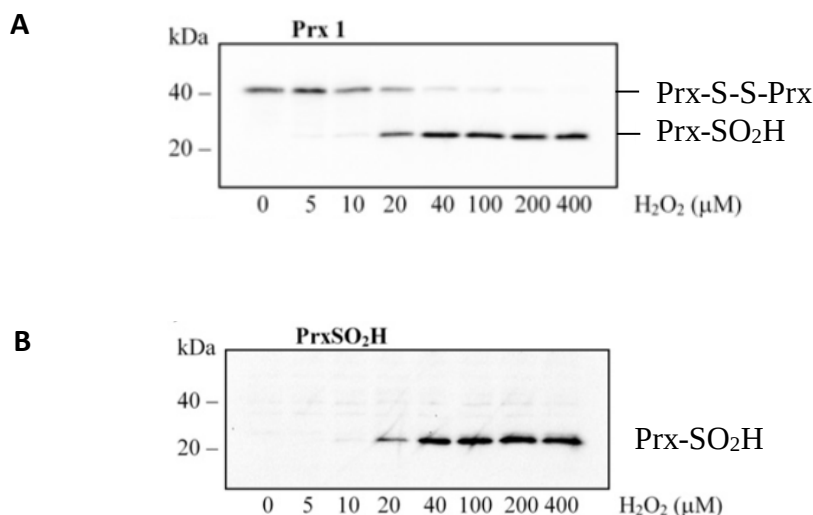


Fig. 22. Détection par immunoblot des différents états d'oxydation des Prx. **A.** Détection par un anticorps dirigé contre les Prx. **B.** Détection par un anticorps dirigé contre les fonctions SO₂/SO₃ (Cox et al., 2009).

Une méthode de quantification de la sensibilité à la suroxydation a ensuite été développée par une autre équipe, permettant d'évaluer la vitesse d'inactivation par rapport à celle de la réaction peroxydase, donnant accès à la fraction d'enzyme suroxydée à chaque cycle catalytique (méthode détaillée §3). Cette approche permet de positionner sur une échelle de sensibilité, la propension d'une Prx à être sulfinylée (ou suroxydée sur le thiol de la C_P). L'indice proposé est le C_{Hyp1%}, indice qui traduit la concentration de peroxyde nécessaire pour suroxyder 1 % de l'enzyme lors d'un cycle catalytique (Nelson et al., 2013). Une valeur plus élevée de C_{Hyp1%} indique une plus grande résistance à la suroxydation. Par exemple, la Prx1 humaine est 10 fois plus résistante que la Prx2 (C_{Hyp1%} de 50 μM contre 5 μM). En revanche, la Prx3 est 25 fois plus résistante que Prx2 (C_{Hyp1%} de 127 μM contre 5 μM) (Bolduc et al., 2018a). Cette méthode a également permis d'évaluer le rôle de certains résidus sur la sensibilité à la suroxydation. Des motifs situés dans la région C-terminale, à l'interface dimère-dimère (interface A) et en surface du côté intérieur du décimère de Prx1 ont été identifiés comme agissant en combinaison dans le contrôle fin de cette propriété (Bolduc et al., 2018, Haynes et al., 2013).

In vivo, d'autres facteurs peuvent également influencer la sensibilité des Prx à la suroxydation, comme l'absence d'activité Trx réductase dans le réticulum endoplasmique. En effet, dans le cas de la Prx4 humaine localisée dans ce compartiment cellulaire, le faible niveau de recyclage de la forme oxydée pont-disulfure de l'enzyme entraîne l'accumulation de cette forme, ce qui limite la probabilité de formation de l'intermédiaire sulfénique donc la probabilité de suroxydation (Zito et al., 2011). La concentration locale en peroxydes, la vitesse de formation de l'acide sulfénique sur la Cys catalytique, la concentration intracellulaire de Prx, la disponibilité de la Trx et la présence de Srx, sont autant de facteurs influant potentiellement la suroxydation des Prx (Veal et al., 2017).

D. La suroxydation est réversible

La suroxydation des Prx a d'abord été considérée comme une modification irréversible, la fonction SO_2H n'étant pas réductible par les réducteurs physiologiques tels que les systèmes couplés GSH/Grx/GR ou Trx/TR. Un an après avoir caractérisé la fonction sulfinique présente sur les C_P des Prxs, une enzyme ATP- Mg^{2+} dépendante capable de restaurer l'activité peroxydase des Prx, a été découverte dans la levure *S. cerevisiae* par l'équipe de M.Toledano : la sulfirédoxine (Srx). Son expression est induite par H_2O_2 et l'invalidation de son gène *SRX1* provoque une sensibilité accrue au stress induits par H_2O_2 (Biteau et al., 2003).

Les Srx forment une famille de protéines conservées chez les eucaryotes et les cyanobactéries uniquement. D'un point de vue structural, Srx est un monomère d'environ 14 kDa possédant un repliement propre apparenté aux nucléases ParB, Srx est capable d'interagir spécifiquement avec les Prx de type Prx1, ou 2-Cys Prx typiques. Jönsson et al ont montré que l'interaction de Prx et Srx est stabilisée par deux interfaces, comprenant un enlacement de Srx par l'extrémité C-terminale de la Prx. La formation d'une seconde interface génère un site actif avec le monomère de Prx adjacent. La formation de cette interface permet la fixation de l'ATP ainsi que le rapprochement du groupement acide sulfinique de la Prx suroxydée et de la Cys catalytique de Srx (Fig. 24) (Jonsson et al., 2008, 2009).

La Srx catalyse la réduction de la fonction de la Prx suroxydée par une étape d'activation chimique de la fonction acide sulfinique par transfert de phosphate de

l'ATP, permettant de former une espèce acide phosphoryl sulfinique très réactive. Cet intermédiaire est réduit par attaque de la Cys catalytique de Srx pour former un intermédiaire thiosulfinate (Roussel et al., 2008). La Srx est ensuite régénérée dans son état réduit par un mécanisme qui varie en fonction de la présence d'une seconde Cys de recyclage. C'est le cas pour l'enzyme de levure, qui forme un intermédiaire oxydé par pont disulfure entre ses deux Cys, réduit par le système Trx (Roussel et al., 2009). Chez les mammifères et les plantes, la Srx ne possède qu'une seule Cys, le réducteur physiologique est ici le GSH (couplé à Grx/GR), comme démontré par Boukhenouna et al., en 2015 (Fig.23).

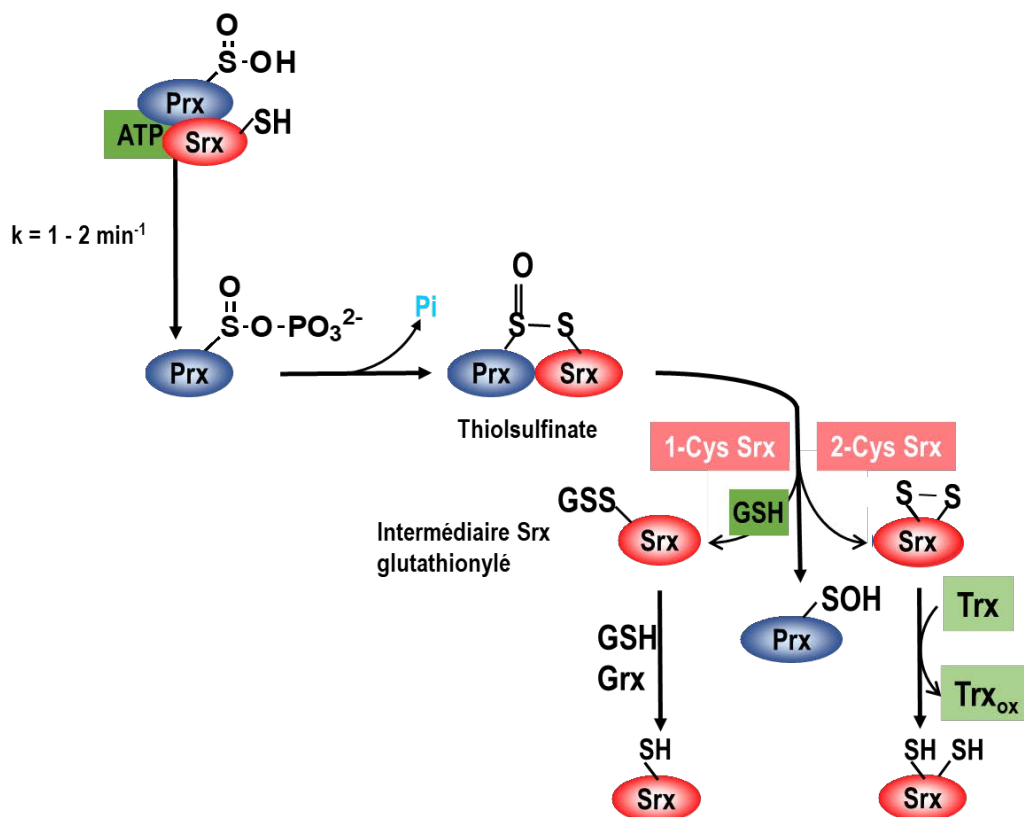


Fig. 23. Schéma représentant le mécanisme catalytique de Srx *S. cerevisiae*. La forme suroxydée de Prx est phosphorylée au niveau de l'acide sulfinique par une réaction ATP-Mg²⁺ dépendante médiée par Srx, puis la cystéine 84 de Srx attaque le résidu phosphorylé qui conduit à la formation d'un intermédiaire thiosulfinate. La Cys-48 de recyclage forme un pont disulfure avec la Cys-84, libérant Srx sous sa forme oxydée et la Prx sous forme SOH. Srx oxydée est ensuite prise en charge par le système réducteur Trx, TR, NADPH ou par le système réducteur Glutathion/Grx/GR/NADPH. Trx = thiorédoxine, Srx= Sulfirédoxine. (Boukhenouna et al., 2015).

Dans le complexe Prx/Srx, les deux sous-unités du dimère de Prx participent à la formation du complexe avec une molécule de Srx. Il est intéressant de noter qu'au sein de ce complexe, Srx occupe la position de la région C-terminale d'un monomère de Prx, contenant le motif YF. Ceci implique la réorganisation de la structure de cette région, qui rappelle la forme LU générée lors de la formation du pont disulfure entre C_P et C_R pendant le cycle catalytique peroxydase. Le complexe Srx-Prx1 suggère également que la molécule d'ADP devrait être relarguée et que d'autres changements structuraux additionnels dans l'une ou l'autre des protéines seraient nécessaires pour que Trx ou GSH réduisent l'intermédiaire thiosulfinate proposé. (Jönsson et al., 2008) (Fig. 24).

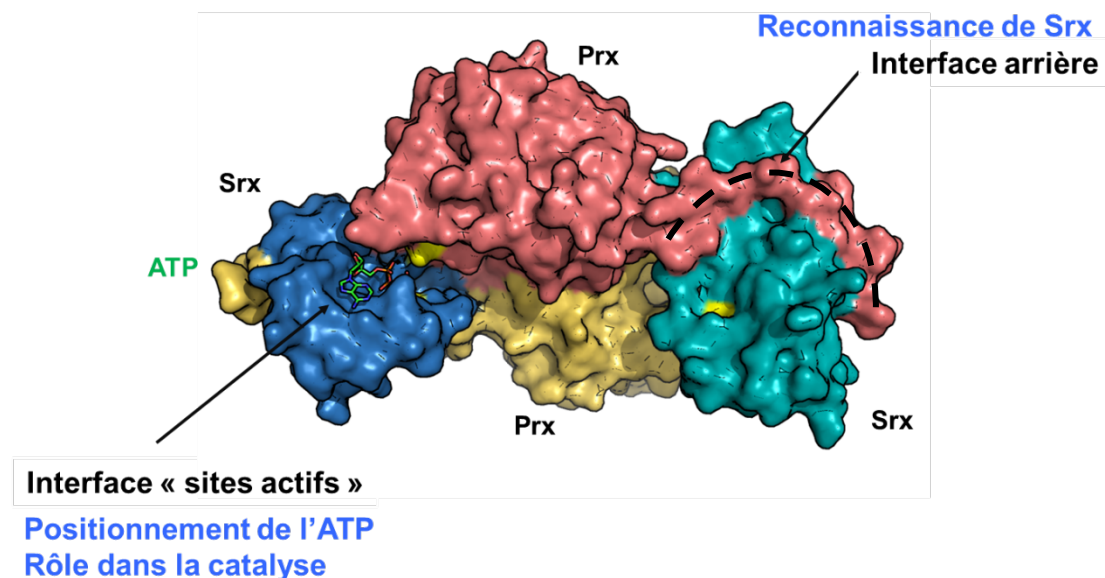


Fig. 24. Structure tridimensionnelle de l'interaction entre les Srx et Prx1 humaines. Représentation de type surface du complexe Srx-Prx1 à partir de données cristallographiques (PDB : 3HY2). Les deux monomères de Prx1 sont en rouge/jaune, ceux de Srx sont en bleu/vert. La molécule d'ATP liée est représentée en "ball and stick". Tirets noirs : une partie de la zone C-terminale non structurée de Prx1, enlance un monomère de Srx (Jönsson et al., 2008).

E. Régulation des Prx par suroxydation

La signification biologique de la suroxydation des Prx peut-elle se réduire à une modification synonyme de toxicité des peroxydes ? Dans cette hypothèse, la suroxydation serait une altération conduisant à l'inactivation de la fonction peroxydase, qui pourrait être réparée par Srx, à l'instar des Met oxydées réparées par les Msr. Des arguments contre cette hypothèse existent. En effet, la sensibilité à la suroxydation doit avoir été acquise au cours de l'évolution, puisqu'elle est limitée aux organismes eucaryotes. Il existe une enzyme retrouvée uniquement chez les eucaryotes permettant la réversibilité de cette modification de façon spécifique et ciblée, avec une interaction protéine-protéine spécifique. *In vivo*, la réversion de l'inactivation des Prx de type Prx1 par la sulfinyl réductase Srx représenterait donc un mécanisme de régulation des Prxs. La suroxydation serait plutôt une modification post-traductionnelle permettant de réguler des fonctions cellulaires des Prx, ajoutant des rôles physiologiques à ces protéines (Biteau et al., 2003; Nelson et al., 2011; Wood et al., 2003a). Ainsi, le phénomène de suroxydation aurait évolué conjointement avec l'apparition de l'activité sulfiréductrice de Srx, pour endosser des fonctions régulatrices des multiples fonctions cellulaires des Prx, présentées dans le paragraphe suivant.

2. Importance biologique de la suroxydation des Prxs

La formation d'un acide sulfinique SO_2H sur la C_P , assimilée à une modification post-traductionnelle, a été associée à plusieurs propositions de régulations : la modification peut, soit jouer un rôle dans la signalisation redox, par exemple en permettant l'accumulation de quantités suffisantes de peroxyde dans un but de signalisation cellulaire, c'est l'hypothèse du flood-gate (Wood et al., 2003b), soit permettre de coupler les rythmes circadiens avec la fonction des Prx (del Olmo et al., 2019; O'Neill and Reddy, 2011), soit conférer une fonction de chaperon aux Prx dans les cellules lors de conditions de stress oxydant.

A. Fonction dans la signalisation redox

a) L'hypothèse du " floodgate"

Une première hypothèse a été proposée dès la découverte du processus de suroxydation, liée à l'inactivation de l'activité peroxydase :

La théorie de la vanne ou de l'écluse (flood-gate) proposée par Karplus en 2003, propose que l'inactivation des Prx sous forme acide sulfinique permette l'augmentation transitoire et locale des niveaux de peroxyde d'hydrogène (Fig. 25). N'étant pas dégradé par les Prx, H_2O_2 pourrait exercer son rôle de messenger secondaire. La Srx, dont l'expression est induite par H_2O_2 , permettrait dans une seconde phase la réversibilité du processus, empêchant une trop forte accumulation de peroxydes, délétère pour la cellule (Wood et al., 2003b).

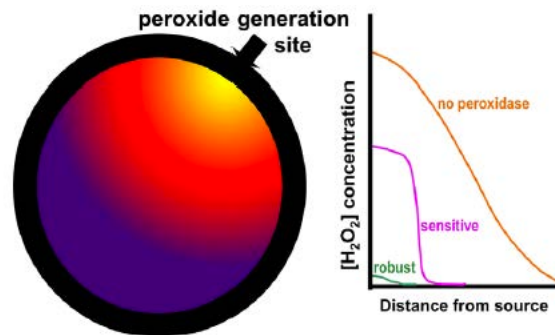


Fig. 25. Le concept du floodgate. Si le peroxyde était généré à un endroit dans une cellule, il formerait un gradient radial de peroxyde d'élévé (jaune) à faible (violet). L'image de droite montre comment le gradient de peroxyde se présenterait dans trois scénarios : sans peroxydase, un simple gradient (trace orange) serait généré ; avec une quantité élevée d'une peroxydase résistante, peu de peroxyde s'accumulerait (trace verte) ; et avec une quantité élevée d'une peroxydase sensible, le peroxyde s'accumulerait localement là où la peroxydase est inactivée mais pas plus loin car la peroxydase active est encore présente (trace rose). Ainsi, le "floodgate" permet à la cellule de ne pas être débordée par les peroxydes, en créant un compartimentage (Perkins et al., 2015).

b) Rôle de la régulation de la signalisation redox médiée par H_2O_2

Au-delà de leur rôle de peroxydase, la réactivité des Prx au niveau de leur Cys catalytique est mise à profit dans certaines voies de signalisation en tant que « capteur redox » pour détecter une augmentation de la concentration intracellulaire d' H_2O_2 , et pour transmettre le signal redox sous forme d'un pont disulfure à des cibles spécifiques. C'est le cas de ASK1 (apoptosis signaling kinase 1) dont

l'interaction redox avec une Prx permet l'activation de la voie ASK1/p38 (Jarvis et al., 2012) (Fig. 26). Dans ce cas, la suroxydation de la Prx bloque cette voie de signalisation.

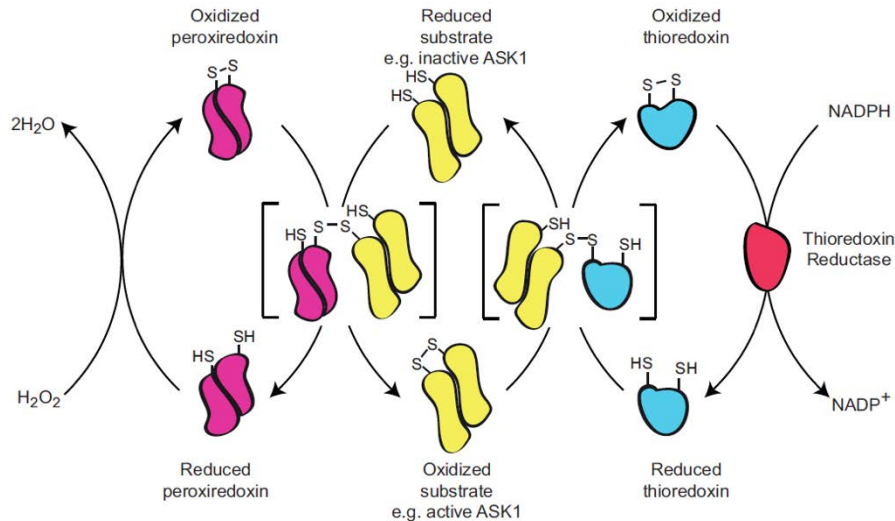


Fig. 26. Activation de ASK1 par Prx. Après réduction du peroxyde d'hydrogène par Prx, la formation d'un pont disulfure mixte permet l'oxydation d'ASK1 sous forme pont disulfure interne. ASK1 est ensuite prise en charge par le système réducteur Trx1/TR/NADPH.

Un autre cas bien documenté a été décrit dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* où la Prx Tpx1 oxyde le facteur de transcription AP1-like (Pap1) par échange de ponts disulfure, dissimulant le signal d'export nucléaire de l'enzyme (Calvo et al., 2013). Il en résulte son accumulation dans le noyau, ce qui conduit à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante de la cellule. De manière intéressante, à des concentrations en H_2O_2 élevées, Tpx1 se suroxyde et n'est donc plus compétente pour activer Pap1. La cellule enclenche alors une autre voie de signalisation impliquant la protéine kinase Sty1. Cette voie secondaire est aussi dépendante de Tpx1 mais opère indépendamment de son état d'oxydation. Elle conduit à l'induction de l'expression de Srx qui régénère la forme réduite de Tpx (Vivancos et al., 2005).

c) Participation des Prx suroxydées à des complexes de signalisation

Turner Ivey et al ont montré le rôle de la Prx1 dans un modèle de sénescence des cellules épithéliales mammaires humaines, induites par H_2O_2 . Dans ce modèle, l'activation spécifique de MKP-5 entraîne une diminution de l'activité MAPK p38. En effet dans le cadre d'une homéostasie en H_2O_2 normale, Prx1 favorise l'activité des MAPK phosphatases MKP-1 et MKP-5. Sous l'effet de l'augmentation du niveau de H_2O_2 , Prx1 devient suroxydée et forme moins de complexes Prx1/MKP-1, ce qui conduit à une inactivation de MKP-1 et une phosphorylation de l'inducteur de sénescence MAPK p38. Inversement, Prx1 suroxydée se lie à MKP-5 et préserve son activité, assurant la phosphorylation de MAPK p38. Il en résulte une activation des isoformes MAPK p38 pouvant induire une sénescence des cellules cancéreuses (Turner-Ivey et al., 2013) (Fig. 27).

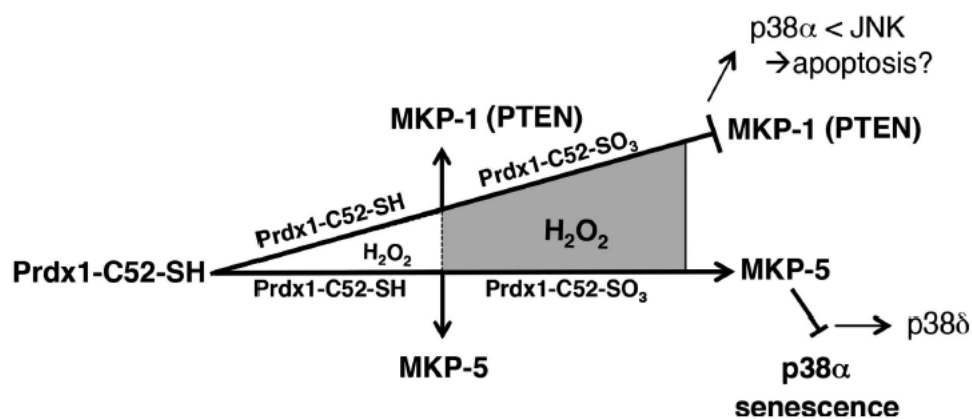


Fig. 27. La cystéine Cys52 de Prdx1 est un capteur de signalisation redox. Lors d'une homéostasie en ERO normale, Prdx1 favorise à la fois l'activité MKP-1 et MKP-5. Cependant, en cas d'augmentation des ERO, la forme Prdx1-Cys52-SO₃ provoque la dissociation du complexe Prdx1/MKP-1 amenant à l'inactivation de MKP-1. Inversement, Prdx1-Cys52-SO₃ se lie à MKP-5 et préserve son activité. Prdx1 en fonction de la dose d' H_2O_2 , empêche la phosphorylation MAPK p38 et la sénescence induite par le stress oxydant, pour promouvoir la signalisation par l'intermédiaire de JNK.

B. Régulation de l'état redox des systèmes cellulaires réducteurs

Les systèmes réducteurs cellulaires comme la Trx permettent de régénérer l'état réduit des Prx. Inversement, les Prx, en particulier celles de la famille Prx1 qui sont abondantes, peuvent oxyder la Trx massivement en cas de stress. Day et al (2012) ont démontré que dans les cellules de *S. pombe* traitées au peroxyde d'hydrogène, la Prx Tpx1 est un substrat majeur pour la Trx et, à ce titre, inhibe de manière compétitive la réduction Trx-dépendante d'autres protéines oxydées. L'inactivation de l'activité peroxydase de la Prx est alors importante pour maintenir la Trx sous sa forme réduite. Par conséquent, la suroxydation de Tpx1 est critique pour permettre à la Trx d'agir et de réparer des protéines oxydées et ainsi permettre la survie cellulaire dans des conditions de stress oxydatif (Day et al., 2012) (Garcia-Santamarina et al., 2013).

Récemment l'équipe de J. Riemer a démontré que la Prx1 mitochondriale de *S. cerevisiae* (une Prx de la famille Prx6 GSH-dépendante) était capable de transférer le signal oxydatif d' H_2O_2 au pool de glutathion, l'accumulation de glutathion oxydé dans la mitochondrie conduisant à la mort cellulaire. Les auteurs ont montré que ce phénomène est régulé par la suroxydation de Prx1 lorsque les concentrations d' H_2O_2 augmentent qui en inactivant ainsi l'enzyme permet d'éviter le piégeage du pool de GSH sous forme oxydée (Calabrese et al., 2019) (Fig. 28).

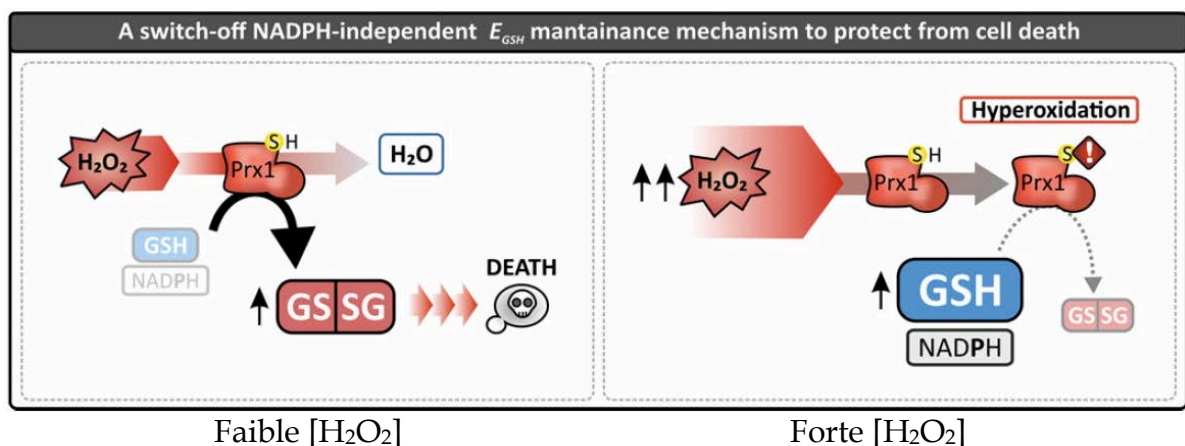


Fig. 28. Modèle proposé du rôle de la suroxydation sur la Prx1 mitochondriale chez *S. cerevisiae*. Lors de l'exposition au peroxyde d'hydrogène, Prx1 entraîne l'oxydation du glutathion. En cas de stress aigu par H_2O_2 , Prx1 devient suroxydée, ce qui découple efficacement le pool de glutathion de H_2O_2 . La suroxydation de Prx1 permet donc de limiter l'accumulation de GSSG et contribue à la survie des cellules. GSH: glutathion ; GSG: glutathion oxydé (Calabrese et al., 2019).

C. Participation à la maintenance des rythmes circadiens

D'un point de vue chronobiologique, le couple Srx/Prx semble contribuer à la maintenance du rythme circadien (24 heures) (del Olmo et al., 2019). Par exemple, O'Neill et Reddy ont montré en 2011 que la suroxydation de Prx2 dans les érythrocytes humains suit une oscillation de circadienne (Fig. 29) (O'Neill et al., 2011). Le mécanisme mis en évidence dans les érythrocytes consiste en la génération de H_2O_2 par auto-oxydation de l'hémoglobine, la suroxydation d'une fraction de Prx2 très abondante dans ces cellules, puis dégradation des Prx2 suroxydées non pas par la Srx absente des érythrocytes, mais par le protéasome (Cho et al., 2014). Ce mécanisme permettrait d'éviter l'accumulation de Prx2 suroxydée dans ces cellules au cours de leur vie.

Les cycles circadiens de sulfinylation des Prx, ont constitué le premier exemple d'une oscillation redox circadienne autonome, qui se produit indépendamment de l'horloge transcriptionnelle. Il est important de noter que l'oscillation circadienne de la sulfinylation semble ubiquitaire, dans tous les règnes du vivant et au niveau tissulaire, ce qui suggère qu'ils pourraient être antérieurs à l'évolution de l'oscillateur transcriptionnel. Le point de vue aujourd'hui développé est que l'oscillateur redox des Prx pourrait faire partie d'un oscillateur redox/métabolique circadien primordial, puisque les Prx sont dépendante des systèmes réducteurs Trx ou GSH eux même couplés au NADPH (Milev et al., 2018).

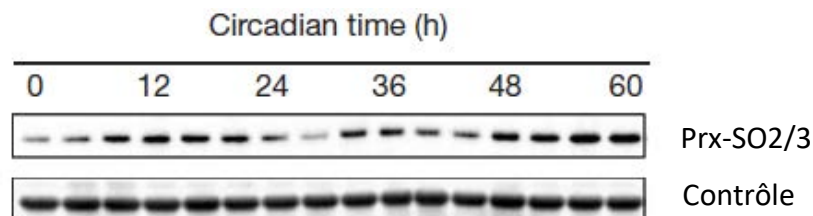


Fig. 29. Oscillation circadienne des Prx dans les globules rouges humains. La forme sulfinylée de Prx a été détectée par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-SO2/3 toutes les 4 heures sur une durée de 60 heures (O'Neill et al., 2011).

Par ailleurs, dans les cellules corticosurrénales humaines, une sulfinylation rythmique circadienne de la Prx3 mitochondriale a été observée. Ce mécanisme dépend de l'accumulation d' H_2O_2 associée à la biosynthèse des corticostéroïdes, favorisé par la suroxydation de Prx3. L'excès de H_2O_2 libéré dans le cytoplasme participe à une boucle de rétroinhibition impliquant la kinase ASK1, et contribue ainsi à établir la nature circadienne de la sécrétion de corticostéroïdes. Ce mécanisme est le premier à illustrer expérimentalement le principe du floodgate. Son mécanisme de régulation est différent de celui des érythrocytes et autres tissus, puisque c'est l'import de Srx dans la mitochondrie qui génère l'oscillation de l'état redox de Prx3 (Kil et al., 2012)(Fig.30).

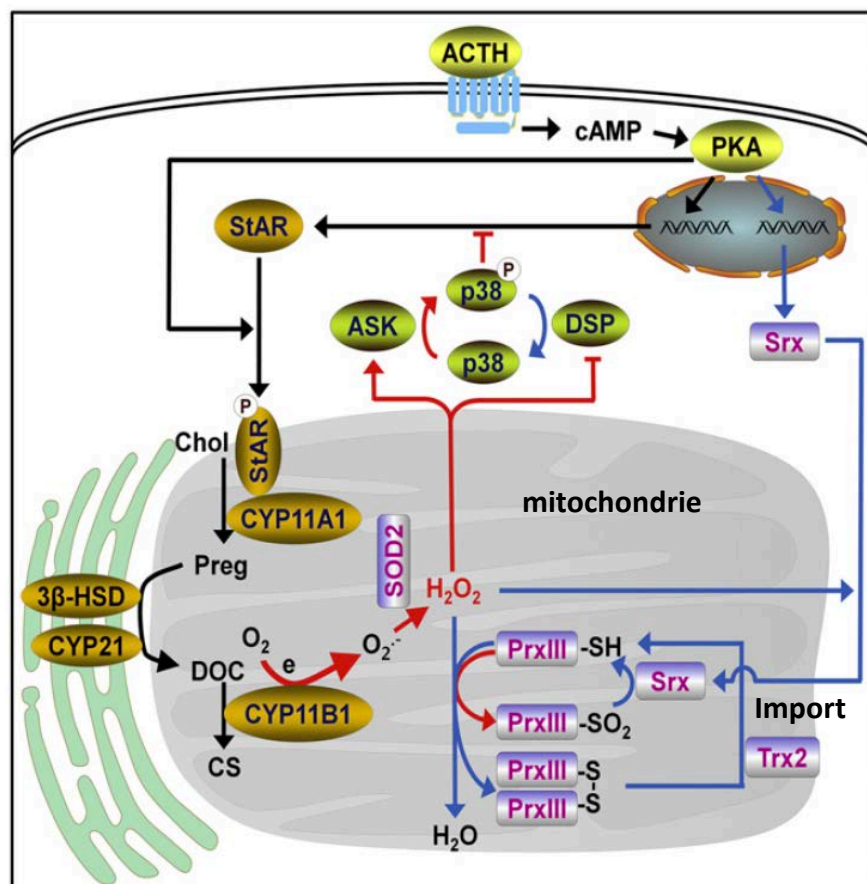


Fig. 30. Schéma illustrant le rôle du couple Prx3-SO₂/Srx lors de la stéroïdogenèse dans le cortex surrénal.

Les étapes avec les différentes enzymes menant à la synthèse des corticostéroïdes (CS) sont indiquées par des flèches noires, les étapes conduisant à l'accumulation d' H_2O_2 et à la rétro-inhibition de la synthèse de StAR (régulateur de la stéroïdogenèse) sont indiquées par des flèches rouges, et les étapes menant à une diminution de la concentration de H_2O_2 aux niveaux basaux sont indiqués par des flèches bleues. CYP11B1: stéroïde 11β-hydroxylase (Kil et al., 2012).

D. L'activité chaperon des Prxs suroxydées

Suroxydées, les Prxs perdent leur activité peroxydase. Par contre dès 2004, une étude chez la levure *S. cerevisiae* propose que la Prx suroxydée Tsa1 acquière une activité holdase, fonction permettant de limiter l'agrégation de protéines altérées lors d'un stress oxydant (Jang et al., 2004). Cette fonction documentée *in vivo* serait associée à une réorganisation quaternaire de l'enzyme sous formes de complexes de haut poids moléculaire (HMW) sphériques (Fig. 31). La détection de l'activité holdase *in vitro* a été réalisée en mesurant l'absence d'agrégation de substrats modèles dénaturés comme l'insuline réduite par turbidimétrie.

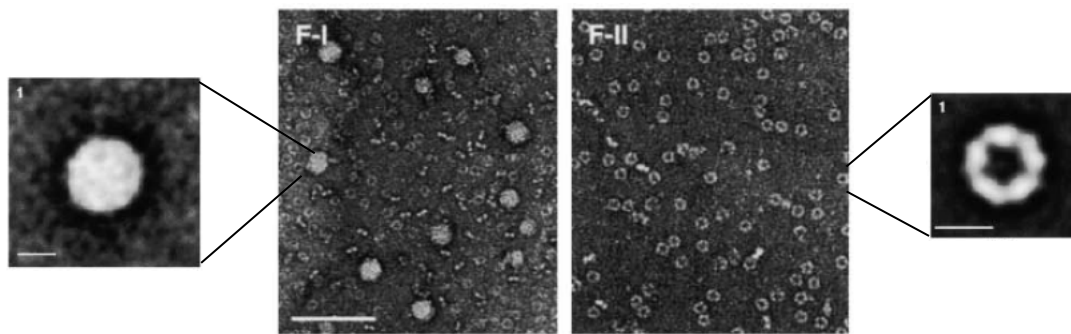


Fig. 31. Observation au microscope électronique de la Tsa1 de *S.cerevisiae*. Les fractions I et II correspondent à la fraction éluée en premier par chromatographie (haut poids moléculaire) et à la seconde, respectivement (plus faible poids moléculaire). En F-I, les agrégats ont uniquement une activité holdase alors que la F-II, les décamères de Prx conservent une activité peroxydase *in vivo*. Échelle : 100 nm; échelle zoom : 10 nm (Jang et al., 2004).

Plus récemment, l'activité chaperon de Tsa1 a été mieux définie, puisqu'elle permettrait sous sa forme suroxydée de recruter les protéines co-chaperons Hsp70 et Hsp104 et de resolubiliser des protéines dont la structure est altérée par des dommages oxydatifs. Les auteurs ont remarqué que la désagrégation des protéines client requière l'action réductrice de Srx sur Tsa1 sulfinylée (Hanzen et al., 2016) (Fig. 32). Cette activité est intimement liée au vieillissement réplcatif des levures, les gènes *TSA1* et *SRX1* étant qualifiés de gérontogènes (Molin et al., 2011).

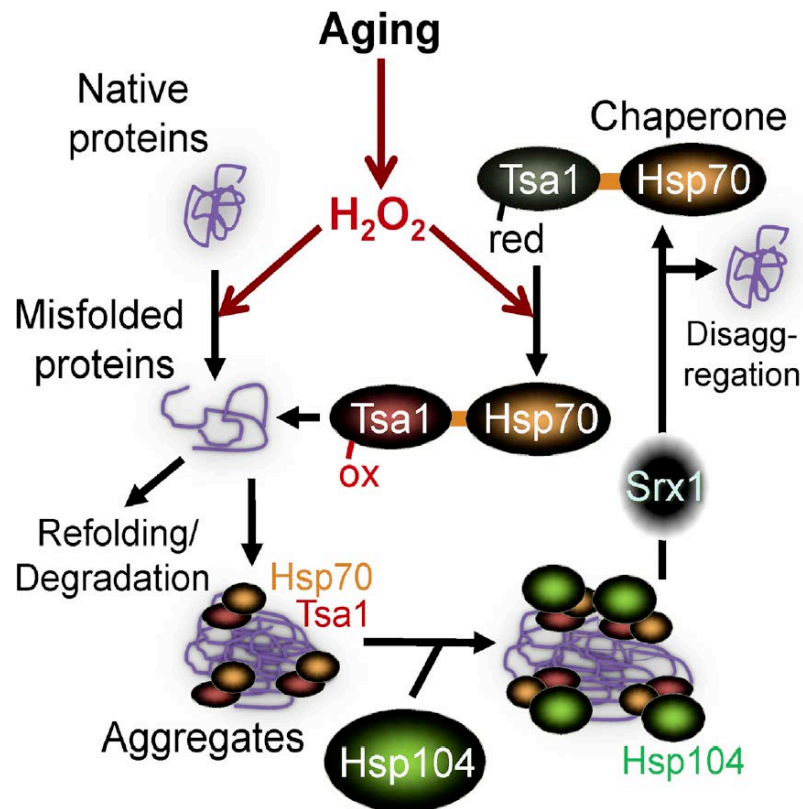


Fig. 32. Tsa1 recrute Hsp70 et Hsp104. Elle les oriente vers les protéines mal structurées dans l'objectif de désagréger ces formes dégradées. Srx (noire) est nécessaire pour aider à la dissociation des complexes chaperonnes/agrégats (Hanzén et al., 2016).

Ainsi, l'activité chaperon redox-dépendante de Tsa1 est analogue à celle de petites protéines de choc thermique (sHsps) comme Hsp33 chez *E.coli*. Le fait que Tsa1 oligomériserait pourrait permettre de prévenir l'agrégation de protéines mal structurées au travers d'une activité holdase de Tsa1, puis d'un transfert de ces protéines clientes vers d'autres systèmes chaperons comme Hsp104 (Dahl et al., 2015; West et al., 2018).

Cependant ces études n'apportent pas d'indication sur l'état oligomérique des Prx impliquées dans la fonction chaperon. Etant donné que la suroxydation tend à stabiliser la structure des Prx sous forme décamerique toroïdale ou de double décamer (Saccoccia et al., 2012), la structure en anneau ou double anneau a été souvent associée à la fonction chaperon, sans qu'il y ait actuellement de confirmation de son rôle *in vivo* (Fig. 33).

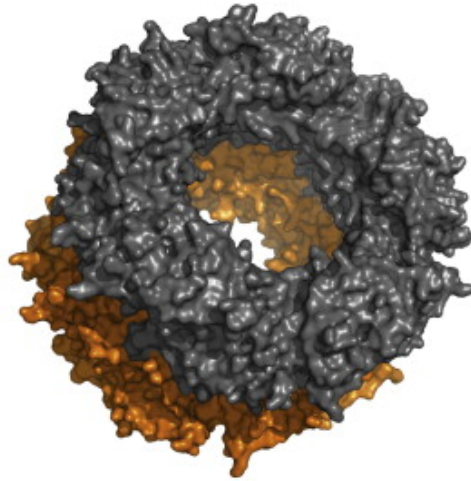


Fig. 33. Structure tridimensionnelle de la Prx1 de *S. manzoni*. Représentation de type surface du complexe de haut poids moléculaire (HMW) double décimère SmPrx1 à partir de données cristallographiques. Les deux décimères de Prx1 sont en orange/gris (Saccoccia et al., 2012).

Par ailleurs plusieurs études récentes ont montré *in vitro* et *in vivo* que des Prx de parasite (*L. braziliensis*) possèdent une activité chaperon sous forme *réduite*. Cette activité » dépend de la structure décimérique de la Prx, en particulier de la région intérieure/centrale de l'anneau, un élément essentiel du recrutement de protéine client. En effet, les auteurs ont découvert qu'une forme de la Prx mTXNPx dont l'extrémité N-terminale possède un tag de purification His qui pointe vers l'intérieur de l'anneau, perd cette activité chaperon. Cette étude originale par cryo-microscopie électronique montre une protéine client (la luciférase), intégrée au sein de l'anneau de la Prx (Teixera et al., 2015, 2019) (Fig. 34).

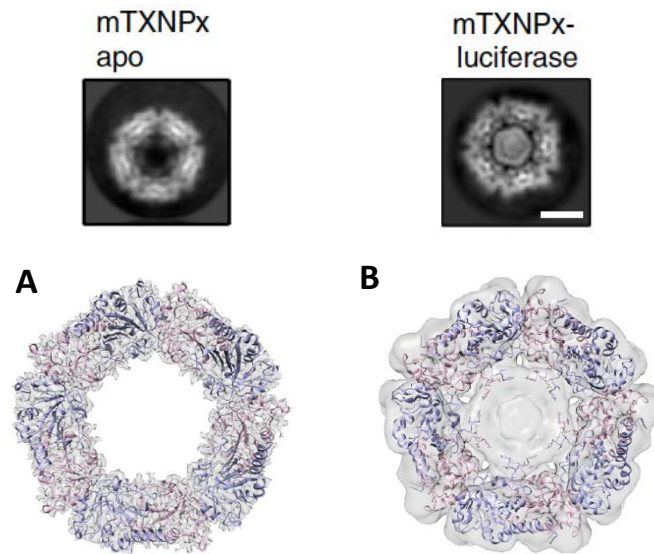


Fig. 34. Structure obtenue par cryo-microscopie électronique du complexe mTXNPx : luciférase. A. Image cryo-EM de mTXNPx seule (forme apo). B. Image cryo-EM du complexe mTXNPx : luciférase. En dessous des images, la structure cristalline de mTXNPx (pdb:4KB3) a été intégrée aux nuages de densité électronique générés par l'expérimentation (Teixeira et al., 2019).

Parallèlement à ces études, des formes plus complexes de haut poids moléculaire (HMW) pouvant s'empiler pour former de petits filaments, ont été observées, essentiellement *in vitro*. Ces modifications seraient induites par l'acidification du pH, l'encombrement macromoléculaire ou la suroxydation et à pH de l'ordre de 5. Yewdall et al ont montré que la Prx3 humaine adopte cette conformation particulière même à pH plus élevé. Ces formes de la Prx3 possèdent une activité chaperon sous forme réduite. Les auteurs proposent que la structure s'auto-assemble pour conserver son activité en conditions de stress. Une hypothèse probable est que cette structuration s'apparenterait à une forme de stockage (Yewdall et al., 2016) (Fig. 35) et ne serait pas corrélée directement à la fonction chaperon.

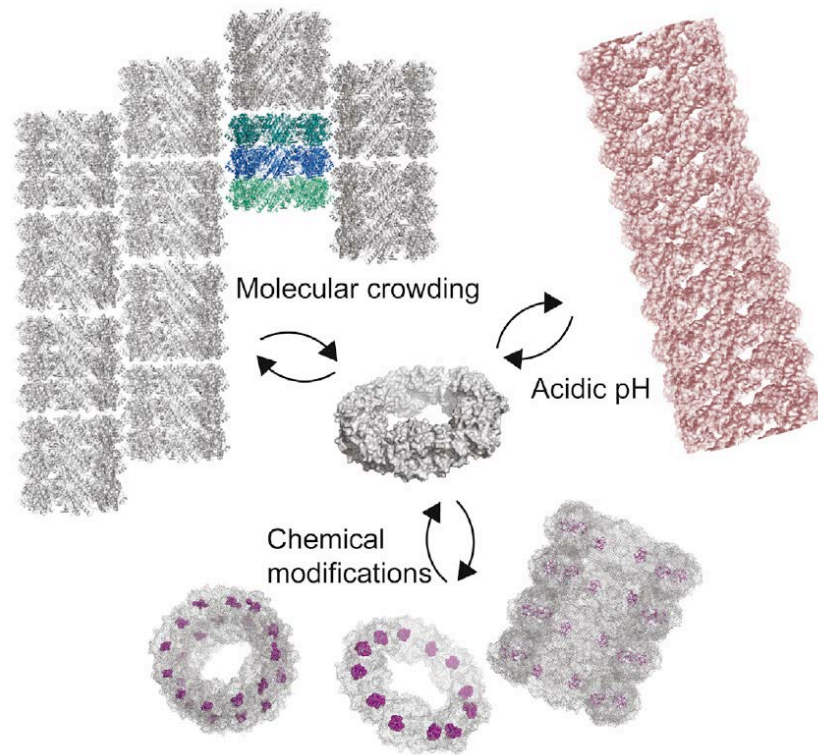


Fig. 35. Modèle illustrant l'auto-assemblage des Prxs induit par le stress cellulaire. Les interactions d'empilement des protéines Prx peuvent être facilitées par l'augmentation de la concentration moléculaire (crowding), les modifications du site actif (comme la suroxydation), ou l'acidification (Yewdall et al., 2016).

3. Le modèle mécanistique de la suroxydation

A. Le modèle

Les études séminales d'enzymologie moléculaire et structurale des Prx ont été réalisées par les équipes de Poole, Karplus et Winterbourn au cours des années 2000, et ont permis d'aboutir à un schéma général du mécanisme catalytique des Prx de la famille Prx1 (Fig.36) qui va nous servir de modèle de travail :

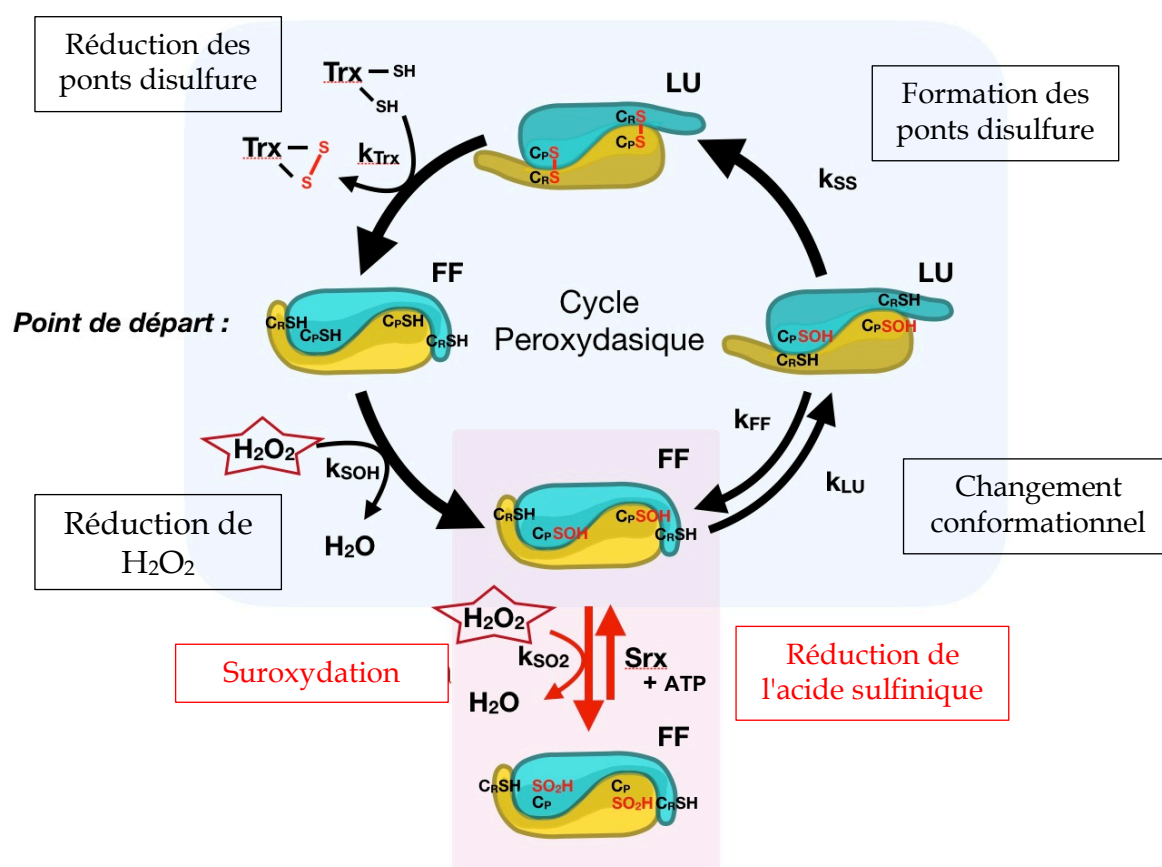


Fig. 36. Schéma général représentant le cycle peroxydasique, la voie de suroxydation, les constantes de vitesse et d'équilibre, les différents états redox et conformationnels des Prx de type Prx1. L'unité catalytique est le dimère en structure tête-bêche représenté en jaune et turquoise. Les sites actifs sont identifiés par les Cys C_P et C_R. La C_R est située dans la région C-terminale dont la conformation change entre les états FF et LU. Le cycle peroxydase en bleu et la voie de suroxydation en rose sont imbriquées. La réduction de la Prx suroxydée par Srx est indiquée. Trx = thiorédoxine, Srx= Sulfirédoxine. FF = fully folded, LU = locally unfolded. Les constantes de vitesse de réduction des peroxydes k_{SOH} , de sulfinylation k_{SO_2} , de formation du pont disulfure k_{SS} , de recyclage k_{Trx} , et de l'équilibre FF-LU, k_{FF} et k_{LU} sont indiquées. Adapté de (Karplus, 2015)

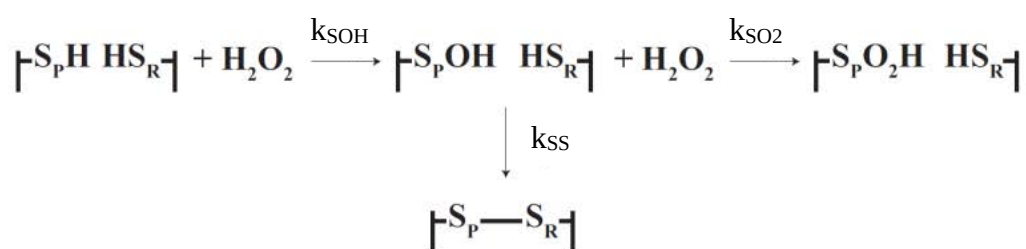
Récapitulons les différentes étapes catalytiques de l'activité peroxydase ainsi que le phénomène de suroxydation des Prx :

- la première étape consiste en l'attaque de la C_P sur le peroxyde, cette réaction s'effectue avec une constante de vitesse de second ordre k_{SOH} , décrite pour être très rapide, de l'ordre de 10^5 à $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Ferrer-Sueta et al., 2011; Peskin et al., 2013). A noter dans le cas de l'enzyme *StAhpC*, une étape préliminaire de fixation du peroxyde dans le site actif a été identifiée (Parsonage et al., 2015). Cette étape de formation de l'intermédiaire sulfénique se fait dans la conformation FF de l'enzyme ;
- une étape de changement conformationnel FF/LU qui doit nécessairement être équilibrée et caractérisée par la constante d'équilibre, K_{LU} , et les constantes de vitesses k_{LU} et k_{FF} . Très peu de données dynamiques sur cet équilibre sont disponibles. Seule une étude décrit une vitesse d'échange de 1500 s^{-1} obtenue par RMN sur une enzyme monomérique de la famille PrxQ à l'état réduit (Ådén et al., 2011). Or il est possible que la cinétique de la transition FF/LU soit affectée par l'oxydation de la C_P sous forme sulfénique.
- une étape de résolution ou recyclage : la $C_R\text{-SOH}$ vient former un pont disulfure avec la C_P , caractérisée par la constante de vitesse k_{SS} . A ce jour dans les études cinétiques réalisées sur les enzymes de la famille Prx1, cette étape n'a pas été dissociée de celle de la transition conformationnelle FF/LU.
- une étape de réduction du pont disulfure par une oxydoréductase (la Trx), caractérisé par la constante de vitesse k_{TRX} .
- la réaction de suroxydation consistant en l'attaque de l'acide sulfénique SOH sur une deuxième molécule de peroxyde et conduisant à l'inactivation des Prx sensibles sous forme acide sulfinique SO_2H , est caractérisée par la constante de vitesse de second ordre k_{SO_2} . Dans le modèle proposé en 2003, c'est dans la conformation FF que cette réaction a lieu. En effet, dans cette conformation la $C_P\text{-SOH}$ reste confinée dans le site actif ce qui permet d'activer la réaction avec une seconde molécule de peroxyde.

Jusqu'à présent, dans les études mécanistiques du phénomène de suroxydation, la réaction de sulfinylation a été décrite comme une étape en compétition avec l'étape de formation du pont disulfure, incluant l'équilibre FF/LU. Cette étape conformationnelle a été considérée comme un équilibre rapide qu'il n'était pas possible de distinguer cinétiquement de l'étape de formation du pont disulfure. Or d'après le modèle Fig. 36, cette compétition pourrait impliquer directement la réaction de suroxydation et l'étape de changement conformationnel. Par conséquent, les cinétiques de la transition de la forme FF vers la forme LU et LU vers FF sont nécessairement des paramètres essentiels dans le contrôle de la sensibilité à la suroxydation des Prx. En effet, plus cette vitesse de transition est réduite, plus la compétition avec la réaction de l'intermédiaire Cys-SOH avec une deuxième molécule de peroxyde est importante. (Cao and Lindsay, 2017).

B. Approches expérimentales de la sensibilité à la suroxydation

Les premières déterminations de la constante de vitesse k_{SO_2} ont été réalisées en utilisant une méthode combinant compétition cinétique à la catalase et détection des formes redox (disulfure et suroxydée) par spectrométrie de masse. En s'appuyant sur le modèle ci-dessus, les auteurs ont pu extraire une valeur de k_{SO_2} de $1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les Prx2 et Prx3 humaines et de k_{SS} de 2 s^{-1} pour la Prx2 et 20 s^{-1} pour la Prx3 (Peskin et al., 2013), suggérant que la différence de sensibilité est liée à la cinétique de formation du pont disulfure C_P-C_R . Le principe était de mesurer le ratio entre forme suroxydée et forme oxydée pont disulfure pour atteindre les constantes de vitesse :



$$[\text{Prx-SO}_2]/[\text{Prx-S-S-Prx}] = (k_{\text{SO}_2}/k_{\text{SS}})[\text{H}_2\text{O}_2]$$

Dans ce cas de figure, la méthode est fondée sur les mesures ponctuelles en fin de réaction et l'étape de changement conformationnel n'est pas prise en compte.

Par la suite la mesure de l'indice $C_{\text{hyp1\%}}$ a été proposée pour appréhender la sensibilité d'une Prx à la suroxydation (Nelson et al., 2013) (partie résultats §III.2.). Cette méthode de cinétique en conditions de cycles catalytiques multiples (en présence de Trx) intègre l'équilibre du changement conformationnel K_{LU} en tant qu'équilibre rapide, c'est-à-dire que les constantes de vitesse k_{FF} et k_{LU} sont considérées comme étant beaucoup plus rapides que les valeurs observées pour les autres étapes : formation du l'intermédiaire sulfénique, suroxydation, et formation du pont disulfure. Dans ce cas, l'index de sensibilité $C_{\text{hyp1\%}}$ est décrit par :

$$C_{\text{hyp1\%}} = 0,01 \times (k_{\text{SS}} \times K_{\text{LU}}) / k_{\text{SO}_2}$$

Enfin, au cours de ce travail, des études en cinétiques rapides donnant des valeurs de la constante de vitesse k_{SO_2} par suivi de la modification de fluorescence intrinsèque des Prx ont été reportées, pour les Prx1 et Prx2 humaines (Dalla Rizza et al., 2018). Elles seront comparées en détail aux résultats que j'ai obtenus sur l'enzyme de *S. cerevisiae* Tsa1, qui a été mon objet d'étude.

OBJECTIFS

Mon projet de doctorat avait pour objet l'étude des mécanismes moléculaires de la modification post-traductionnelle des enzymes de la famille des Prx1 par sulfinylation. Ce projet s'inscrit dans la problématique plus générale de la signalisation cellulaire redox thiol-dépendante. La régulation de la suroxydation des Prx dépend d'une compétition entre deux voies du cycle catalytique, l'une vers la suroxydation, l'autre vers le cycle peroxydase. Le modèle mécanistique couramment admis fait intervenir une étape de changement conformationnel entre les deux conformations FF et LU en équilibre, qui pourrait contrôler la compétition entre les deux voies. Au cours de ce travail, je me suis attaché à répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la dynamique de la transition FF/LU *au cours* du cycle catalytique ?
- Quelles sont les étapes en compétition directe et quels sont les paramètres cinétiques déterminant la sensibilité à la suroxydation ?
- La sensibilité à la suroxydation dépend-elle de la nature du substrat peroxyde ?
- La sensibilité à la suroxydation est-elle un paramètre effectif *in vivo* ?

Mon projet s'est articulé autour des objectifs expérimentaux suivants :

- Dissection du mécanisme et mesure des constantes de vitesse des différentes étapes par une étude en cinétique rapide, utilisant le suivi de la fluorescence intrinsèque de la protéine comme sonde de son état redox. Cette approche a été couplée à la détection par dichroïsme circulaire et à l'utilisation d'agents viscogènes pour identifier une éventuelle phase cinétique reflétant un changement de conformation.
- Mesure de la sensibilité de Tsa1 à la suroxydation par une méthode publiée adaptée à notre enzyme modèle, dans le but de corrélérer les informations cinétiques à la valeur de la sensibilité grâce à l'utilisation de mutants et de différents substrats peroxydes modulant cette sensibilité.
- Validation *in vivo* des résultats en collaboration avec l'équipe de M.Toledano (CEA Saclay).

RÉSULTATS

I. Propriétés spectroscopiques de Tsa1 sous différents états redox

Les propriétés de fluorescence intrinsèque des protéines à repliement Trx sont connues pour être sensibles à l'état redox des Cys impliquées dans la formation de pont disulfure. En effet, les Trx contiennent un résidu Trp conservé en position n-1 par rapport à la Cys catalytique. Ce résidu n'est pas retrouvé dans Tsa1, qui contient néanmoins 3 résidus Trp. Il était donc nécessaire de déterminer les propriétés de fluorescence intrinsèque de Tsa1 sous forme réduite (Tsa1_{red}), oxydée pont disulfure entre les Cys C_P et C_R (Tsa1_{SS}), et suroxydée (Tsa1_{SO2}) dans le but d'exploiter ces signaux comme sondes pour suivre le cycle catalytique. De même, afin d'exploiter le signal de dichroïsme circulaire de Tsa1 pour identifier les étapes associées à la transition conformationnelle FF/LU, nous avons évalué l'impact de l'état redox sur les spectres CD dans l'UV proche et l'UV lointain.

1. Spectre de fluorescence intrinsèque des formes redox de Tsa1

La Tsa1 contient trois sondes fluorescentes intrinsèques, des résidus Trp situés dans l'environnement immédiat du site actif et de la C_P (W83), au niveau de l'hélice α 5 (W161), et au niveau de la région C-terminale et proche de la C_R (W173) (Fig. 37). Le spectre de fluorescence de Tsa1 sous ses différents états redox a été déterminé en excitant sélectivement les Trp à 295 nm (Fig. 38).

Ces spectres montrent que la formation de l'espèce Tsa1_{SS} entraîne la baisse d'émission de fluorescence à une valeur de 62% par rapport à la forme réduite Tsa1_{red}, mesurée sur l'ensemble du spectre d'émission entre 320 et 450 nm. Également un léger décalage vers les longueurs d'onde plus faibles de la longueur d'onde maximale d'émission, est constaté. Par contre, la forme suroxydée Tsa1_{SO2} voit son taux d'émission de fluorescence augmenter à 124% de la forme réduite.

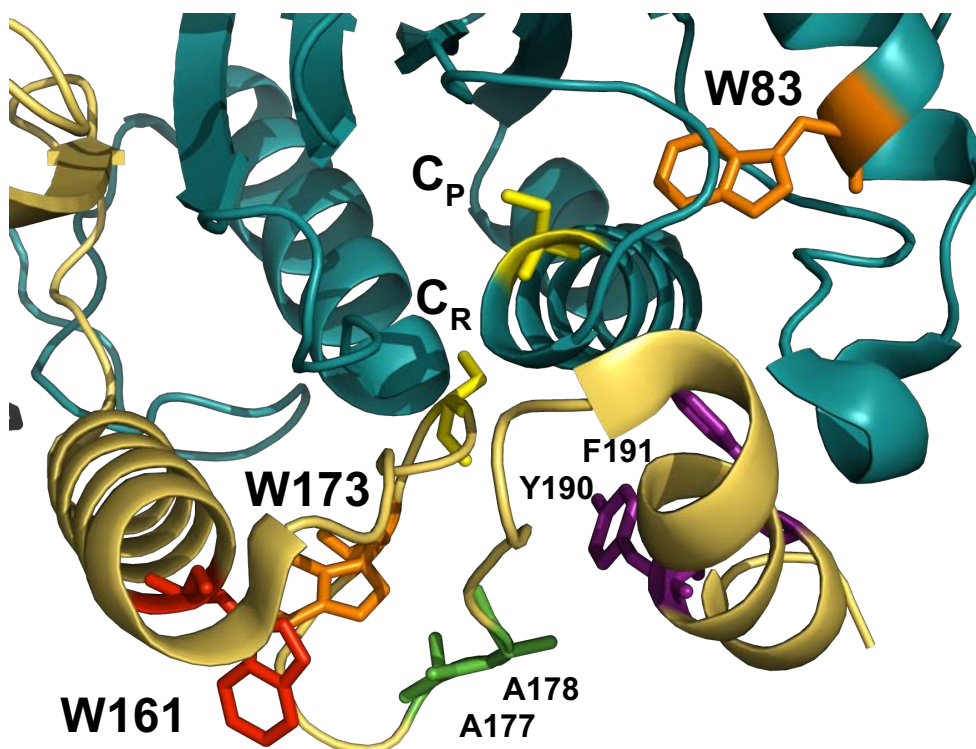


Fig. 37. Représentation du site actif de Tsa1 au sein de l'unité dimérique.

Les deux sous-unités sont représentées en vert et or. Les résidus Cys sont identifiés en jaune. Les trois résidus Trp sont symbolisés en orange (W83, W173) et rouge (W161), les résidus mutés dans notre étude sont également représentés en vert (A177, A178) et violet (Y190, F191) (code PDB : 3SBC).

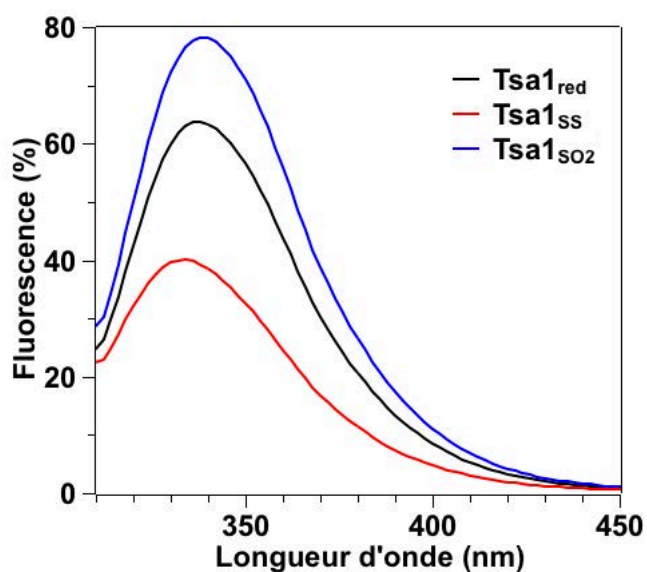


Fig. 38. Spectres d'émission de fluorescence de Tsa1 sous ses différents états d'oxydation.

Les mesures sont effectuées sur un fluorimètre (SAFAS®) dans du tampon TK à une concentration de 2 μ M en monomère. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm afin d'exciter sélectivement les résidus Trp et le photomultiplicateur est réglé à 450 V.

2. Spectre CD des formes redox de Tsa1

Le spectre de CD de Tsa1_{red} dans l'UV lointain présente un maximum à 195 nm et deux minima à 208 et 225 nm, caractéristiques d'une protéine repliée. L'oxydation sous la forme Tsa1_{ss} induit une diminution significative du signal à 195 nm. Dans la région de l'UV proche, où le spectre révèle la structure tertiaire de la protéine dans l'environnement des acides aminés aromatiques, trois maxima à 262, 287, and 296 nm sont observés pour Tsa1_{red}. L'oxydation sous forme Tsa1 induit de profonds changements, avec notamment un minimum à 277 nm, seul le pic à 295 nm étant conservé (Fig.39). Les spectres de CD dans l'UV lointain ont été déconvolués avec le logiciel CDNN (Boehm et al, 1992) dans le but de déterminer le taux de structures secondaires (résultats non montrés).

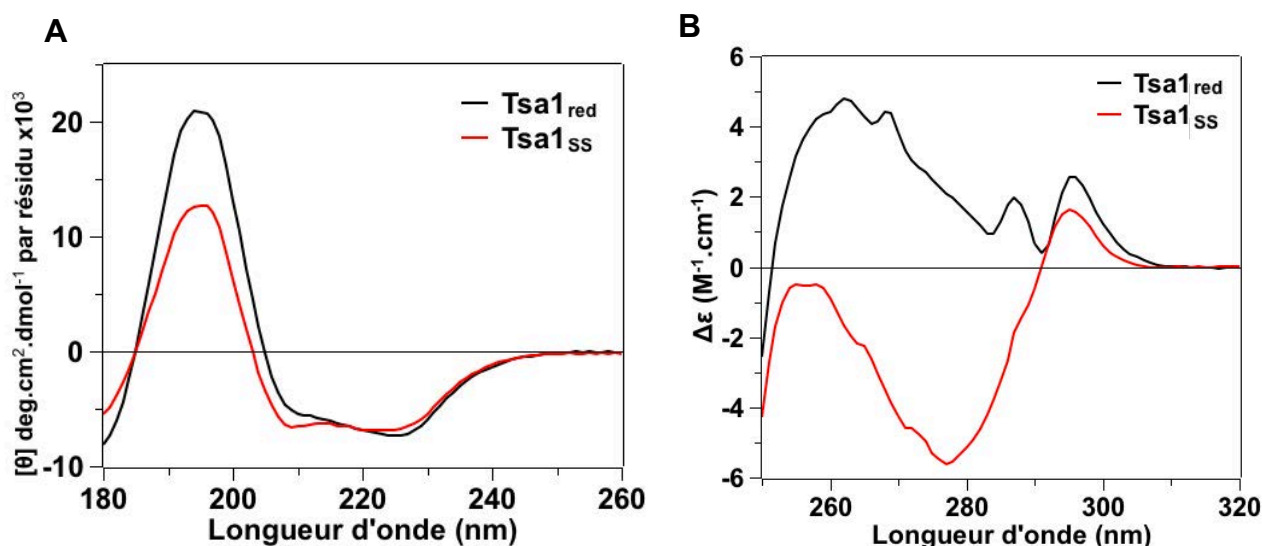


Fig. 39. Spectres de dichroïsme circulaire de Tsa1. A. spectres obtenus dans l'UV lointain B. spectres obtenus dans l'UV proche. Tsa1_{red} = Tsa1 réduite (en noir) et Tsa1_{ss} = Tsa1 oxydée pont disulfure (en rouge), concentration de l'enzyme : 50 μM .

En conclusion, les propriétés spectroscopiques de Tsa1 suggèrent que le signal de fluorescence est susceptible de servir de sonde pour suivre cinétiquement la formation de l'un ou l'autre de ses états redox au cours de la catalyse. De plus les larges variations de signal CD de Tsa1_{ss} (conformation LU) par rapport à Tsa1_{red} (forme FF) pourraient être mis à profit pour suivre la dynamique de cette transition au cours de la réaction.

II. Caractérisation des différentes étapes du mécanisme catalytique de Tsa1 par des méthodes de cinétique rapide

1. Cinétique réactionnelle de Tsa1 avec H₂O₂ à l'état préstationnaire suivie par fluorescence

L'étude en cinétique rapide de la réaction de Tsa1 avec H₂O₂ a été réalisée sur un appareil de cinétique rapide en mode flux interrompu couplé à une détection de la fluorescence (stopped flow) (voir M&M, Fig. 71 page 141). Cet appareil permet de mélanger rapidement deux solutions contenues initialement dans deux seringues, avec un temps mort de l'ordre de 1 ms avant le début de l'enregistrement du signal, ici la fluorescence. En fonction de l'amplitude des signaux mesurés, cette technique permet de mesurer des événements de constante de vitesse supérieures à 500 s⁻¹. Nous avons utilisé de plus une cellule de mesure de petit volume (5 µl), qui permet de réduire encore le temps mort de l'instrument et permet d'atteindre des constantes de vitesse dépassant 1000 s⁻¹. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm afin d'exciter sélectivement les résidus Trp de Tsa1, et un filtre monté en amont du détecteur permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'ondes supérieures à 320 nm, correspondant au spectre d'émission de la protéine.

La réaction est déclenchée en mélangeant rapidement 5 µM de Tsa1 avec des concentrations croissantes du substrat H₂O₂, et en l'absence de système réducteur Trx. Dans ces conditions, l'intermédiaire Tsa1_{ss} n'est pas réduit et s'accumule, ce qui correspond à des conditions de cycle catalytique unique ou état préstationnaire, et permet de suivre les étapes de la réaction qui se produisent avant l'établissement de l'état stationnaire (Fig. 36). La réaction se décompose en trois phases : une première phase décroissante extrêmement rapide, une seconde phase croissante, et une troisième et dernière phase décroissante plus lente (phases 1, 2 et 3, Fig. 40). L'amplitude des trois phases est proportionnelle à la concentration de Tsa1 (données non montrées). La diminution globale du signal est cohérente avec l'oxydation de Tsa1_{red} sous forme Tsa1_{ss}, dont la fluorescence est 38% inférieure.

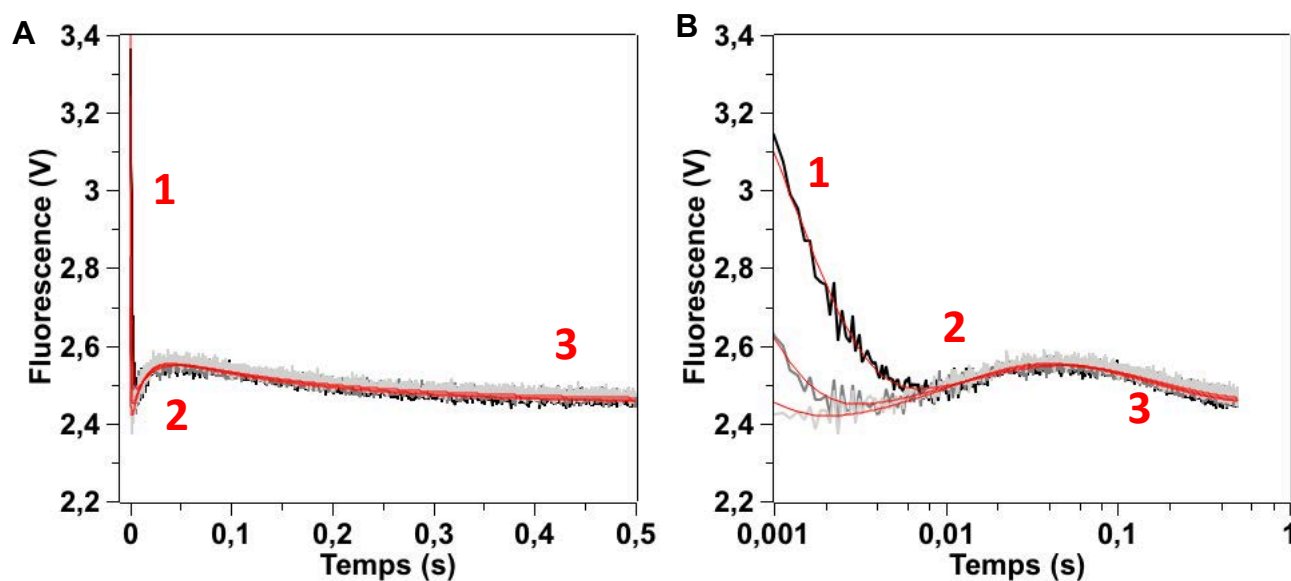


Fig. 40. A. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 avec H₂O₂, trois concentrations en substrats sont utilisées 10 μ M (noir), 25 μ M (gris) et 50 μ M (gris clair). Les ajustements et les 3 phases distinctes sont indiqués en rouge. **B.** idem A. l'échelle de temps est logarithmique pour une meilleure visibilité des phases cinétiques.

Pour ajuster les courbes, le logiciel Pro-Data (Applied Photophysics) a été utilisé en choisissant le modèle mathématique triple exponentiel : l'évolution du signal au cours du temps est traitée comme une combinaison de cinétiques de premier ordre exponentielles. Ceci fournit donc pour chaque cinétique obtenue à concentrations croissantes en H₂O₂, les valeurs de constantes de vitesse de premier ordre pour chaque phase, exprimées en s⁻¹. Ainsi, la constante de vitesse $k1^{obs}$ de la première phase décroissante rapide est dépendante de la concentration en H₂O₂, ce qui indique que cette phase reflète une réaction bimoléculaire impliquant une molécule d'H₂O₂ ; les constantes de vitesse de la seconde phase croissante, $k2$ de 64 ± 5 s⁻¹, et de la troisième et dernière phase décroissantes $k3$ de 4.6 ± 0.3 s⁻¹, ne dépendent pas de la concentration en substrat (Fig. 41). Ces deux phases représenteraient donc des processus intramoléculaires au sein de la protéine.

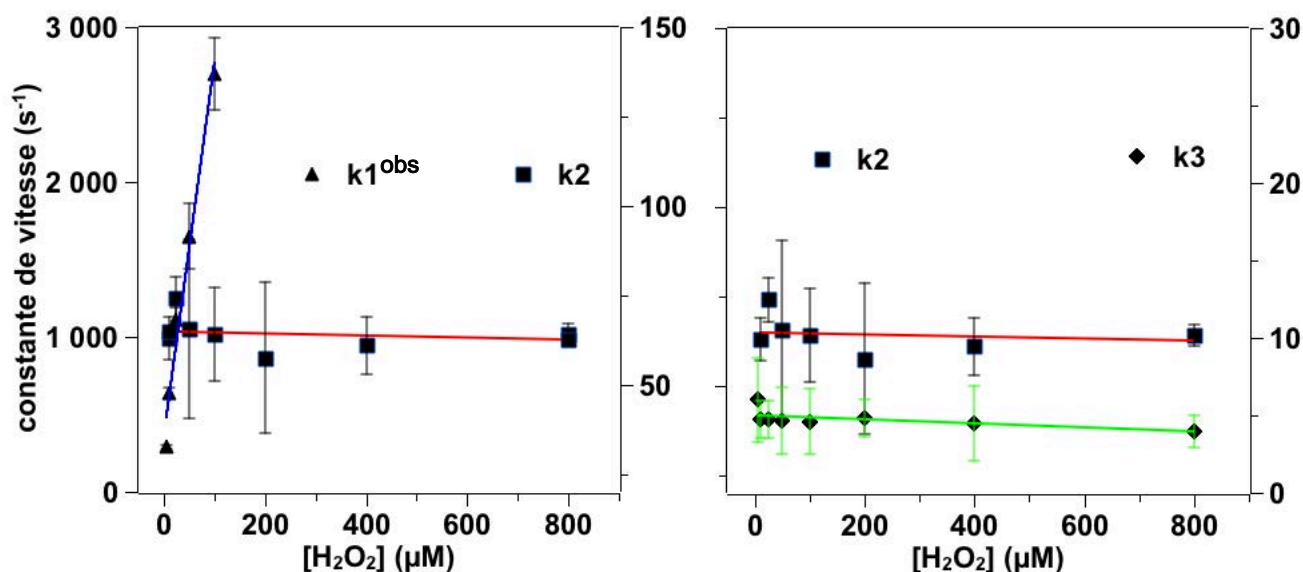


Fig. 41. Valeurs des constantes de vitesse k_1^{obs} , k_2 et k_3 en fonction de la concentration en H_2O_2 , les valeurs de k_1^{obs} sont représentées par des triangles noirs (axe gauche), les valeurs de k_2 sont représentées par des carrés noirs (axe central), les valeurs de k_3 par des diamants noirs (axe droit). Les ajustements linéaires ont été obtenus avec le logiciel SciDavis.

2. Attribution de la phase 1 dans le cycle catalytique

A priori, la première phase de la réaction catalysée par Tsa1 pourrait être attribuée à deux processus : soit une étape de fixation d' H_2O_2 dans le site actif, soit l'attaque du groupement thiolate de la C_P sur la liaison peroxyde, conduisant à la formation de l'acide sulfénique C_P-SOH . Dans le premier cas, la constante de vitesse de pseudo premier ordre k_1^{obs} dépendrait linéairement de la concentration en H_2O_2 , avec une pente correspondant à la constante de vitesse de liaison et une ordonnée à l'origine correspondant à la constante de vitesse de dissociation du complexe $Tsa1 \cdot H_2O_2$. C'est ce qui a été proposé dans le cas des cinétiques de la Prx bactérienne AhpC avec le $CuOOH$ (Parsonage et al., 2015). Dans le second cas, k_1^{obs} augmenterait également de façon linéaire en fonction de $[H_2O_2]$, mais avec une ordonnée à l'origine proche de 0, indiquant un processus irréversible.

Étant donné que la première phase de réduction d' H_2O_2 par Tsa1 est extrêmement rapide, afin de pouvoir mesurer précisément la constante de vitesse k_1^{obs} , il a été nécessaire de travailler à des concentrations plus faibles en H_2O_2 pour ralentir la vitesse de réaction, et par conséquent de diminuer la concentration en Tsa1 afin de rester en excès de substrat et donc en conditions de pseudo premier ordre. Nous avons donc

réalisé nos expériences avec une concentration de Tsa1 dix fois plus faible que dans la Fig.40, c'est-à-dire 0,5 μM (Fig.42). Dans ces conditions, les cinétiques sont ajustées selon une courbe décroissante mono-exponentielle correspondant à la phase 1. Les phases 2 et 3 d'amplitudes plus faibles ne sont pas observées dans ces conditions. L'évolution de la valeur de $k1^{\text{obs}}$ mesurée en fonction de la concentration en H_2O_2 est linéaire, comme attendu, ce qui confirme que la réaction est bimoléculaire. La régression linéaire de cette représentation secondaire montre qu'elle passe par l'origine du graphique, ce qui suggère donc que la phase 1 correspond à un processus quasi irréversible, en faveur de l'hypothèse de l'attaque directe de la C_P sur la molécule d' H_2O_2 . Dans cette hypothèse, la pente de la droite correspondrait à la valeur de la constante de vitesse de processus, qui est égal à $9,7 \pm 0,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur très élevée montre que la réactivité vis-à-vis de H_2O_2 de la C_P est exceptionnelle, proche de la vitesse de diffusion.

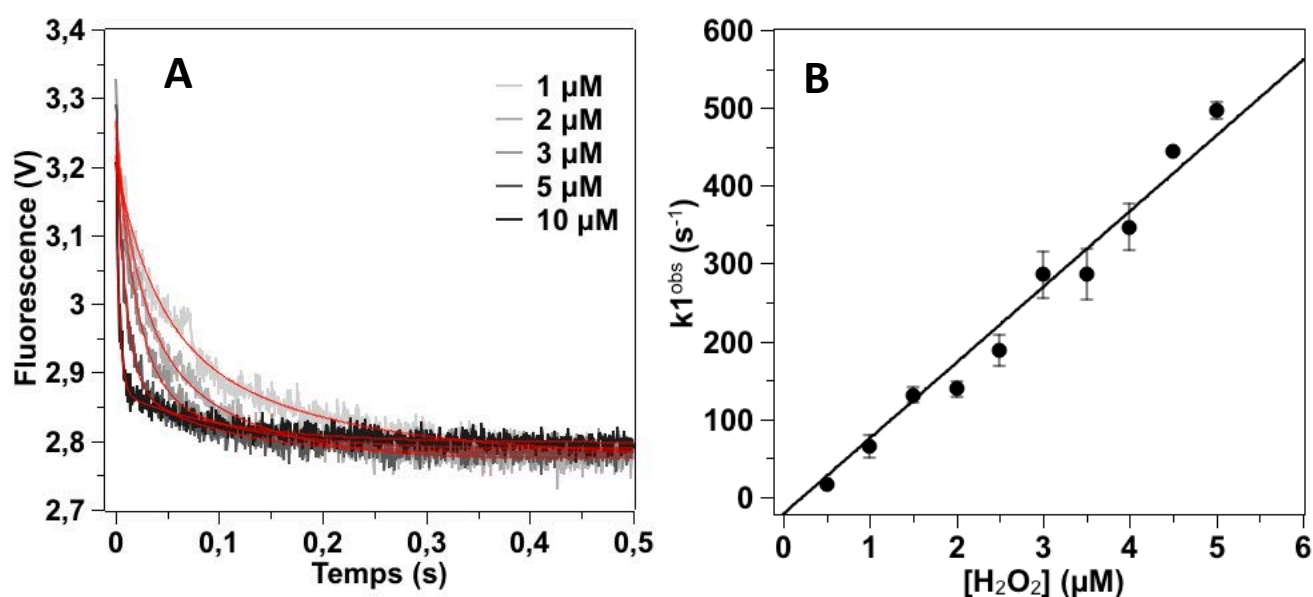


Fig. 42. A. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 à faible concentration avec H_2O_2 , des concentrations croissantes en substrats sont utilisées (gris clair vers noir). Les ajustements sont indiqués en rouge. B. Constantes de vitesse $k1^{\text{obs}}$ mesurées en fonction de la concentration en H_2O_2 .

Pour corroborer ce résultat, nous avons conduit une expérience similaire, en utilisant un mutant dans lequel la C_P a été substituée par une Ser ($\text{Tsa1}^{\text{C48S}}$). Dans ce cas, la fixation de H_2O_2 devrait être possible mais pas l'attaque nucléophile conduisant à la formation de l'intermédiaire $\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$. Dans cette expérience, aucune variation du signal

de fluorescence n'a été détectée (Fig. 43), ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle la phase 1 correspond à l'attaque de la C_P et à la formation de C_P -SOH.

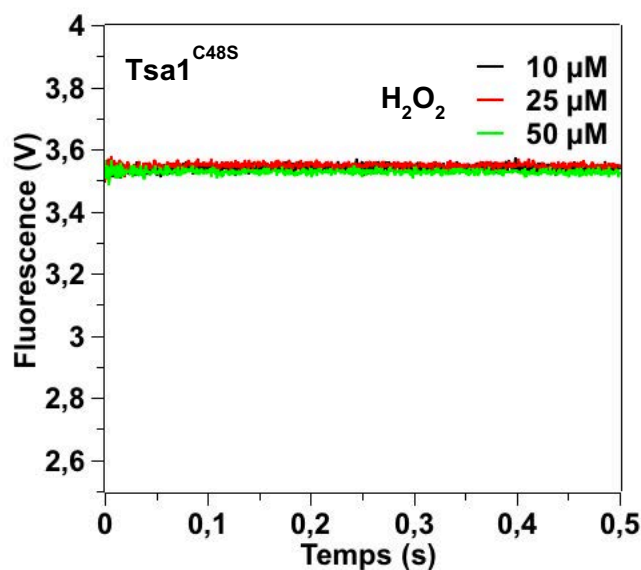


Fig. 43. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 C48S avec H_2O_2 à des concentrations de 10, 25 et 50 μM .

3. Attribution des phases 2 et 3

Etant donné que le signal de fluorescence de la forme suroxydée $Tsa1_{SO_2}$ est supérieur à celui des autres formes redox, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la phase 2 pourrait être attribuée à la réaction de suroxydation de Tsa1. Pour cela nous avons analysé les espèces redox de Tsa1 obtenues à la fin de la réaction avec 10 μM de H_2O_2 par spectrométrie de masse électrospray (Fig. 44). La réaction est bloquée en conditions acides après quelques secondes de réaction par ajout de TFA 0,3%.

En témoin, un échantillon de $Tsa1_{red}$ est analysé avec une masse expérimentale de 23'622,2 Da, correspondant à la masse théorique attendue de 23'621,9 Da. Après injection du mélange $Tsa1/H_2O_2$, une seule espèce est détectée, de masse égale à 47'240,6 Da. Cette valeur correspond, au Dalton près, à la forme oxydée de $Tsa1_{SS}$, i.e. au dimère relié par deux ponts disulfures $Tsa1-SS-Tsa1$ ((monomère x 2) - 4 atomes d'hydrogène). Ce résultat montre que, dans ces conditions de cycle catalytique unique et de concentrations en H_2O_2 de l'ordre de la dizaine de μM , la forme suroxydée $Tsa1_{SO_2}$ ne se forme pas. Par conséquent, les phases 2/3 pourraient correspondre à la formation du pont disulfure au sein de $Tsa1_{SS}$ ou à un événement associé à la transition conformationnelle FF/LU.

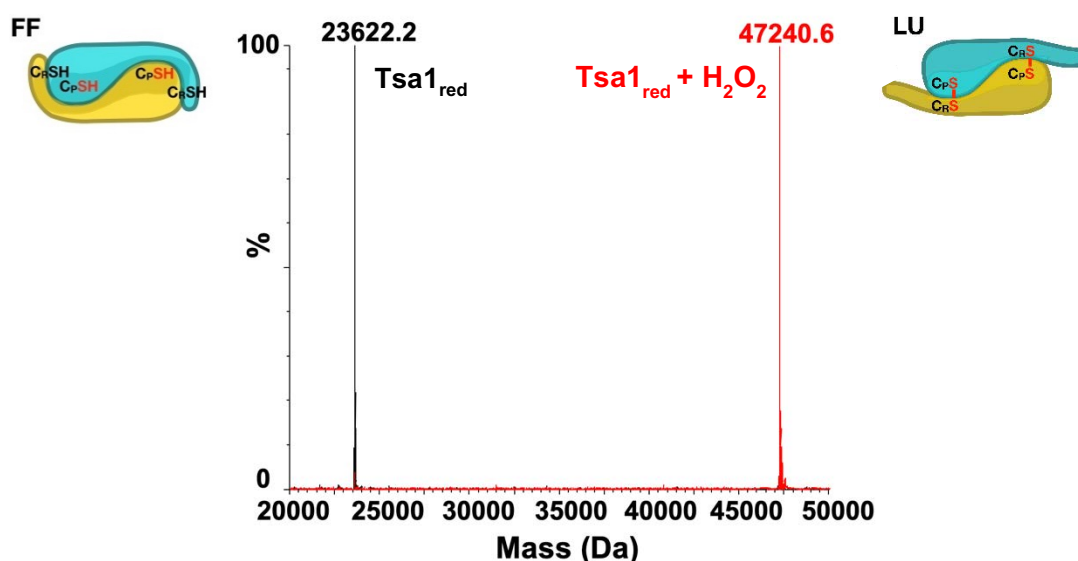


Fig. 44 : Détection par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes ESI-MS des espèces formées après réaction de Tsa1 5 μ M avec H_2O_2 10 μ M (rouge). Le spectre de Tsa1_{red} est présenté comme témoin (noir). Schéma représentant l'unité catalytique de Tsa1 soit le dimère tête-bêche représenté en jaune et vert, sous forme FF ou LU. Les deux ponts disulfures situés au sein des deux sites actifs sont représentés en rouge.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons reproduit les expériences avec un mutant de Tsa1 dont la conformation à l'état réduit est très proche de celle de Tsa1_{ss}, la conformation LU. Lors de la formation du pont disulfure, ce mutant reste donc dans cette conformation, et ne passe pas par un changement conformationnel FF/LU au cours du cycle catalytique. Comme nous l'avons présenté dans le chapitre introduction, la conformation FF est stabilisée par la présence de l'hélice $\alpha 5$ appartenant à la région C-terminale, qui contient le motif Y190-F191 conservé dans la plupart des Prx1 sensibles à la suroxydation. Nous avons donc préparé le mutant Y190G F191G (Tsa1^{YF}) dans le but de donner à cette région plus de flexibilité, et de déstabiliser la conformation FF.

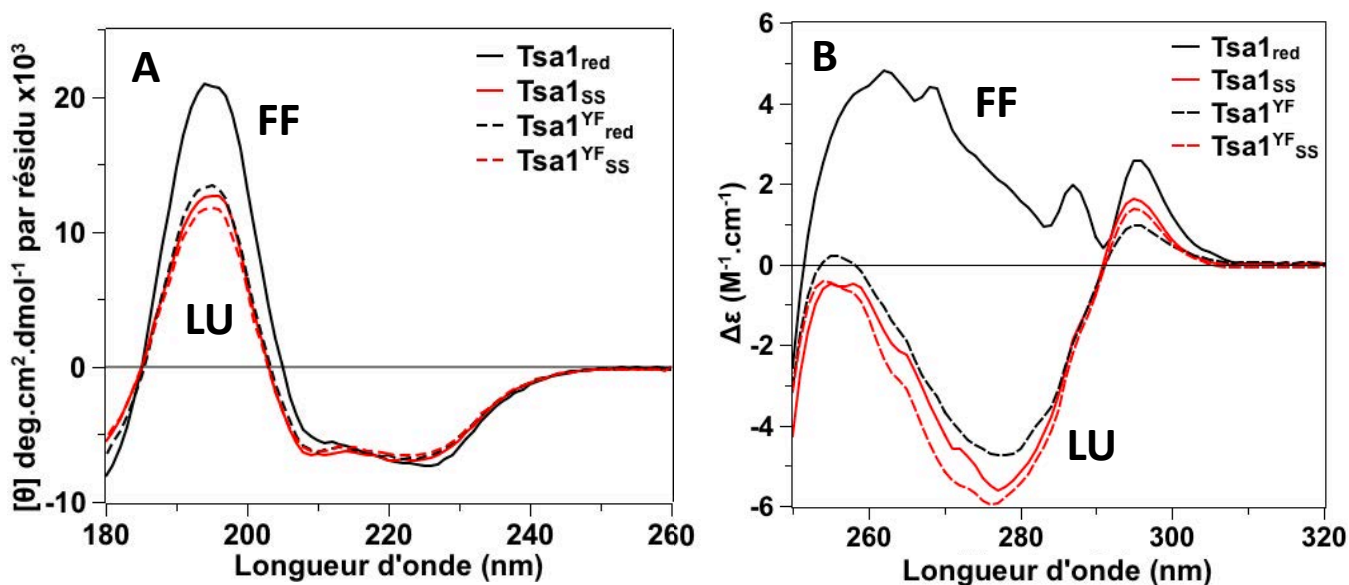


Fig. 45. Spectres de dichroïsme circulaire de Tsa1 et Tsa1^{YF}. A. spectres obtenus dans l'UV lointain B. spectres obtenus dans l'UV proche. Tsa1_{red} = Tsa1 réduite (en noir) et Tsa1_{SS} = Tsa1 oxydée pont disulfure (en rouge), Tsa1^{YF}_{red} = Tsa1^{YF} réduite (en tirets noirs) et Tsa1^{YF}_{SS} = Tsa1^{YF} oxydée pont disulfure (en tirets rouges), concentration de l'enzyme : 50 μM .

Comme le prouvent les spectres CD du mutant Tsa1^{YF}, dans l'UV proche et dans l'UV lointain, les formes réduite Tsa1^{YF}_{red} et oxydée Tsa1^{YF}_{SS} sont quasiment superposables, et correspondent au spectre de Tsa1_{SS} sauvage. Ceci montre que le mutant Tsa1^{YF} existe dans une conformation très proche de la forme LU dans ces deux états redox, réduit et oxydé par pont disulfure (Fig. 45).

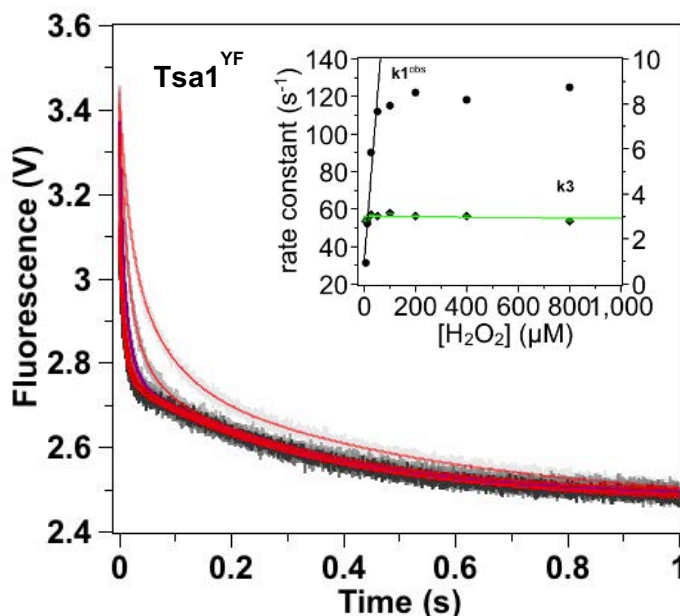


Fig. 46. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1^{YF} avec H₂O₂ en concentration croissante (5 à 800 μM). Les ajustements selon un modèle bi-exponentiel décroissant sont indiqués en rouge. Encart : Valeurs des constantes de vitesse $k1^{obs}$ et $k3$ en fonction de la concentration en H₂O₂, les valeurs de $k1^{obs}$ sont représentées par des cercles noirs (axe gauche), les valeurs de $k3$ par des diamants noirs (axe droit).

La réaction de Tsa1^{YF} avec H₂O₂ en conditions de cycle catalytique unique suivie par fluorescence a révélé une cinétique constituée de deux phases décroissantes (Fig. 46) : une phase rapide de second ordre par rapport à [H₂O₂], dont la constante de vitesse $k1^{obs}$ atteint un plateau vers 120 s⁻¹ et une phase plus lente de premier ordre de constante de vitesse environ $3 \pm 0,1$ s⁻¹ proche de la valeur de 4.6 ± 0.3 s⁻¹ mesurée pour l'enzyme sauvage. La phase croissante correspondant à la phase 2 observée pour l'enzyme sauvage n'est pas observée pour ce mutant. Ce résultat suggère que la phase 2 pourrait correspondre à un événement conformationnel associé à la transition FF/LU. Dans cette hypothèse, la phase 3 pourrait être attribuée à l'étape de formation du pont disulfure C_P-C_R.

4. La phase 2 est associée à la transition conformationnelle FF/LU

Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons poursuivi les études cinétiques en utilisant des approches permettant d'identifier spécifiquement des processus de changement de conformation.

A. Cinétiques en présence de viscosogène

L'étude à l'état préstationnaire a été reproduite en tirant parti de l'impact d'un composé viscosogène sur les cinétiques réactionnelles. En effet, l'augmentation de la viscosité a été montrée comme affectant sélectivement les étapes de changement conformationnel, à l'opposé des étapes purement « chimiques » au cours d'un cycle enzymatique (Bakhtina et al., 2005; Rahuel-Clermont et al., 2019). Au préalable, l'effet de l'ajout de concentrations croissantes d'agent viscosogène, ici le saccharose, a été testé par dilution d'une solution de l'acide aminé Trp (10 μ M). L'absence d'artefact dans les cinétiques obtenues par fluorescence montre l'efficacité de mélange rapide de l'appareil de stopped flow dans un milieu de viscosité croissante (Fig. 47).

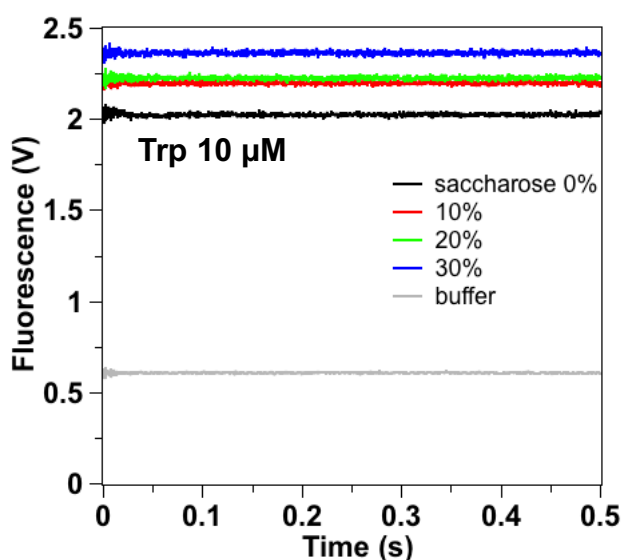


Fig. 47. Test de l'efficacité de mélange de solutions visqueuses en cinétique rapide. Méthode basée sur la fluorescence du Trp (10 μ M) en présence de saccharose (0% noir, 10 % rouge, 20% vert et 30% bleu).

Afin d'évaluer l'impact de l'ajout de saccharose sur la cinétique triphasique de Tsa1, nous avons choisi une concentration en H_2O_2 à laquelle les 3 phases sont bien résolues. La concentration a été fixée à 10 μ M et des concentrations croissantes de saccharose ont été additionnées au tampon.

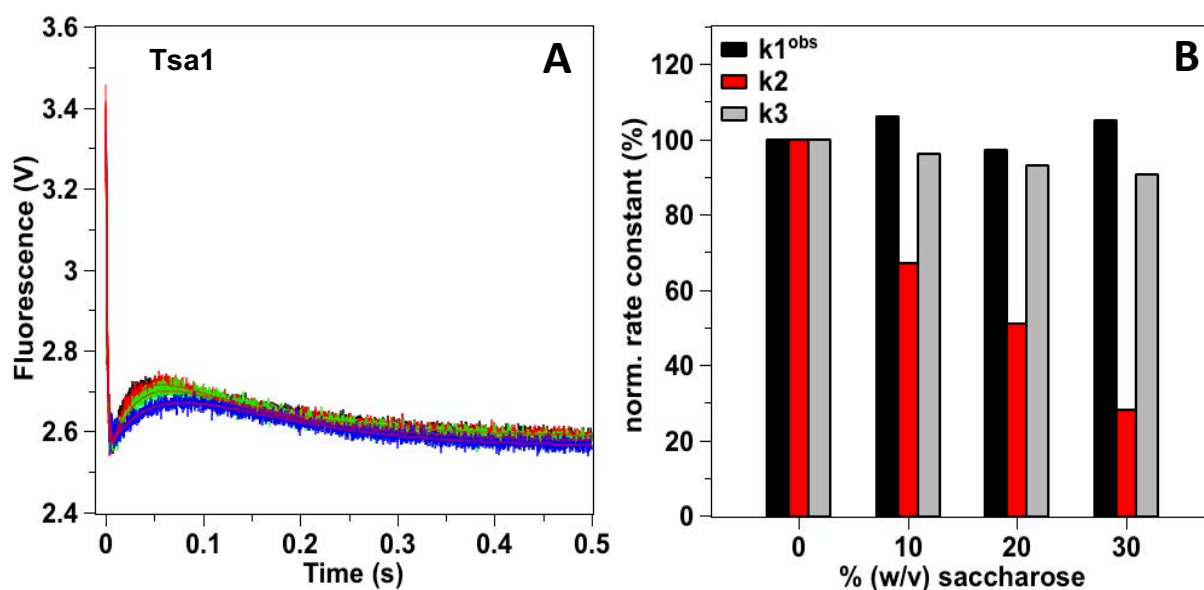


Fig. 48. A. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 avec H_2O_2 en présence de viscogène : 0% noir, 10% rouge, 20% vert et 30% bleu. Les ajustements sont indiqués en rouge. **B.** Histogramme normalisé à partir des constantes de vitesse à 0% en viscogène. Les trois phases sont représentées pour chaque pourcentage de saccharose.

Les résultats montrent clairement que seule la phase 2 de la réaction est affectée, avec une constante de vitesse $k2$ initialement mesurée à $64 \pm 5 \text{ s}^{-1}$, qui diminue drastiquement (jusqu'à - 72% à 30% de saccharose) (Fig. 48), alors que les constantes de vitesse des phases 1 et 3 restent quasiment inchangées. Afin de vérifier que le saccharose n'interagit pas de façon spécifique avec Tsa1, l'expérience a été répétée en présence de deux autres agents viscogènes, le sorbitol et le fructose. La Fig. 49 montre des résultats très similaires à ceux obtenus avec le saccharose.

Ces résultats sont des arguments supplémentaires en faveur de l'attribution de la phase 2 à une étape de changement conformationnel.

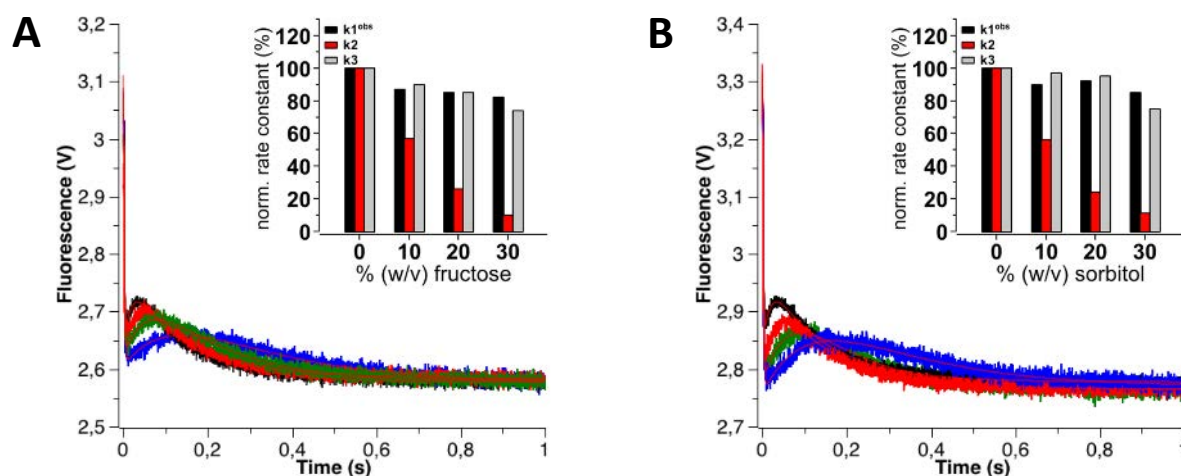


Fig. 49. Effet des viscogènes : fructose (A) et sorbitol (B) (0 % noir, 10 % rouge, 20 % vert et 30 % bleu) sur la réaction de Tsa1 (5 μ M) avec H₂O₂ (10 μ M) en conditions identiques à la figure 2. Les courbes sont ajustées avec une équation triple exponentielle (lignes rouges). Insets, effet de la concentration de viscogène sur les constantes de vitesse k_1^{obs} , k_2 et k_3 normalisées à 0% de viscogène.

B. Suivi de la cinétique réactionnelle par dichroïsme circulaire

Pour asseoir et valider définitivement cette hypothèse, nous avons utilisé une méthode complémentaire utilisant le signal de dichroïsme circulaire comme sonde pour détecter une éventuelle étape conformationnelle au cours de la réaction. En effet, les spectres CD de Tsa1 dans ses deux conformations FF (Tsa1_{red}) et LU (Tsa1_{ss}) sont significativement différents (Fig. 50). Pour cela nous disposons d'un appareil de CD couplé à un module de stopped flow, qui permet de mesurer l'évolution du signal CD en cinétique rapide.

Nous avons dans un premier temps tenté de suivre la réaction en utilisant le signal CD dans l'UV lointain, entre 195 et 205 nm. Cependant, la protéine générant un fort signal de CD donc un fort bruit de fond, aucune variation de signal n'a pu être détectée au cours de la réaction. Nous avons donc utilisé le signal dans l'UV proche. Lors de l'oxydation sous forme Tsa1_{ss}, la protéine présente une variation de signal très importante du signal CD entre 260 et 280 nm. Néanmoins, l'intensité du signal CD dans l'UV proche est beaucoup plus faible que dans l'UV lointain, ce qui implique d'utiliser une concentration en protéine beaucoup plus élevée (50 μ M) et d'accumuler un grand

nombre de tirs au stop flow. En conséquence, la concentration en H_2O_2 utilisée a été augmentée à $100\ \mu\text{M}$ pour rester en excès de substrat par rapport à l'enzyme. Dans ces conditions, avec une constante k_1 de $9,7\ 10^7\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la phase 1 a une constante de vitesse k_{obs} de $9700\ \text{s}^{-1}$, trop rapide pour être observée au stopped flow dans ces conditions.

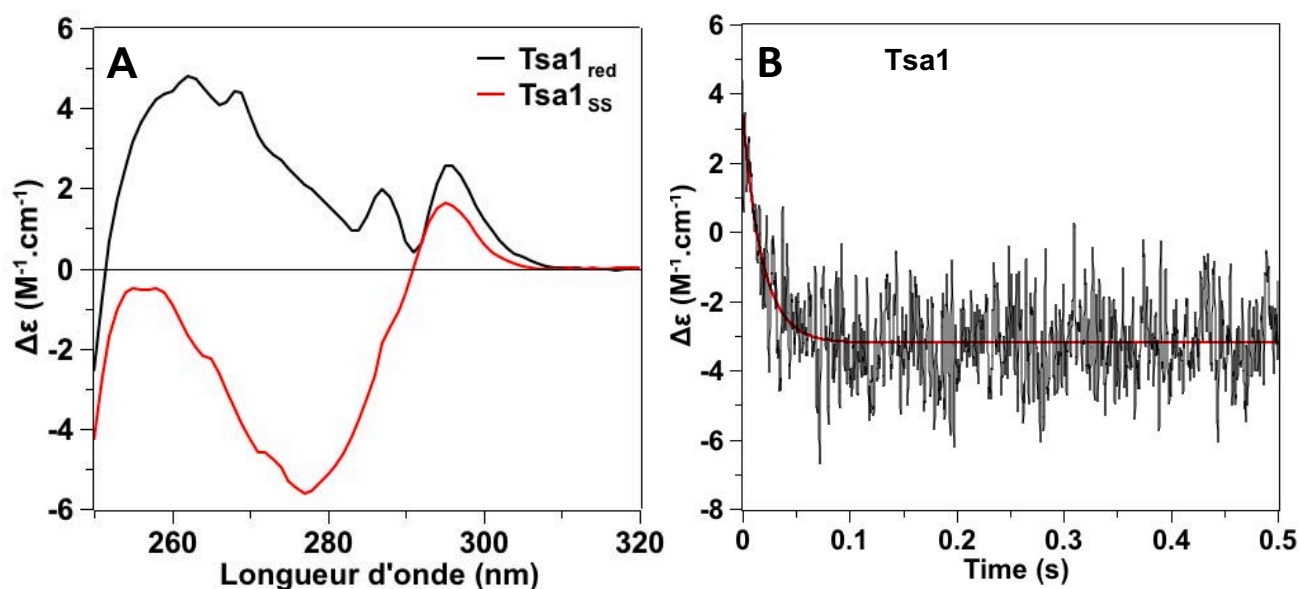


Fig. 50. **A.** Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche obtenu pour Tsa1 ($50\ \mu\text{M}$) sous les formes réduite (noir) et oxydée pont disulfure (rouge). **B.** Cinétique rapide avec suivi du signal dichroïque à 270 nm de la réaction de Tsa1 avec H_2O_2 . Moyenne de 50 tirs cumulés. Ajustement à une équation mono-exponentielle de la courbe (rouge).

Les résultats obtenus montrent une cinétique décroissante du signal dichroïque à 270 nm, en accord avec la modification de l'environnement tertiaire des résidus aromatiques lors du passage de la forme FF à la forme LU de l'enzyme. Cette cinétique est analysée selon un modèle monoexponentiel, avec une constante de vitesse de $54 \pm 2\ \text{s}^{-1}$. Cette valeur, très proche de la constante de vitesse déterminée pour l'étape 2, k_2 de $64\ \text{s}^{-1}$, suggère que ce signal correspond au même événement que la phase 2 mesurée en fluorescence. Les résultats obtenus en utilisant le mutant Tsa1^{YF} , les agents viscogènes et le signal de CD convergent donc vers la même conclusion : la phase 2 correspond probablement à une étape de changement conformationnel associée à la transition FF/LU.

Par conséquent, il apparaît que les étapes de changement conformationnel et de formation du pont disulfure, avec des constantes de vitesse de $64\ \text{s}^{-1}$ et $4,6\ \text{s}^{-1}$,

respectivement, sont des étapes cinétiquement distinctes, contrairement à ce que suppose le modèle actuellement admis.

5. Etude de la Prx1 humaine

La Tsa1 appartient à la classe des Prx1 sensibles à la suroxydation. Afin de déterminer si une étape associée à un changement conformationnel est observée de façon générale au cours du mécanisme réactionnel d'autres Prx1, nous avons étudié la Prx1 humaine (hPrx1) par la même technique en utilisant le suivi par fluorescence des Trp.

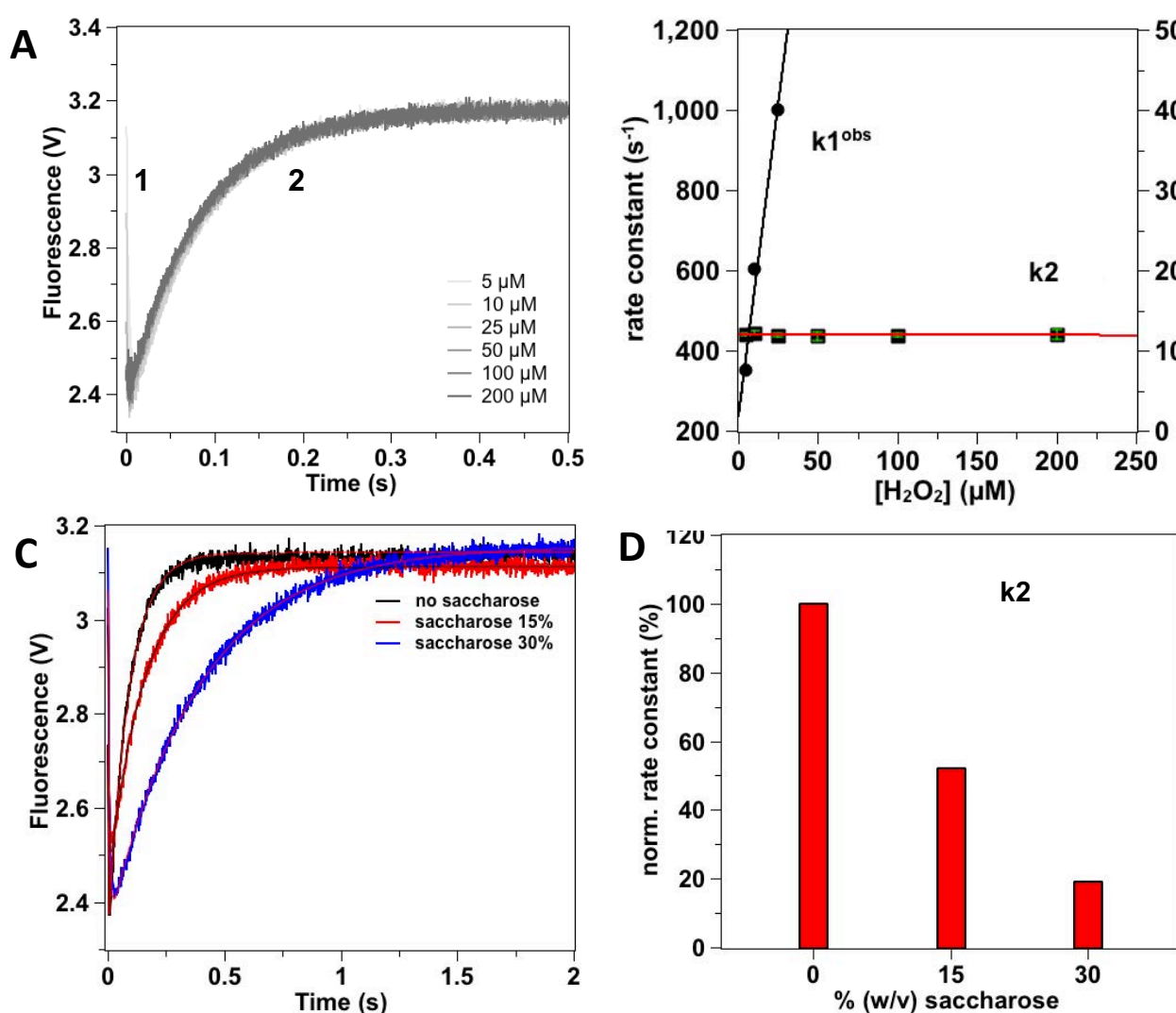


Fig. 51. **A.** Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de hPrx1 avec des concentrations croissantes de H_2O_2 **B.** Valeurs des constantes de vitesse k_1^{obs} et k_2 en fonction de la concentration en H_2O_2 , les valeurs de k_1^{obs} sont représentées par des ronds noirs (axe gauche), les valeurs de k_2 par des carrés noirs (axe droit) **C.** idem A. en présence de viscosogène : 0% noir, 15% rouge et 30% bleu. Les ajustements sont indiqués en rouge ou noir. **D.** Histogramme normalisé à partir des constantes de vitesse à 0% en viscosogène. La seconde phase est représentée pour chaque pourcentage de saccharose.

La figure 51A montre que la cinétique de la réaction de hPrx1 avec H₂O₂ conduite dans les mêmes conditions que Tsa1, présente deux phases cinétiques. La première, décroissante très rapide, dont la constante de vitesse dépend linéairement de la concentration d'H₂O₂, avec une constante de vitesse k_1 d'au moins $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce résultat est pleinement cohérent avec des résultats obtenus par une autre équipe sur la même enzyme (Dalla Rizza et al., 2018).

La cinétique de cette phase n'est pas affectée par l'ajout d'agent visco-gène, et correspond donc à la phase 1 d'attaque de la Cys C_P sur H₂O₂ (Fig. 51). La constante de vitesse de la seconde phase croissante est insensible à la variation de concentration en H₂O₂ mais très dépendante de la concentration en saccharose. Par conséquent, elle pourrait refléter une étape de changement de conformation comme l'étape 2 observée pour Tsa1. Cependant, comme dans le cas de Tsa1, dans ces conditions la réaction aboutit à la formation de Prx1 oxydée par pont disulfure C_P-C_R. Par conséquent, il est probable que le signal de fluorescence de cette phase croissante soit une combinaison des changements de fluorescence associés à la transition FF/LU et à la formation du pont disulfure. Les différences observées par rapport à Tsa1 s'expliquent en partie par l'absence du résidu W161 dans l'enzyme humaine. Néanmoins, la sensibilité de la constante de vitesse de cette seconde phase à la viscosité indique que sa cinétique est contrôlée majoritairement par l'étape de changement conformationnel (Fig. 51C,D). La valeur de sa constante de vitesse en l'absence de saccharose, de $10,8 \text{ s}^{-1}$ est 6 fois plus faible que la valeur de k_2 obtenue pour la Tsa1.

Afin de confirmer ce résultat par l'approche par CD, les spectres de hPrx1 ont été enregistrés dans l'UV proche. Cependant, la différence de signal entre les formes réduite et oxydée de hPrx1 est trop faible pour pouvoir suivre la cinétique de la réaction par cette approche (Fig. 52). Comme pour le signal de fluorescence, ce résultat est dû aux différences de contenu en résidus aromatiques des deux protéines, la Tsa1 contenant 4 Phe de moins mais un Trp supplémentaire par rapport à hPrx1.

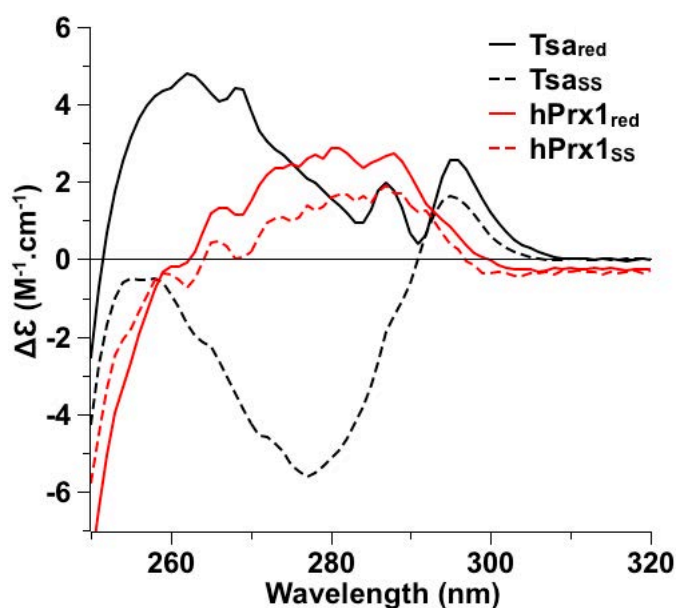


Fig. 52. Spectres CD dans l'UV proches de Tsa1 et hPrx1 sous formes réduite et oxydée pont disulfure. Tsa1 en noir, hPrx1 en rouge.

En conclusion, les études à l'état pré-stationnaire nous ont permis de corréler aux différentes étapes du mécanisme catalytique les phases cinétiques de la réaction de Tsa1 avec H_2O_2 suivie en conditions de cycle unique par fluorescence des Trp. L'objectif est maintenant de corréler ces données cinétiques à la sensibilité à la suroxydation de Tsa1.

III. Corrélation entre sensibilité à la suroxydation et transition FF/LU

1. Design de mutants de Tsa1 de sensibilité variable à la suroxydation

A. Choix des mutations

Identifier les événements du cycle enzymatique déterminant la sensibilité d'une Prx à la suroxydation implique de corréler cette sensibilité et les cinétiques individuelles de ces événements. Nous disposons d'une méthode permettant d'évaluer ces paramètres cinétiques. Il est maintenant nécessaire de pouvoir les corréler à la mesure quantitative de la suroxydation. Pour cela, nous devons (1) disposer de Prx de sensibilité variable, par la génération de mutants de Tsa1 et (2) adapter la méthode de mesure de sensibilité à la Tsa1 spécifiquement.

Dans le but de moduler la sensibilité de Tsa1 à la suroxydation, une batterie de mutants ciblant la zone C-terminale de l'enzyme ont été générés. En effet, cette région a été identifiée comme un élément majeur responsable de la sensibilité des Prx à la suroxydation, sa délétion entraînant l'abolition de la sensibilité à la suroxydation, sans affecter son activité peroxydase (Koo et al., 2002). Par ailleurs, l'échange d'une série de 4 résidus situés dans la boucle immédiatement en aval de la Cys C_R de la Prx3 vers la Prx2 (très sensible par rapport à Prx3) humaines a permis de modifier les propriétés de suroxydation de Prx2 (Haynes et al., 2013).

Parmi les mutants générés au cours de l'étude, nous nous sommes concentrés sur les deux mutants suivants : la Tsa1 W161F (**Tsa1^W**), ciblant le Trp situé sur l'hélice 5 précédant la région C-terminale, et le mutant Tsa1 A177S A178D (**Tsa1^{AA}**) dont les résidus Alanine ont été remplacés par les résidus en position équivalente sur la Prx1 humaine. Ces deux positions appartiennent à la région précédemment identifiée comme étant déterminante pour la sensibilité dans l'étude citée ci-dessus (Haynes et al., 2013).

B. Détermination de l'activité peroxydase des variants de Tsa1

En premier lieu, nous avons évalué l'impact des mutations sur l'activité peroxydase de Tsa1 à l'état stationnaire. Pour cela, nous utilisons une méthode de mesure à l'état stationnaire utilisant un système couplé avec la Trx, la TR et le NADPH dont la consommation est suivie par spectrophotométrie d'absorbance à 340 nm.

Dans ce test, la Tsa1 (0,5 µM) est ajoutée à un pré-mélange constitué de H₂O₂ (100 µM), la Trx (150 µM), la TR (2 µM) et le cofacteur NADPH (200 µM). Ces concentrations correspondent à des valeurs saturantes ou optimales pour la réaction à l'état stationnaire : nous avons déterminé la concentration optimale de TR au delà de laquelle la vitesse mesurée ne varie plus. Nous avons utilisé la concentration optimale de peroxyde d'hydrogène à laquelle aucune suroxydation significative n'est perceptible. La concentration saturante de Trx a été déterminée en mesurant la variation de la constante de vitesse k_{obs} en fonction de la concentration en Trx, ajustée par régression linéaire à l'équation de Michaelis-Menten, qui a indiqué un K_M de 64 µM pour la Tsa1 sauvage (résultats non montrés).

Équation 1 :
$$k_{obs} = (k_{max} \times [Trx]) / (K_M + [Trx])$$

La consommation d'H₂O₂ par Tsa1 puis son recyclage par la Trx et la TR conduit à la consommation de NADPH, il en résulte une baisse proportionnelle de l'absorption à 340 nm. La pente de la droite dès les premiers instants de la réaction correspond à la vitesse initiale de réduction d'H₂O₂, donc à l'activité peroxydase de l'enzyme. La constante de vitesse à l'état stationnaire $k_{\text{steady state}}$ est obtenue par division de la pente par la concentration de l'enzyme et par le coefficient d'extinction molaire de NADPH :

Équation 2 : $k_{\text{steady state}} = \frac{\text{pente}}{\epsilon_{340 \text{ nm NADPH}} \cdot [\text{Tsa1}]}$ avec $\epsilon_{340 \text{ nm NADPH}} = 6\,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Les résultats obtenus pour la forme sauvage et les mutants actifs utilisés dans la suite de l'étude (voir II.3.) sont rassemblés dans le tableau 5 ci-dessous :

	wt	Tsa1 ^{AA}	Tsa1 ^W	Tsa1 ^{YF}
$k_{\text{steady state}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$2,42 \pm 0,18$	$2,62 \pm 0,12$	$2,77 \pm 0,47$	$2,43 \pm 0,13$

Tableau 5 : Constante de vitesse $k_{\text{steady state}}$ mesurée à l'état stationnaire par suivi de l'absorbance à 340 nm.

Comme le montrent les résultats obtenus, les formes mutées qui seront utilisées dans cette étude conservent une activité peroxydase similaire à celle de la Tsa1 sauvage. Les valeurs de $k_{\text{steady state}}$ obtenues étant inférieures à celles des étapes mesurées à l'état préstationnaire, ces résultats suggèrent également que l'étape de recyclage par la Trx est majoritairement limitante (constante k_{Trx} voir Fig.36), bien que la formation du pont disulfure C_P-C_R, avec une constante de vitesse de l'ordre de 5 s⁻¹, contribue probablement aussi à la cinétique à l'état stationnaire.

C. Caractérisation des variants de Tsa1 par CD

Les deux mutations ciblent la région C-terminale de Tsa1 dont la flexibilité joue un rôle important dans la stabilité de la conformation FF. En première approche pour évaluer l'impact des mutations sur la conformation de cette région, nous avons analysé les spectres de CD de mutants à l'état réduit dans l'UV lointain, en utilisant comme spectres de référence ceux de la Tsa1 sauvage (correspondant à l'état FF) et du mutant

Tsa1^{YF} (correspondant à la conformation LU) (Fig. 53). A l'état réduit, la Tsa1^W conserve une conformation majoritairement FF, alors que la conformation de la Tsa1^{AA} semble déplacée vers une forme intermédiaire entre FF et LU. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : soit l'équilibre FF LU est déplacé vers la formation de LU et le mutant existe à ~30% sous la forme LU et à ~70% sous la forme FF, soit le mutant existe dans une conformation intermédiaire entre les formes limites FF et LU.

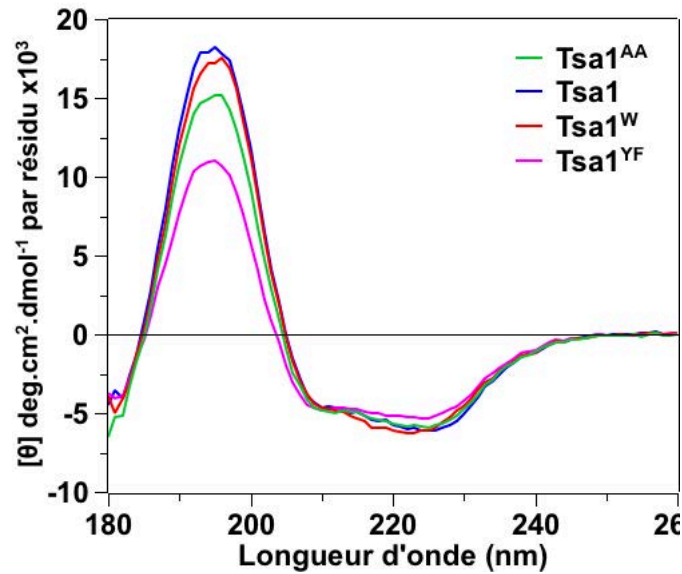


Fig. 53. Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, de Tsa1wt et mutants. Tsa1 wt (bleu), Tsa1^{AA} (vert), Tsa1^W (rouge) et Tsa1^{YF} (rose), concentration de l'enzyme : 50 μM.

2. Classification des Prx selon leur sensibilité à la suroxydation : paramètre C_{Hyp1%}

A. Principe de la méthode

Dans le but de quantifier la sensibilité à la suroxydation des Prx, Nelson et coll. en 2013, ont présenté un modèle basé sur la compétition entre la formation du pont disulfure et la réaction de suroxydation par une deuxième molécule de peroxyde, ainsi que sur l'étape de changement conformationnel. Sur la base de ce modèle, que nous avons présenté en Introduction (Fig. 36), la fraction de l'enzyme ayant une propension à s'inactiver par suroxydation à chaque cycle catalytique peut être décrit par :

$$f_{inact} = \frac{k_{SO_2}[ROOH][Prx^{FF} - SOH]}{k_{SO_2}[ROOH][Prx^{FF} - SOH] + k_{LU}[Prx^{FF} - SOH] - k_{FF}[Prx^{LU} - SOH]}$$

Avec k_{SS} et k_{SO_2} , les constantes de vitesse de formation du pont disulfure et de suroxydation respectivement, $[ROOH]$ la concentration en peroxyde, $[Prx^{FF}\text{-SOH}]$ et $[Prx^{LU}\text{-SOH}]$ les concentrations en intermédiaire acide sulfénique sous les conformations FF et LU.

L'équation se simplifie en divisant par $[Prx^{FF}\text{-SOH}]$ et si l'on considère que FF et LU sont en équilibre rapide, le ratio $[Prx^{LU}\text{-SOH}] / [Prx^{FF}\text{-SOH}]$ peut être remplacé par K_{LU} pour obtenir :

$$f_{inact} = \frac{k_{SO_2}[ROOH]}{k_{SO_2}[ROOH] + k_{SS}K_{LU}}$$

Si l'on considère que l'on choisit les conditions expérimentales telles que $f_{inact} < 5\%$ soit 0,05, impliquant que le premier terme du dénominateur devient quasi négligeable comparé au second terme $k_{SS}K_{LU}$, on obtient alors par simplification :

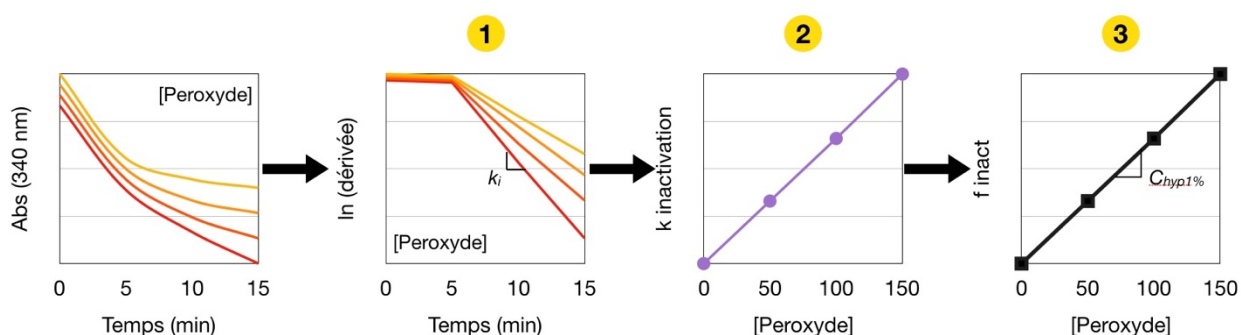
$$f_{inact} \approx \frac{k_{SO_2}[ROOH]}{k_{SS}K_{LU}}$$

Ce raisonnement prédit que le tracé de f_{inact} en fonction de la concentration en peroxyde est linéaire avec une pente est égale à $\frac{k_{SO_2}}{k_{SS}K_{LU}}$. Ce paramètre intrinsèque à la Prx testée, exprimé en M^{-1} , permet de quantifier la sensibilité de l'enzyme à la suroxydation. Dans le but de rendre ce paramètre plus intuitif, les auteurs ont proposé d'utiliser plutôt une valeur correspondant à la concentration en peroxyde à laquelle 1% de l'enzyme se retrouve sous forme suroxydée en un cycle catalytique : c'est le paramètre $C_{Hyp1\%}$:

$$C_{Hyp1\%} = \frac{pente^{-1}}{100} \text{ en } mol.L^{-1}$$

Du point de vue pratique, la valeur de f_{inact} est mesurée en utilisant le test d'activité couplé à la Trx. Au cours de la réaction, l'enzyme se suroxyde et une fraction s'inactive à chaque cycle catalytique, entraînant une baisse relative de consommation de NADPH et une incurvation progressive de la droite initiale **(1)**. Ces conditions expérimentales en conditions de cycle catalytique multiple permettent d'observer la

suroxydation à des concentrations en H_2O_2 relativement faibles. Pour extraire la constante de vitesse d'inactivation, les courbes sont transformées en dérivées première. L'évolution de cette dérivée devrait donc donner un plateau, correspondant à la vitesse initiale de la réaction, puis une cinétique de premier ordre caractérisée par la constante de vitesse d'inactivation k_i . A partir d'une représentation dont l'axe des ordonnées est logarithmique, ce qui permet de linéariser cette cinétique, la constante de vitesse k_{inact} est déduite de la pente des droites obtenues (2). k_{inact} est ensuite divisée par la constante de vitesse initiale (au temps $t=0$) pour donner la fraction d'inactivation f_{inact} . En restant sous les 5% de fraction suroxydée, la valeur f_{inact} dépend linéairement de la concentration en peroxyde. L'inverse de la pente de cette droite nous permet d'obtenir la concentration en peroxyde nécessaire pour suroxyder 100% de Tsa1 en un cycle catalytique. Pour obtenir $C_{\text{Hyp1\%}}$, valeur correspondant à la concentration en peroxyde nécessaire pour suroxyder 1% du pool d'enzyme, nous divisons le résultat précédent par 100 (3).



B. Mise au point pour la Tsa1

Pour pouvoir déterminer précisément la constante de vitesse d'inactivation, il est essentiel de trouver des conditions expérimentales dans lesquelles l'inactivation est significative mais suffisamment longue pour en déterminer la cinétique. Pour cela un compromis doit être trouvé entre les concentrations en Tsa1 et en Trx qui contrôlent la fréquence des cycles catalytiques, donc la probabilité de suroxydation.

Des manipulations préliminaires ont été nécessaires pour mettre au point les bonnes conditions de concentration en TR, Trx et Tsa1. Validées, ces conditions expérimentales ont été adoptées par la suite.

C. Quantification de la sensibilité à la suroxydation de Tsa1, de ses mutants et de hPrx1

Nous avons appliqué cette méthode à notre Prx modèle la Tsa1. Afin de valider notre procédure, nous l'avons utilisée pour déterminer la sensibilité à la suroxydation de hPrx1, qui a déjà été décrite dans la littérature.

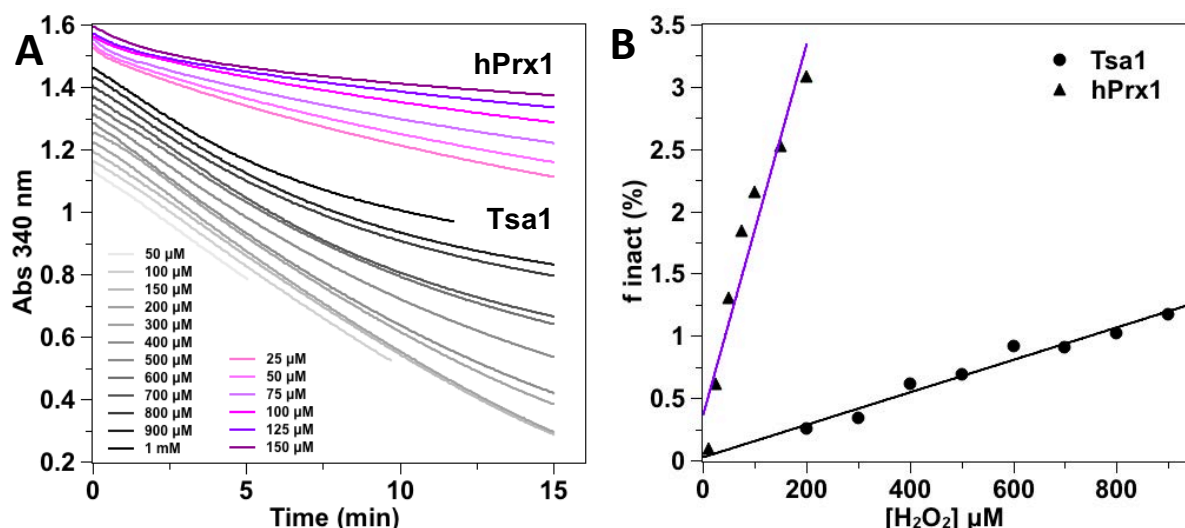


Fig. 54. A. Cinétiques à l'état stationnaire mettant en évidence le phénomène de suroxydation de Tsa1 ou hPrx1 par des concentrations croissantes de peroxyde H₂O₂ (de 50 μM à 1 mM, ou 25 μM à 150 μM, respectivement), suivi de la consommation de NADPH à 340 nm en présence de Trx1 (5 μM), de TR (0,25 μM) et de Tsa1 (1 μM) en tampon TK. B. Graphique représentant les valeurs de f_{inact} obtenues pour chaque concentration en peroxyde, avec Tsa1 (cercles et droite noire) en comparaison avec hPrx1 (triangles et droite mauve). Le paramètre $C_{\text{Hyp1\%}}$ est obtenu à partir de la pente des droites.

Comme attendu, les cinétiques de consommation de NADPH suivent une décroissance linéaire dans les premières minutes, puis s'incurvent progressivement de façon de plus en plus prononcée lorsque la concentration en H₂O₂ augmente. Le tracé de f_{inact} à partir de ces cinétiques confirme que les conditions expérimentales respectent la condition $f_{\text{inact}} < 5\%$, ce qui conduit à une augmentation linéaire en fonction de la concentration en H₂O₂ (Fig. 54).

Les valeurs de $C_{\text{Hyp1\%}}$ obtenues sont de 80 μM et 730 μM pour hPrx1 et Tsa1 respectivement. Ces résultats permettent de chiffrer la sensibilité des peroxyrédoxines et de les comparer. Dans notre cas de figure, hPrx1 ne nécessite que 80 μM d'H₂O₂ pour suroxyder 1% de son pool en un cycle catalytique. Cette valeur est conforme à la valeur

de 62 μM publiée (Nelson et al., 2013), confirmant la validité de nos conditions expérimentales. Tsa1 est au contraire beaucoup plus résistante à la suroxydation puisqu'il est nécessaire de faire réagir 730 μM de peroxyde pour obtenir un résultat équivalent soit environ un facteur 9. Ces résultats sont probablement en lien avec le mode de vie unicellulaire de la levure, donc sa plus forte exposition à des stress environnementaux, et la nécessité pour l'organisme de posséder une peroxydase plus robuste.

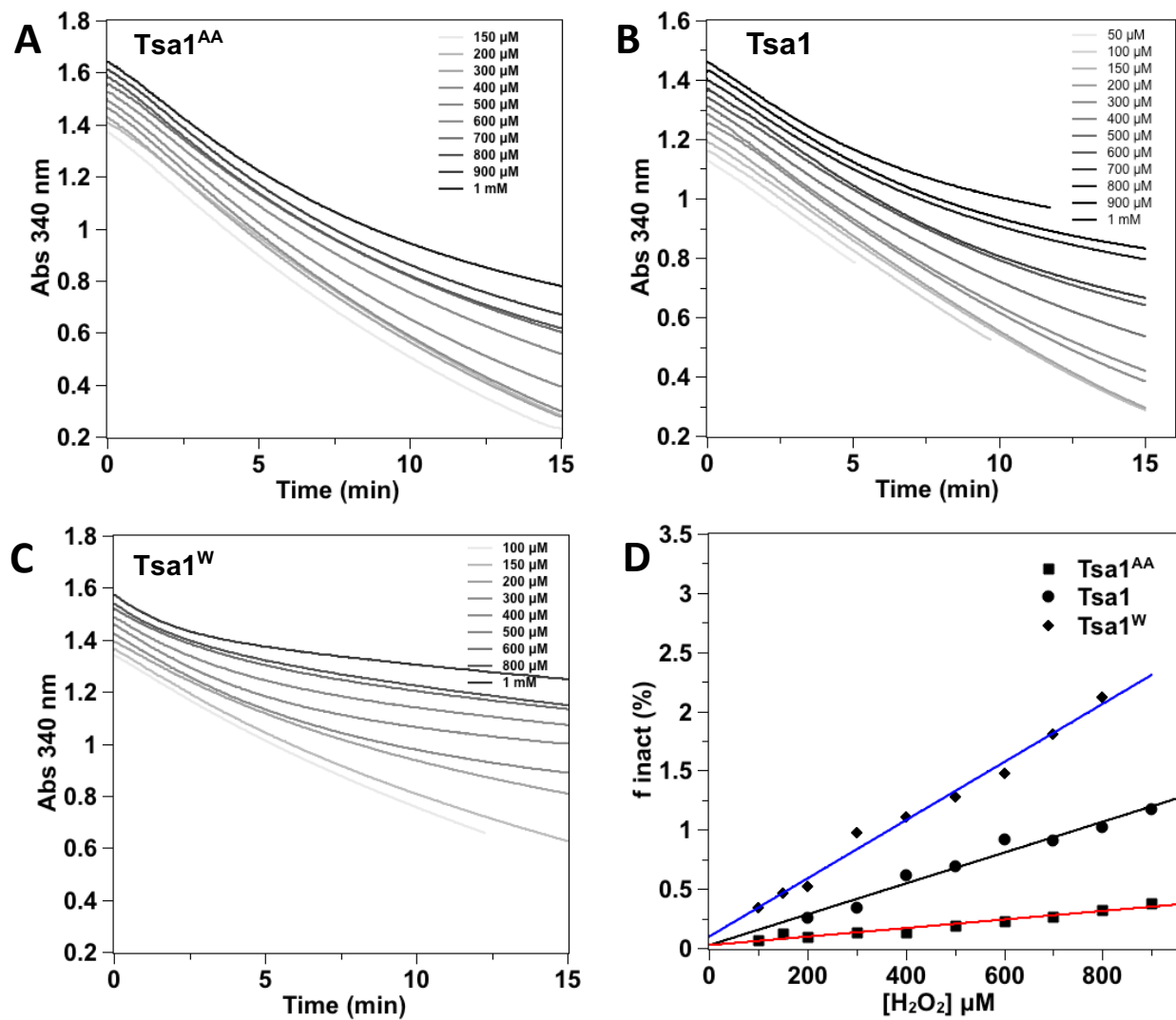


Fig. 55. A, B, C. Cinétiques à l'état stationnaire mettant en évidence le phénomène de suroxydation de Tsa1^{AA}, Tsa1 et Tsa1^W par des concentrations croissantes de peroxyde H_2O_2 (de 50 μM à 1 mM). D. Graphique représentant les valeurs de f_{inact} obtenues pour chaque concentration en peroxyde, avec Tsa1 (cercles et droite noire) en comparaison avec Tsa1^{AA} (carrés et droite rouge) et Tsa1^W (losanges et droite bleue). Le paramètre $C_{\text{Hyp}1\%}$ est obtenu à partir de la pente des droites.

Nous avons ensuite comparé la sensibilité des mutants Tsa1^W et Tsa1^{AA} à celle de Tsa1 (Fig. 55). Comme le montre l'évolution de la fraction inactivée en fonction de la concentration en peroxyde, les mutants présentent un comportement modifié face à la sensibilité à la suroxydation. En effet le mutant Tsa1^W est plus sensible avec une valeur de C_{Hyp1%} de 440 µM, alors que, de manière surprenante, le mutant Tsa1^{AA} est moins sensible avec un C_{Hyp1%} de 2620 µM. Nous disposons donc d'une série d'enzymes Tsa1^{AA}, Tsa1, Tsa1^W et hPrx1 de sensibilité à la suroxydation croissante, que nous voulons maintenant corrélérer aux constantes de vitesse des étapes du cycle catalytique.

3. Caractérisation cinétique du mécanisme catalytique des Tsa1 mutées

Afin de déterminer l'impact des mutations générées sur les cinétiques des différentes phases du cycle catalytique, la réaction des deux mutants Tsa1^W et Tsa1^{AA} avec H₂O₂ a été caractérisée en cinétique rapide. La cinétique de ces mutants est similaire à celle observée pour Tsa1 et caractérisée par 3 phases.

En premier lieu, l'attribution de la phase 2 à un événement de changement conformationnel associé à la transition FF/LU a été vérifiée par l'effet de l'addition de viscosogène sur les cinétiques. Nous constatons que l'effet du saccharose sur les cinétiques de mutants reproduit l'effet observé pour Tsa1, prouvant que cette phase correspond bien à l'étape de changement conformationnel (Fig. 56).

Les valeurs des constantes de vitesses mesurées pour les 3 étapes ont été calculées par ajustement des données selon une équation exponentielle triple (logiciel Pro-Data, Applied Photophysics) et sont rassemblées dans le tableau 6.

Équation 3 : **fluorescence (x) =** $a_1.e^{(-k_{obs1}.x)} + a_2.e^{(-k_{obs2}.x)} + a_3.e^{(-k_{obs3}.x)} + c$

où x correspond au temps, a₁, a₂ & a₃ aux valeurs d'amplitude, k₁, k₂ & k₃ aux constantes de vitesse pour chaque phase, et le paramètre c correspond à la valeur du signal de fluorescence de l'enzyme réduite.

La constante de vitesse de formation de l'intermédiaire Tsa1-SOH k₁ reste très élevée, supérieure à 10⁷ M⁻¹s⁻¹ pour les deux mutants. La constante de vitesse de formation du pont disulfure k₃ est peu affectée par les mutations. Par contre la constante de vitesse k₂ passe de 64 s⁻¹ à 37 s⁻¹ pour Tsa1^W et 216 s⁻¹ pour Tsa1^{AA}. Un lien de cause-à-effet peut

ainsi être proposé : une enzyme dont la vitesse de changement conformationnel est ralentie, est une enzyme plus sensible au phénomène de suroxydation, et vice-versa.

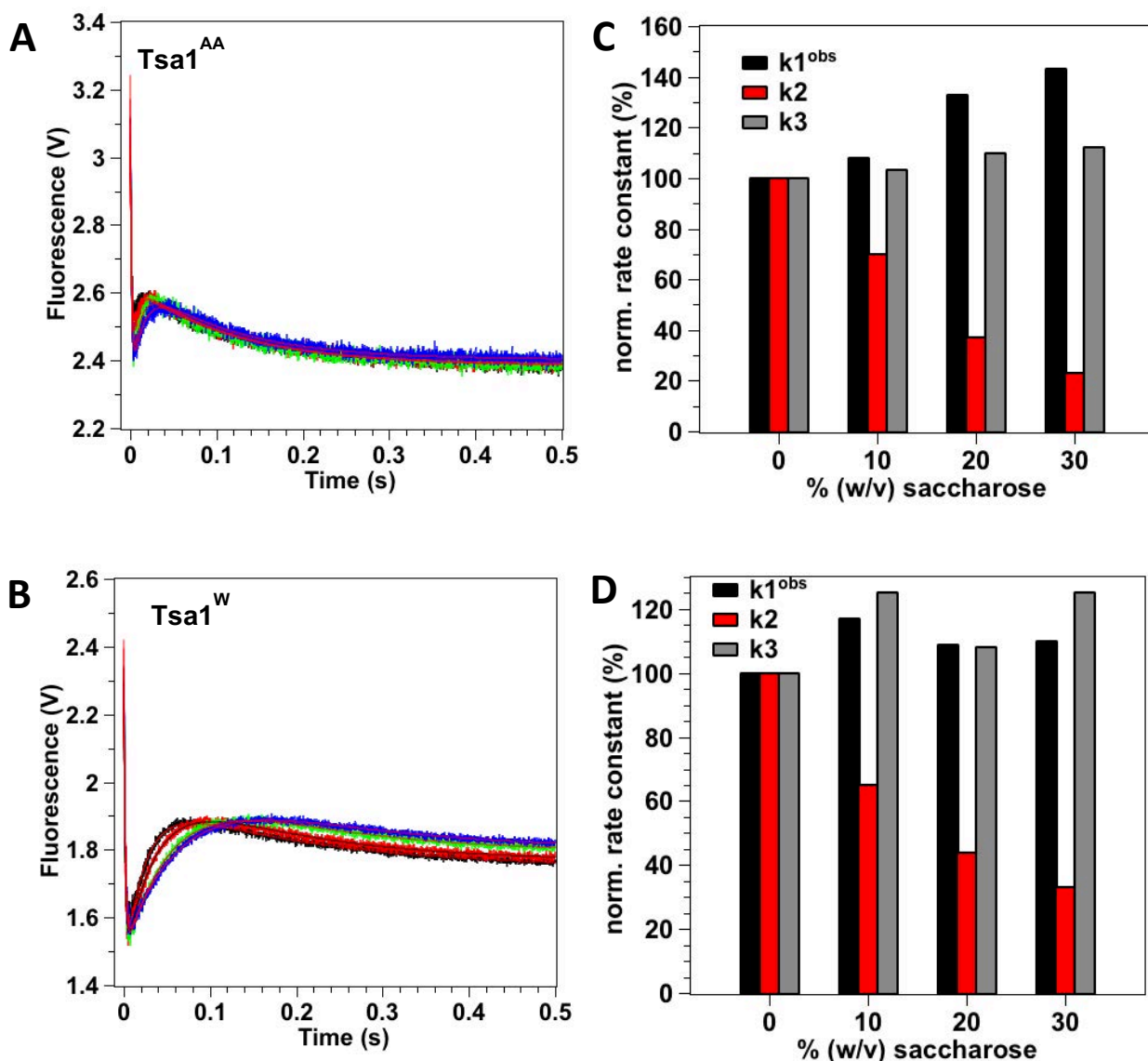


Fig. 56. A, B. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1^{AA} et Tsa1^W avec H₂O₂ en présence de viscogène : 0% noir, 10% rouge, 20% vert et 30% bleu. Les ajustements sont indiqués en rouge. **C, D.** Histogrammes normalisés à partir des constantes de vitesse à 0% en viscogène. Les trois phases sont représentées pour chaque pourcentage de saccharose.

	Tsa1 ^{AA}	Tsa1	Tsa1 ^W
$k_{\text{steadystate apparent}} (\text{s}^{-1})$	$2,6 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,5$
$C_{\text{hyp1\%}}$	2620 ± 220	730 ± 100	440 ± 90
$k_1 (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$(4 \pm 1,4) 10^7$	$(9,7 \pm 0,4) 10^7$	$(6,7 \pm 0,4) 10^7$
$k_2 (\text{s}^{-1})$	216 ± 41	64 ± 5	37 ± 1
$k_3 (\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$5,3 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,6$

Tableau 6. Récapitulatif des valeurs des constantes de vitesse associées à l'activité peroxydase de Tsa1 et de ses mutants.

IV. Existe-t-il une compétition directe entre suroxydation et transition FF/LU ?

1. Mesure directe de la cinétique de suroxydation de Tsa1 à l'état pré-stationnaire

A. La cinétique d'oxydation du mutant Tsa1^{C171A} révèle une phase correspondant à la suroxydation

En mutant la cystéine de recyclage de Tsa1, nous avons observé en cinétique rapide à l'état pré stationnaire, une augmentation significative du signal de fluorescence sur une échelle de temps plus longue que celle de la phase 2. La fluorescence de l'espèce TsaSO₂ étant supérieure à celle des autres formes redox, nous avons posé l'hypothèse que cette phase pourrait correspondre à la suroxydation. Pour identifier l'espèce formée, une analyse en spectrométrie de masse électrospray (ESI-MS) a été réalisée après 5 secondes de réaction de Tsa1^{C171A} avec H₂O₂ puis blocage de la réaction en conditions acides (Fig. 57). L'augmentation de la masse de Tsa1^{C171A} de 32 Da suggère que l'espèce majoritairement formée est l'espèce suroxydée Tsa1^{C171}SO₂.

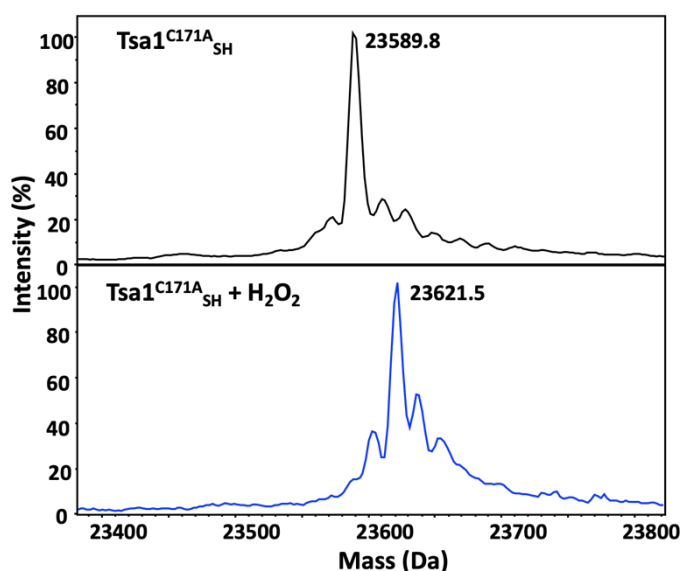


Fig. 57. A, B. Spectres de masse déconvolués présentant les espèces de Tsa1^{C171A} 5 μ M, avant et après réaction 5 secondes avec H₂O₂ 200 μ M puis blocage à l'acide TFA 0,1%.

La cinétique de la réaction de Tsa1^{C171A} avec H₂O₂ à l'état préstationnaire présente une phase rapide, décroissante, dont la constante de vitesse dépend de la concentration en H₂O₂. A l'instar des autres variants de Tsa1, cette phase peut être attribuée à la

formation de l'intermédiaire Tsa1^{C171A}-SOH. La constante de vitesse de cette étape est de $7.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, proche de celle de Tsa1 (Fig.58).

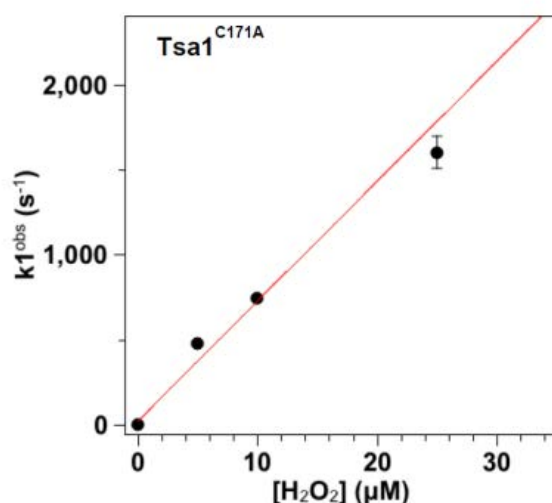


Fig. 58. Détermination de k1 pour Tsa1^{C171A} avec H₂O₂. Ajustement linéaire avec le logiciel SciDavis.

Mesurée sur une échelle de temps plus longue, où la première phase est trop rapide pour être observée, la réaction de Tsa1^{C171A} avec H₂O₂ est croissante et biphasique, avec une phase de faible amplitude et de constante de vitesse de $\sim 3 \text{ s}^{-1}$, insensible à la concentration en H₂O₂. La seconde phase (phase 4), dont la constante de vitesse dépend linéairement de [H₂O₂], reflète probablement la formation de la forme suroxydée puisque cette espèce est l'espèce majoritaire en fin de réaction (Fig. 59). La pente de cette droite permet de déterminer la constante de vitesse de suroxydation de l'enzyme k₄, égale à $(2,1 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Par cette approche, nous avons ainsi mis au point une méthode de mesure directe de la constante de vitesse de suroxydation de Tsa1.

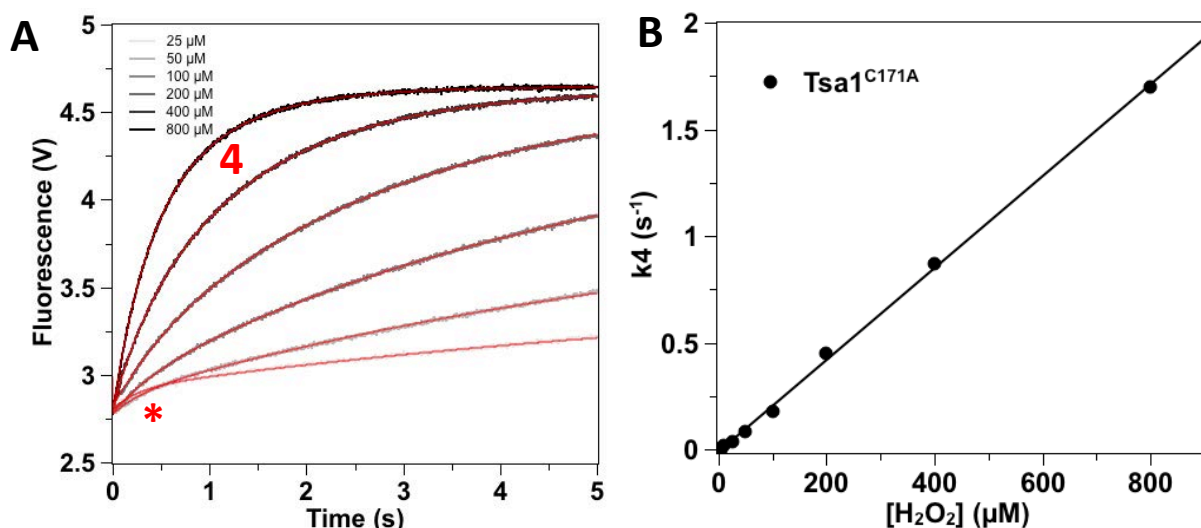


Fig. 59. A. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1^{C171A} avec des concentrations croissantes en H₂O₂ (gris clair vers noir). Les ajustements sont indiqués en rouge. **B.** Constantes de vitesse k₄ mesurées en fonction de la concentration en H₂O₂.

B. Détermination de la constante de vitesse k₄ des mutants Tsa1

En utilisant les mutants Tsa1^W et Tsa1^{AA}, nous avons montré ci-dessus qu'il existe une corrélation entre la cinétique de la phase 2 (k₂) et la sensibilité à la suroxydation. Afin de mesurer l'impact des mutations W161F et AA sur la constante de vitesse de suroxydation k₄, ces mutations ont été combinées à celle de la Cys C_R (C171A). Les valeurs des constantes de vitesses mesurées pour les deux étapes ont été calculées par régression non linéaire selon une équation exponentielle double (logiciel Pro-Data, Applied Photophysics) et sont rassemblées dans le tableau 6.

Équation 4 :
$$\text{fluorescence}(x) = a_1 \cdot e^{(-k_{obs1} \cdot x)} + a_2 \cdot e^{(-k_{obs2} \cdot x)} + c$$

où x correspond au temps, a₁ & a₂ aux valeurs d'amplitude, k₁ & k₂ aux constantes de vitesse pour chaque phase, et le paramètre c correspond à la valeur du signal de fluorescence de l'enzyme réduite.

Ces mutants présentent des cinétiques de réaction avec H₂O₂ semblables à celles de Tsa1^{C171A}. Les valeurs de k₄ obtenues sont du même ordre de grandeur, et avec des valeurs de k₄ de 1x10³ M⁻¹.s⁻¹ pour le mutant Tsa1^{C171A} AA (Tsa1^{CAA}) et 2.9x10³ M⁻¹.s⁻¹ pour le mutant Tsa1^WC171A (Tsa1^{WC}) (Fig.60).

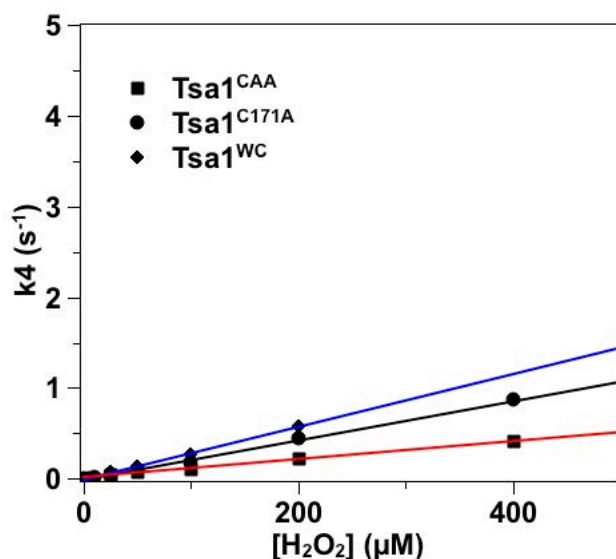


Fig. 60. Constantes de vitesse k_4 mesurées en fonction de la concentration en H_2O_2 pour Tsa1^{C171A} et les mutants Tsa1^{CAA} et Tsa1^{WC}.

2. Utilisation de peroxydes organiques

Afin d'analyser les paramètres déterminant la sensibilité à la suroxydation, nous avons exploité des mutants de Tsa1, et avons montré la corrélation entre la constante de vitesse de la phase 2 et la sensibilité à la suroxydation. Une autre approche est de « changer » de substrat. Dans l'hypothèse où la sensibilité à la suroxydation à d'autres peroxydes est différente de celle à H_2O_2 , la corrélation avec les cinétiques des différentes étapes du mécanisme pourrait apporter de nouvelles informations. De plus, l'étude de la réaction de Tsa1 avec ces peroxydes analogues des peroxydes lipidiques présente un intérêt en tant que tel. Deux peroxydes organiques ont été testés, le tert-butyl hydroperoxyde tBOOH et le cumène hydroperoxyde CuOOH. Composé d'une chaîne aliphatique de 4 carbones pour l'un et d'un noyau aromatique type phényle pour l'autre, ces peroxydes ont donc une composante hydrophobe marquée (Fig.61).



Fig. 61. Structures chimiques d'analogues de LOOH. A. t-BOOH ; B. CuOOH

Nous avons donc reproduit les expériences mises au point précédemment avec Tsa1 en utilisant le tBOOH et le CuOOH comme substrats.

A. Quantification de la sensibilité à la suroxydation de Tsa1 par les peroxydes organiques

La méthode de Nelson a été utilisée pour quantifier la sensibilité à la suroxydation de Tsa1 avec tBOOH et CuOOH (Fig. 62). Les résultats montrent que Tsa1 est bien plus sensible à la suroxydation par ces substrats qu'à H_2O_2 , comme le montre les valeurs de $C_{\text{hyp1\%}}$ obtenues, de $62 \pm 8 \mu\text{M}$ pour le tBOOH et $16 \pm 1 \mu\text{M}$ pour le CuOOH, soit 12 et 66 fois plus faibles comparées à la valeur obtenue pour H_2O_2 ($730 \mu\text{M}$). Dans le but d'identifier quel mécanisme est responsable de telles différences, nous avons étudié les cinétiques réactionnelles de Tsa1 avec ces substrats à l'état préstationnaire.

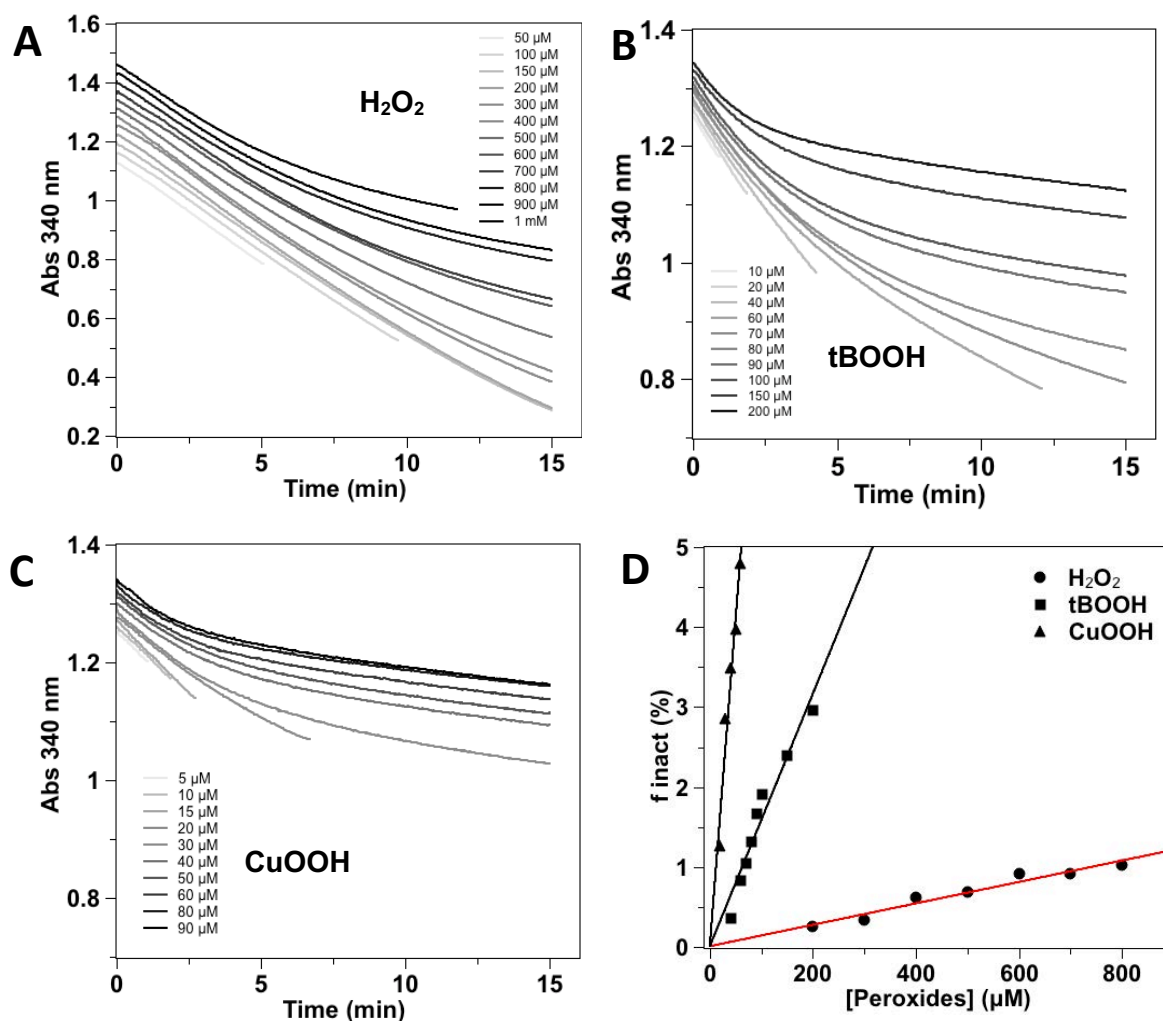


Fig. 62. A, B, C. Cinétiques à l'état stationnaire mettant en évidence le phénomène de suroxydation de Tsa1, par des concentrations croissantes de différents peroxydes : H_2O_2 , tBOOH ou CuOOH respectivement. D. Graphique représentant les valeurs de f_{inact} obtenues pour chaque concentration en peroxyde, avec H_2O_2 (cercles noirs et droite rouge) en comparaison avec tBOOH (carrés et droite noire) et CuOOH (triangles et droite noire). Le paramètre $C_{Hyp1\%}$ est obtenu à partir de la pente des droites.

B. Cinétiques à l'état préstationnaire

Lorsque Tsa1 réagit avec le tBOOH ou le CuOOH, les cinétiques à l'état préstationnaire suivies par fluorescence sont triphasiques à l'instar de celles obtenues avec H_2O_2 . La cinétique de la phase 1 a été analysée en reproduisant les expériences à faibles concentrations de Tsa1 et de peroxyde afin de déterminer précisément sa constante de vitesse de second ordre (Fig. 63).

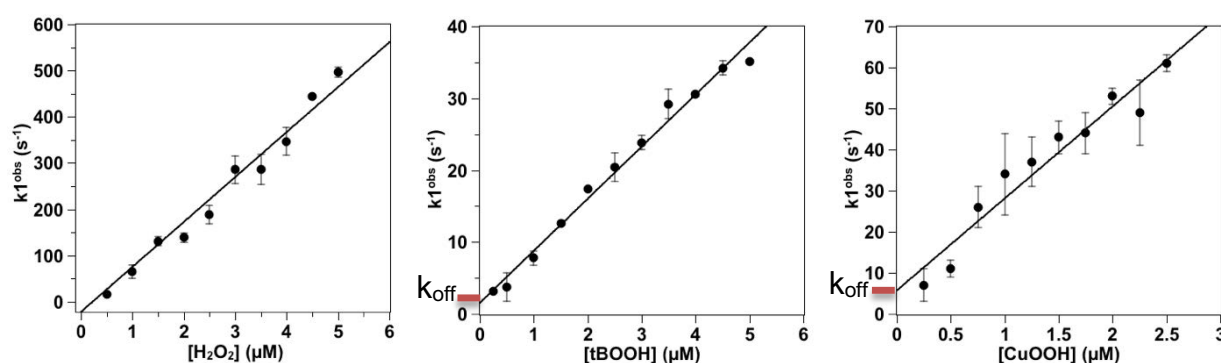


Fig. 63. Constantes de vitesse k_1^{obs} mesurées en fonction de la concentration en H_2O_2 , tBOOH ou CuOOH.

Comparées aux observations faites avec H_2O_2 , les résultats montrent que la constante de vitesse k_1 dépend linéairement de la concentration en peroxyde, mais avec une ordonnée à l'origine non nulle. Ceci suggère que la réaction de Tsa1 avec tBOOH et CuOOH est réversible, et que l'on observe ici au moins partiellement un événement de liaison non covalente du substrat au sein du site actif. La constante de vitesse de fixation déduite de la pente reste élevée avec $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour tBOOH et $2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour CuOOH. La constante de vitesse de dissociation serait $1,5 \text{ s}^{-1}$ pour tBOOH et 5 s^{-1} pour CuOOH. L'attaque de la C_P sur le peroxyde ne serait pas limitante cinétiquement.

Le comportement cinétique de la phase 2 a ensuite été analysée en présence de saccharose comme viscogène à une concentration de 10 μM en tBOOH. Seule la phase 2 est sensible à l'ajout de viscogène, indiquant que cette phase peut être attribuée à un changement conformationnel associé à la transition FF/LU, comme avec le substrat H_2O_2 (Fig. 64).

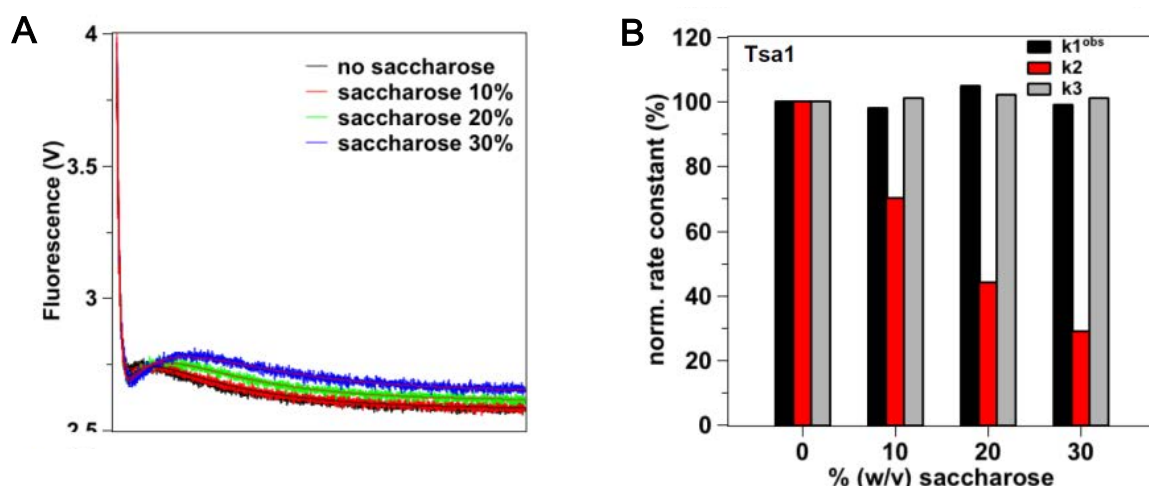


Fig. 64. A. Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 (5 μ M) avec tBOOH (10 μ M) en présence de saccharose : 0% noir, 10% rouge, 20% vert et 30% bleu. Les ajustements par une équation exponentielle triple sont indiqués en rouge. **B.** Histogrammes normalisés à partir des constantes de vitesse à 0% en viscosogène. Les trois phases sont représentées pour chaque pourcentage de saccharose.

En l'absence de saccharose et à faible concentration en substrat, la valeur de k_2 mesurée avec le tBOOH et la CuOOH est de 59 ± 6 et 57 ± 5 s^{-1} , respectivement, des valeurs très proches de celle mesurée avec H_2O_2 . La différence de sensibilité de Tsa1 à la suroxydation avec ces substrats n'est donc pas liée à un effet sur ce changement conformationnel.

C. Détermination de la constante de vitesse de suroxydation k_4

La forte sensibilité à la suroxydation de Tsa1 avec les peroxydes organiques pourrait être due à une réaction de suroxydation plus rapide. Nous avons donc déterminé la constante de vitesse k_4 avec ces substrats en utilisant le mutant Tsa1^{C171A}. En effet, les cinétiques à l'état préstationnaires montrent l'accumulation de forme suroxydée beaucoup plus rapidement pour ces substrats que pour H_2O_2 , et la valeur de k_4 déterminée passe de $2,1 \times 10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ pour H_2O_2 à $9,5 \times 10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ pour le tBOOH et 39×10^3 $M^{-1}.s^{-1}$ pour le CuOOH soit respectivement 4,5 et 19 fois plus élevées (Fig. 65). Par conséquent, la forte sensibilité à la suroxydation de Tsa1 par les peroxydes organiques est associée à une vitesse de suroxydation très élevée par rapport à H_2O_2 .

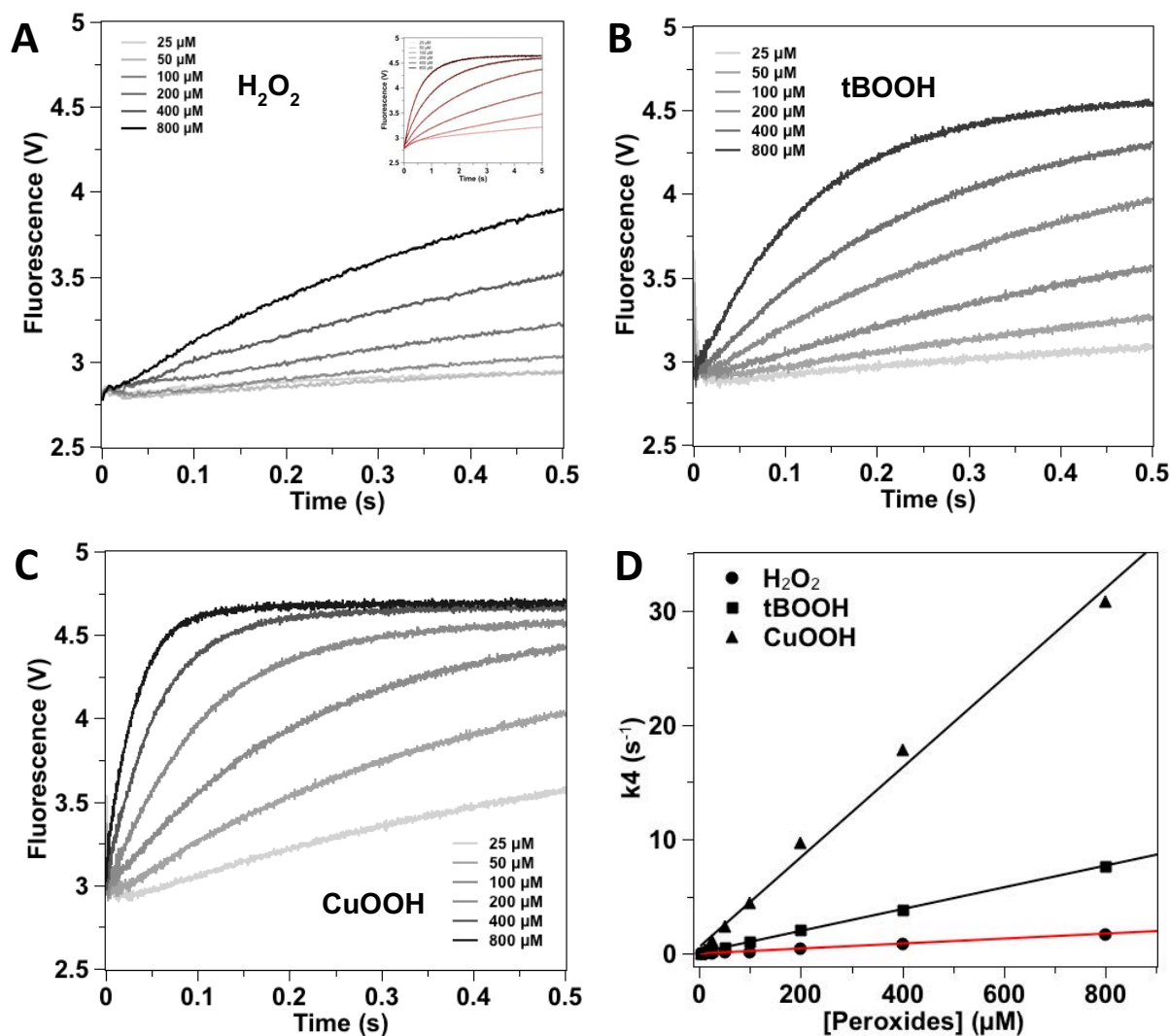


Fig. 65. **A.** Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Ts1^{C171A} avec des concentrations croissantes en H_2O_2 (gris clair vers noir) sur un temps de réaction de 0,5 s. En encart, la mesure est effectuée sur un temps de 5 s. Les ajustements bi-exponentiels sont indiqués en rouge. **B.** Identique à **A** le peroxyde utilisé est le tBOOH. **C.** Identique à **A** le peroxyde utilisé est le CuOOH. **D.** Constantes de vitesse k_4 mesurées en fonction de la concentration en peroxyde.

D. Cinétiques à fortes concentrations en substrat

Les résultats obtenus précédemment suggèrent une corrélation entre la sensibilité à la suroxydation de Ts1 et les cinétiques des étapes de changement conformationnel et de suroxydation. Par ailleurs, nos résultats montrent que les étapes de changement conformationnel et de formation du pont disulfure sont des étapes cinétiquement distinctes, contrairement à ce que suppose le modèle couramment admis. Ceci suggère qu'il existe une compétition directe entre les étapes de changement conformationnel et de suroxydation.

Dans les expériences précédentes de cinétiques rapides, nous avons utilisé des conditions permettant d'observer indépendamment les étapes du cycle catalytique, en travaillant à des concentrations où la suroxydation de Tsa1 n'est pas sensible en conditions de cycle catalytique unique. Puis nous avons utilisé le mutant Tsa1^{C171A}

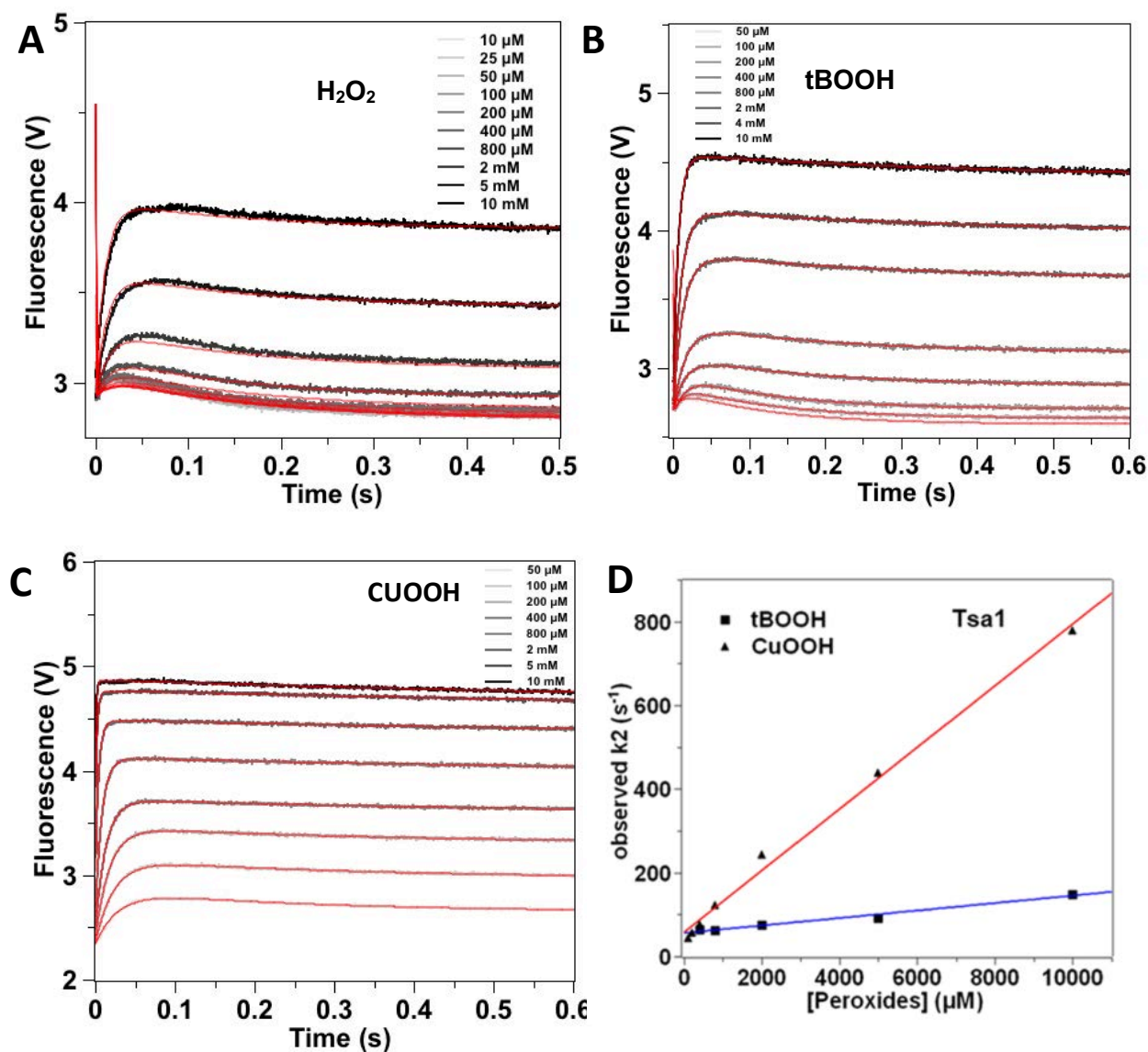


Fig. 66. **A.** Cinétiques à l'état préstationnaire de la réaction de Tsa1 avec des concentrations élevées en H_2O_2 (gris clair vers noir) sur un temps de réaction de 0,5-0,6 s. **B.** Identique à **A** le peroxyde utilisé est le tBOOH. **C.** Identique à **A** le peroxyde utilisé est le CuOOH. **D.** Constantes de vitesse k_2 mesurées en fonction de la concentration en tBOOH et CuOOH.

A. Ajustement global obtenu avec le logiciel KinTek Explorer. **B, C et D.** Les ajustements ont été effectués selon un modèle triple exponentiel à l'aide du logiciel Pro-Data,

pour isoler et observer la phase de suroxydation. Cependant, des concentrations plus élevées en H_2O_2 devraient permettre de surmonter la barrière cinétique de la compétition en accélérant la réaction de suroxydation. Il devrait donc être possible d'observer ce phénomène aussi en conditions pré stationnaires pour la Tsa1 sauvage.

La figure 66 montre les résultats de ces expériences conduites en augmentant les concentrations en peroxyde jusqu'à 10 mM. Dans ces conditions, l'amplitude de la phase 2 augmente, ce qui suggère que cette phase doit, au moins en partie, intégrer un événement générant une espèce plus fluorescente, vraisemblablement la forme $\text{Tsa1}_{\text{SO}_2}$. Nous proposons que l'amplitude de la phase 2 reflète la contribution des signaux associés au changement conformationnel et à la suroxydation. C'est ce qui est attendu si ces deux réactions sont effectivement en compétition directe.

Si cette hypothèse est juste alors la constante de vitesse observée pour la phase 2 devrait également combiner les constantes de vitesses des deux étapes, donc être dépendante de la suroxydation. C'est en effet le cas, pour les cinétiques obtenues avec tBOOH et CuOOH, la constante k_2 mesurée dépend linéairement de la concentration en peroxyde. L'ordonnée à l'origine (59 s^{-1} pour tBOOH et 57 s^{-1} pour CuOOH) correspond à la constante de vitesse du changement conformationnel (Fig.66D). La pente correspondrait à la constante de vitesse de la suroxydation, d'une valeur de 8.8×10^3 and $74 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivement, proches de celles obtenues par la méthode directe de $9,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le tBOOH et $39 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le CuOOH. Ces résultats confirment donc 1) qu'il existe bien une compétition directe entre l'étape de changement conformationnel associée à la transition FF/LU, l'étape de formation du pont disulfure n'étant pas impliquée et 2) que les valeurs de constante de suroxydation obtenues avec le mutant $\text{Tsa1}^{\text{C171A}}$ correspondent bien à celles obtenues avec la Tsa1 sauvage. Il est à noter que ces observations doivent être valables pour les cinétiques obtenues à forte concentration en H_2O_2 . Toutefois dans ce cas, la constante de suroxydation est beaucoup plus faible et n'affecte pas significativement la valeur de k_2 .

3. Analyse des cinétiques par ajustement global

Les analyses précédentes nous ont permis d'identifier une étape de changement conformationnel que l'on peut caractériser par une constante de vitesse de 64 s^{-1} , cinétiquement distincte de l'étape de formation du pont disulfure C_P - C_R . Néanmoins, cette étape conformationnelle devrait être nécessairement équilibrée, donc caractérisée par deux constantes de vitesse k_{LU} et k_{FF} . Afin de répondre à cette interrogation, nous avons analysé les cinétiques obtenues avec H_2O_2 par ajustement global, en considérant le modèle mécanistique complet détaillé dans le tableau 7 ci-dessous.

Étape cinétique	Constantes de vitesse
$Tsa1\text{-SH} + H_2O_2 \rightarrow Tsa1^{FF}\text{-SOH}$	k_{SOH}
$Tsa1^{FF}\text{-SOH} \rightleftharpoons Tsa1^{LU}\text{-SOH}$	k_{LU} (vers la droite); k_{FF} (vers la gauche)
$Tsa1^{LU}\text{-SOH} \rightarrow Tsa1_{SS}$	k_{SS}
$Tsa1^{FF}\text{-SOH} + H_2O_2 \rightarrow Tsa1_{SO_2}$	k_{SO_2}
$Fluo(V) = p \times [Tsa1\text{-SH}] + q \times [Tsa1^{FF}\text{-SOH}] + r \times [Tsa1^{LU}\text{-SOH}] + p \times 0,62 \times [Tsa1_{SS}] + p \times 1,24 \times [Tsa1_{SO_2}] + C$	

Tableau 7 : Équations utilisées pour modéliser la réaction avec le logiciel Kintek Explorer. Les facteurs d'intensité de fluorescence q ($Tsa1^{FF}\text{-SOH}$) et r ($Tsa1^{LU}\text{-SOH}$) ont été fixés à 63 % et 66 % de p ($Tsa1\text{-SH}$), ceux de $Tsa1_{SS}$ et $Tsa1_{SO_2}$ ont été fixés à 62 % et 124 % de p ($Tsa1\text{-SH}$). Le paramètre C correspond à la valeur de base fluorescence.

Les données expérimentales ont été ajustées à l'aide du logiciel Kintek Explorer qui est un outil d'analyse de cinétiques enzymatiques par ajustement global (Johnson et al., 2009). Ce logiciel ajuste un ensemble de données cinétiques obtenues pour plusieurs concentrations en substrat de façon globale à un mécanisme modèle, décrit par un ensemble d'équations chimiques, caractérisées chacune par une constante de vitesse (tableau 7). L'objectif est de vérifier si le mécanisme modèle décrit fidèlement les données expérimentales, et de déterminer la valeur des constantes cinétiques intrinsèques de chaque étape. Le mécanisme modèle postulé est traduit sous forme d'équations différentielles et d'équations de conservation de masse, qui sont intégrées numériquement de façon simultanée pour décrire les cinétiques. Les données expérimentales sont ensuite ajustées au modèle postulé par régression non linéaire

selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt, correspondant à une recherche itérative des paramètres inconnus (comme les constantes de vitesse) permettant l'obtention d'un χ^2 minimal.

Dans notre cas, les cinétiques de fluorescence obtenues à différentes concentrations en H_2O_2 ont été globalement ajustées à l'équation suivante :

$$\text{Fluo}(V) = p[\text{Tsa1-SH}] + q[\text{Tsa1}^{\text{FF}}\text{-SOH}] + r[\text{Tsa1}^{\text{LU}}\text{-SOH}] + 0,62 p [\text{Tsa1}_{\text{ss}}] + 1,24 p [\text{Tsa1}_{\text{SO}_2}] + C$$

avec p , facteur d'intensité de fluorescence de Tsa1SH et les facteurs d'intensité de Tsa1_{ss} et Tsa1_{SO2} fixés à 62 % et 124 % de p (Tsa1SH), sur la base des spectres de fluorescence (Fig. 38) ; q et r facteurs d'intensité de Tsa1^{FF}-SOH et Tsa1^{LU}-SOH, respectivement. Le paramètre C correspond à la valeur du signal de fluorescence. Le paramètre k_{SOH} a été fixé à la valeur k_1 déterminée dans l'expérience présentée § II.2, soit $9,7.10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Les paramètres ajustés sont les autres constantes de vitesse, ainsi que les paramètres q et r . Dans un premier temps, la valeur de k_{FF} a été fixée à 0. Comme le montre la figure 66A, cette procédure a permis d'ajuster les cinétiques expérimentales de façon satisfaisante et d'obtenir des constantes de vitesse intrinsèques k_{LU} , k_{SS} et k_{SO_2} proches des valeurs observées de k_2 , k_3 et k_4 obtenues par ajustement direct (Tableau 8). Les facteurs d'intensité q (Tsa1^{FF}-SOH) et r (Tsa1^{LU}-SOH) ont été ajustés à 63 % et 66 % de p (Tsa1-SH). Cependant, vu le nombre élevé de paramètres ajustés, certains paramètres se sont révélés dépendants : c'est le cas de k_{LU} et k_{SS} . Cependant, la concordance entre k_{LU} et la valeur déduite de la cinétique obtenue par CD (65 vs 54 s^{-1}) est un argument validant la valeur obtenue par ajustement global. De plus, ces résultats confirment que la constante de vitesse de suroxydation k_4 obtenue en utilisant les mutants C171A peut être utilisée comme estimation de k_{SO_2} . L'ajout d'une étape supplémentaire au cours de laquelle Tsa1^{LU}-SOH réagit avec H_2O_2 n'améliore pas l'ajustement, en accord avec le modèle mécanistique.

Tsa1	Analyse triple exponentielle	Tsa1	Ajustement global
k1 (M⁻¹.s⁻¹)	(9,7 ± 0,4) 10 ⁷	k_{SOH} (M⁻¹.s⁻¹)	(1,0 ± 0,01) 10 ⁸
k2 (s⁻¹)	64 ± 5	k_{LU} (s⁻¹)	65 ± 1
k3 (s⁻¹)	4,6 ± 0,3	k_{SS} (s⁻¹)	5,8 ± 0,1
k4 (M⁻¹.s⁻¹)	(2,1 ± 0,2) 10 ³	k_{SO2} (M⁻¹.s⁻¹)	(2,9 ± 0,1) 10 ³

Tableau 8. Comparaison des constantes de vitesse des étapes réactionnelles entre Tsa1 et H₂O₂, obtenues par ajustement selon un modèle triple exponentiel ou par global fitting.

Dans un second temps, l'ajustement a été répété en intégrant le paramètre k_{FF} . Le fait de rendre la réaction $Tsa1^{FF}\text{-SOH} \rightleftharpoons Tsa1^{LU}\text{-SOH}$ réversible a conduit à l'ajustement de la constante de vitesse k_{FF} à une valeur très faible avec une très forte erreur, et n'a pas non plus permis d'améliorer l'ajustement. Ces données suggèrent donc que l'hypothèse d'un équilibre rapide $Tsa1^{FF}\text{-SOH} \rightleftharpoons Tsa1^{LU}\text{-SOH}$ ne s'applique pas car elles impliquent que, bien qu'intrinsèquement réversible, la transition $Tsa1^{FF}\text{-SOH} \rightarrow Tsa1^{LU}\text{-SOH}$ se comporte comme un processus quasi irréversible dans le cycle catalytique.

V. Couplage du mécanisme catalytique et de la sensibilité à la suroxydation

Nous avons cherché à déterminer si, sur la base des différentes constantes cinétiques du mécanisme, il était possible de prédire la sensibilité des Prx à la suroxydation, mesurée à l'état stationnaire. La méthode développée par Nelson permet de déterminer $C_{Hyp1\%}$ en considérant que le changement conformationnel FF-LU est un équilibre rapide au sein du cycle catalytique, mais nos résultats suggèrent que cette hypothèse ne se vérifie pas. Dans ce cas, la fraction d'enzyme suroxydée par cycle catalytique ou f_{inact} , peut se définir ainsi :

$$f_{inact} = \frac{k_{SO_2}[ROOH][Prx^{FF} - SOH]}{k_{SO_2}[ROOH][Prx^{FF} - SOH] + k_{LU}[Prx^{FF} - SOH] - k_{FF}[Prx^{LU} - SOH]}$$

où ROOH est la concentration en peroxyde, $Prx^{FF}-SOH$ l'intermédiaire acide sulfénique en conformation FF et $Prx^{LU}-SOH$ l'intermédiaire acide sulfénique en conformation LU. Si on considère que la transition $Prx^{FF}-SOH \rightarrow Prx^{LU}-SOH$ est quasiment irréversible, $k_{FF} \sim 0$, le terme $k_{FF}[Prx^{LU}-SOH]$ disparaît et l'équation se simplifie :

$$f_{inact} = \frac{k_{SO_2}[ROOH]}{k_{SO_2}[ROOH] + k_{LU}}$$

Et, si moins de 5 % de l'enzyme est inactivée au cours de l'expérience, impliquant que le premier terme du dénominateur devient quasi négligeable comparé à k_{LU} , on obtient alors par simplification

$$f_{inact} = \frac{k_{SO_2}}{k_{LU}} [ROOH]$$

ainsi

$$C_{Hyp1\%} = 0,01 \frac{k_{LU}}{k_{SO_2}}$$

Comme dans la méthode développée par Nelson, f_{inact} est linéairement dépendant de la concentration en peroxyde mais avec une pente équivalente à $k_{\text{SO}_2}/k_{\text{LU}}$. Il devrait donc être possible de prédire la valeur de la sensibilité à la suroxydation à partir des constantes de vitesses déterminées à l'état préstationnaire.

Les constantes de vitesse k_{SO_2} et k_{LU} mesurée pour Tsa1 et les valeurs $C_{\text{Hyp1\%}}$ mesurée ou calculée par la relation $C_{\text{Hyp1\%}} = 0,01 k_{\text{LU}}/k_{\text{SO}_2}$ sont présentées dans le Tableau 9. Dans le cas de Tsa1, la similarité des deux valeurs, que ce soit pour les mutants ou pour différents substrats valide nos hypothèses mécanistiques et confirment les résultats obtenus précédemment.

Prx	Tsa1 ^{A177S A178D}	Tsa1	Tsa1 ^{W161F}	Tsa1	Tsa1
Peroxyde	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	tBOOH	CuOOH
k_{LU} (s ⁻¹)	216 ± 42	64 ± 5	37 ± 1	59 ± 6	57 ± 5
k_{SO_2} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	10 ³ ± 400	2.1 10 ³ ± 200	2.9 10 ³ ± 70	9.5 10 ³ ± 200	39 10 ³ ± 500
$C_{\text{hyp1\%}}$ calculé (μM)	2160 ± 1280	305 ± 53	128 ± 7	62 ± 8	16 ± 1
$C_{\text{hyp1\%}}$ expérimental (μM)	2620 ± 220	730 ± 100	440 ± 93	63 ± 15	11 ± 2

Prx	hPrx1	hPrx1	hPrx2	hPrx3	AhpC
Peroxyde	H ₂ O ₂	ONOOH	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
k_{LU} (s ⁻¹)	10.8 ± 2	10.8 ± 2	0.2-0.6 (Dalla Rizza et al., 2019; Portillo-Ledesma et al., 2018; Randall et al., 2019)	20 (Peskin et al., 2013)	>205 calculé
k_{SO_2} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	1,77 10 ³ (Dalla Rizza et al., 2019)	2.8 10 ⁵ (Dalla Rizza et al., 2019)	(1.73-1,97) 10 ³ (Dalla Rizza et al., 2019; Randall et al., 2019)	2.10 ³ estimé	410 (Dalla Rizza et al., 2019)
$C_{\text{hyp1\%}}$ calculé (μM)	61 ± 13	0.4	1 to 3	100	
$C_{\text{hyp1\%}}$ expérimental (μM)	80 ± 5 /50 (Bolduc et al., 2018b)		5 (Bolduc et al., 2018b)	127 (Haynes et al., 2013b)	> 5000 (Bolduc et al., 2018b)

Tableau 9 : Sensibilité à la suroxydation calculée ou expérimentale pour Tsa1 (partie 1), les Prxs humaines et AhpC (partie 2). Les valeurs de k_{SO_2} ont été déterminées en utilisant le mutant C171A de Tsa1 pour les formes sauvages et mutées.

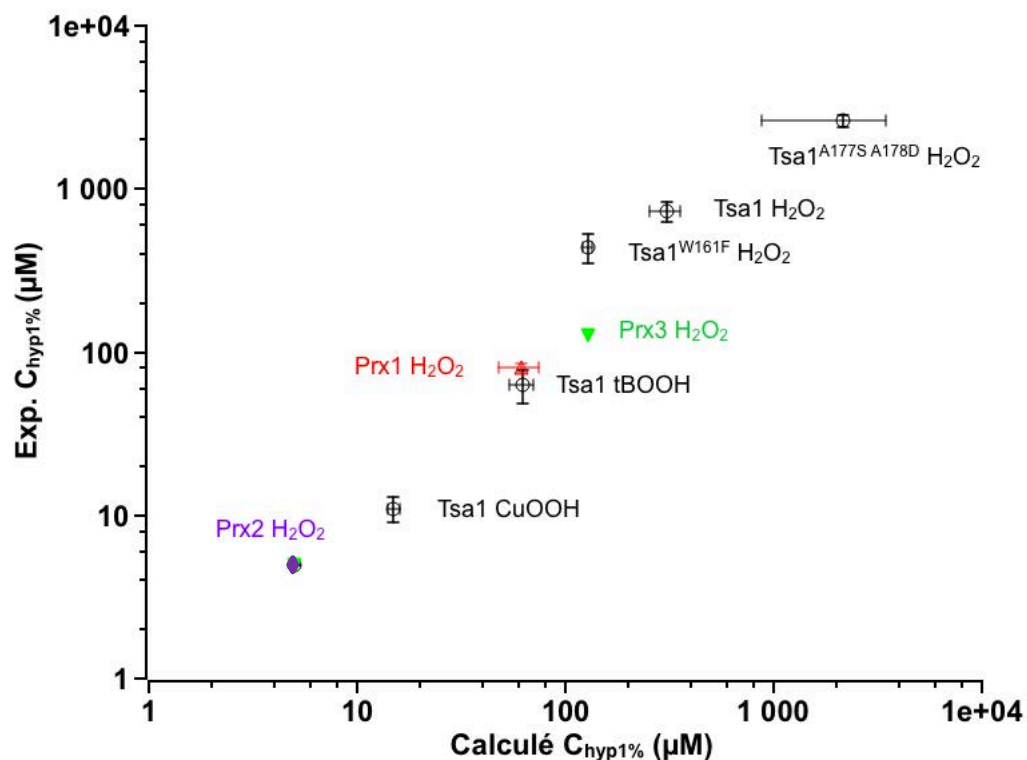


Fig. 67. Comparaison des valeurs de sensibilité à la suroxydation $C_{Hyp1\%}$ calculées ou expérimentales pour Tsa1 formes wt et mutantes ainsi que pour hPrx1 (rouge), hPrx2 (violet) & hPrx3 (vert). La représentation log-log est adaptée à la mise en évidence de l'échelle de sensibilité.

Il est possible d'étendre ce raisonnement à d'autres Prx sensibles à la suroxydation sur la base de données de la littérature. Dans le cas des Prx humaines Prx2 et Prx3, la formation du pont disulfure ne peut être résolue de la transition FF / LU lors des expériences de cinétiques rapides. Sachant que cette transition est probablement cinétiquement limitante, comme nous l'avons montré dans le cas de hPrx1, nous avons utilisé les constantes de vitesse attribuées à l'étape de formation du pont disulfure déjà obtenues par d'autres équipes comme une valeur de la constante de vitesse k_{LU} . En utilisant les valeurs publiées de k_{SO_2} pour les Prxs, l'index de sensibilité à la suroxydation $C_{Hyp1\%}$ prédit pour hPrx1, hPrx2 et hPrx3 avec H_2O_2 et le peroxydinitrite se révèle comparable avec les valeurs expérimentales. Concernant AhpC, en utilisant les valeurs de $C_{Hyp1\%} > 5$ mM et $k_{SO_2} = 410$ M⁻¹.s⁻¹ publiées, nous obtenons une estimation de la constante de vitesse k_{LU} de 205 s⁻¹, valeur similaire à celle du mutant Tsa1^{AA} (Fig. 67).

En conclusion, ces comparaisons confirment que le degré de sensibilité à la suroxydation est bien déterminé par la cinétique de changement conformationnel et non celle de formation du pont disulfure, en compétition directe avec l'étape de sulfinylation.

VI. Etude *in vivo* chez la levure de la sensibilité relative à la suroxydation des Prxs

L'étude présentée ci-dessus a permis d'apporter des réponses quant au mécanisme de suroxydation des Prx de type Prx1. Qu'en est-il des différences de sensibilité *in vivo* ? Comment une différence de sensibilité à la suroxydation mesurée *in vitro* se traduit-elle *in vivo* ?

Pour tester la sulfinylation des Prxs *in vivo*, une méthode d'alkylation différentielle des Prx réduites ou suroxydées a été utilisée. L'agent alkylant est le methyl-PEG(24)-maléimide ou mPEG qui ajoute 1239,4 Da par résidu Cys modifié et permet donc de distinguer les formes redox par leur mobilité différentielle sur gel SDS-PAGE. Pour valider cette procédure, la version tagguée Myc en position N-terminale de Tsa1 (Myc-Tsa1) a été utilisée pour faciliter l'identification de Tsa1 par immunoblot à partir d'extraits cellulaires de cultures (Fig. 68a). En parallèle, les gels sont révélés avec un anticorps anti Tsa1 moins spécifique.

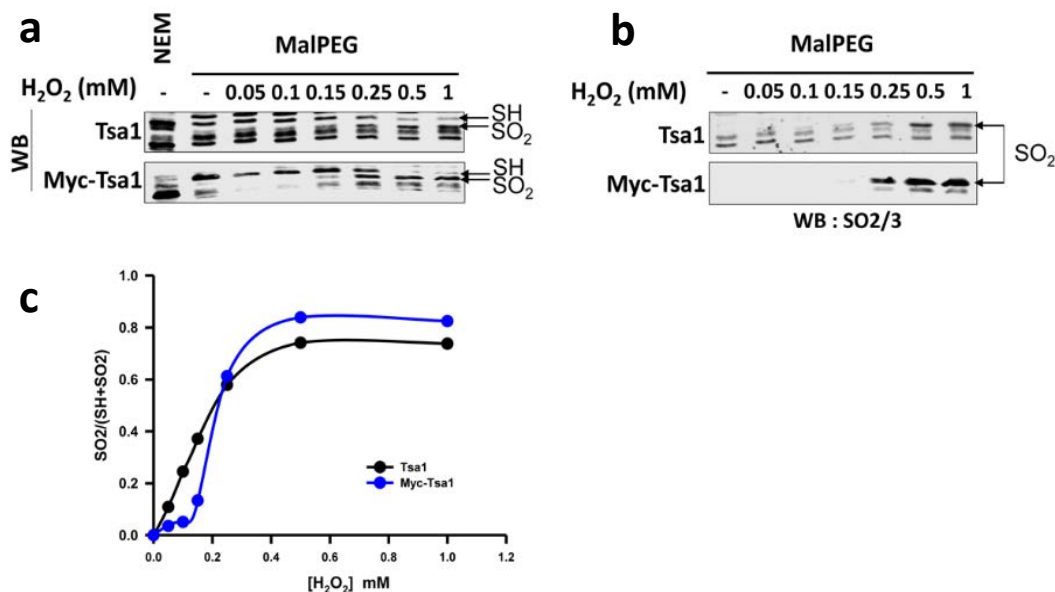


Fig. 68. **a.** Validation de la procédure de dérivation différentielle de la cystéine par le mPEG permettant de suivre la suroxydation de Prx en utilisant Tsa1 (Myc-Tsa1), et comparaison de la réactivité de Myc-Tsa1 et Tsa1 vis-à-vis de H₂O₂. **a,b,** les thiols ont été dérivés par NEM ou mPEG, comme indiqué, après réduction avec du DTT, comme décrit dans les méthodes, en utilisant des lysats cellulaires de la souche Δ tsa1 exprimant Tsa1 ou Myc-Tsa1 humain et exposés à H₂O₂ à la concentration indiquée. **a,** Western blot des formes réduites (-SH) (2x mPEG) et suroxydées (-SO₂H) (1 x mPEG) de Tsa1 et Myc-Tsa1 (indiquées par des flèches noires), révélées par un anticorps anti-Prx (Tsa1) ou anti-Myc (Myc-Tsa1). La quantification du degré d'oxydation (SO₂H/ SH + SO₂H) est indiquée sous le western blot (**c**). **b,** Western blot des formes SO₂H de Tsa1 et Myc-Tsa1, en utilisant un anticorps anti-SO₂/3 de Prx et les lysats cellulaires utilisés en **a**.

Sur cellules non traitées, Tsa1 réduite, lorsqu'elle est alkylée avec le N-éthyl-maléimide (NEM), migre à une taille attendue d'environ 21-22 kDa. Cette piste sert de témoin de migration de la Tsa1 non alkylée par le mPEG (le NEM n'ajoute que 125 Da à la masse de la protéine). Par contre si elle est alkylée avec le mPEG, sa taille augmente en lien avec les modifications des cystéines C_P et C_R (+ 1,2 kDa ou + 2,4 kDa si une ou deux Cys sont modifiées, soit forme SO₂ ou SH). Après traitement des cellules 5 min avec H₂O₂, nous observons une disparition progressive de la bande correspondant à la forme réduite de Tsa1SH en fonction de la concentration en H₂O₂, et l'apparition d'une bande de migration intermédiaire, qui correspond à la forme sulfinylée de l'enzyme sur la C_P et modifiée par le mPEG sur la C_R. L'attribution de cette bande est confirmée Fig. 68b par la même expérience révélée par un anticorps anti PrxSO₂/SO₃. Le taux de sulfinylation de Tsa1 peut ainsi être déterminé en faisant le ratio de l'intensité des bandes (SO₂/SH + SO₂) sur les blots révélés par les anticorps anti myc ou anti Tsa1 (Fig. 68c). De manière intéressante, Tsa1 et Myc-Tsa1 ont un comportement similaire vis-à-vis de la suroxydation *in vivo*, avec 50 % de forme sulfinylée à 200 µM en H₂O₂. Cependant, aux concentrations en H₂O₂ inférieures à 100 µM la sensibilité à la suroxydation de Myc-Tsa1 semble différente de Tsa1. C'est la raison pour laquelle les expériences suivantes ont été réalisées en mesurant le taux de sulfinylation de la Tsa1 exprimée *in vivo* sans étiquette révélée avec un anticorps anti-Tsa1, qui bien que produisant des signaux non spécifiques, permet la quantification du degré de suroxydation de l'enzyme.

Les tests ont été réalisés après exposition des cellules à des concentrations croissantes d'H₂O₂, tBOOH et CuOOH pendant 5 minutes. Nous observons qu'*in vivo*, Tsa1 ne se suroxyde pas de manière équivalente en présence des différents peroxydes. En effet, la suroxydation apparaît à des niveaux de concentrations plus faibles en CuOOH et tBOOH comparé à H₂O₂, avec un taux de sulfinylation de 50 % obtenu avec 75, 125 et 200 µM de peroxyde respectivement (Fig. 69a). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro* dans notre étude. Nous constatons en outre que le taux de suroxydation atteint plus rapidement un plateau avec les peroxydes organiques et le taux de suroxydation maximal est plus élevé qu'avec H₂O₂.

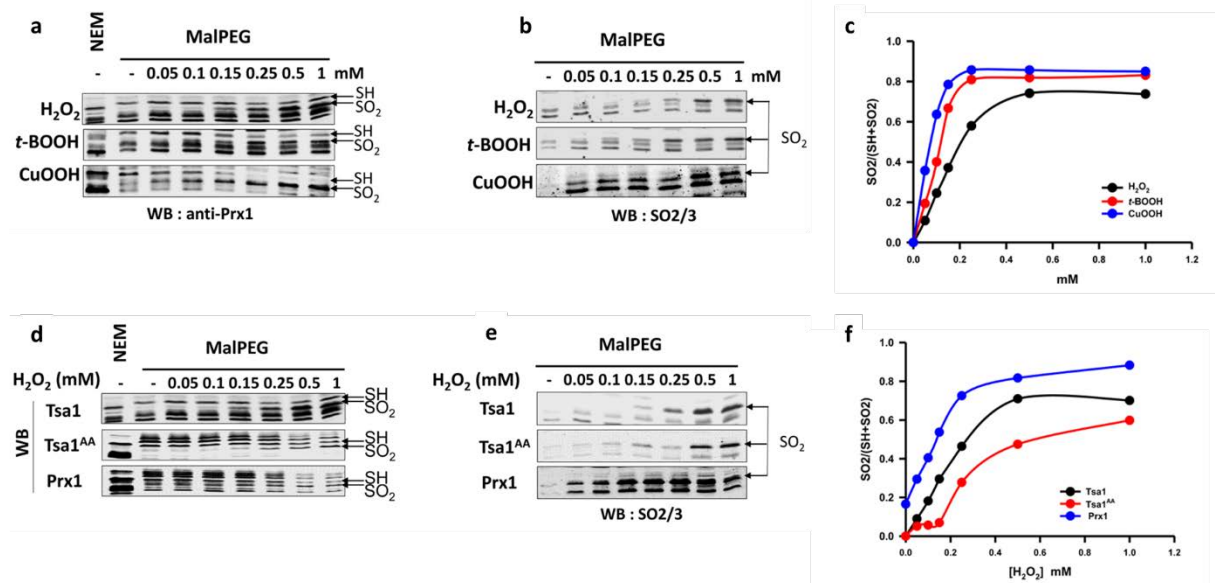


Fig. 69. a-c Suroxydation de Tsa1 dans les cellules exposées à H₂O₂, tBOOH, CuOOH, pendant 5 min aux concentrations indiquées. Les thiols ont été dérivés par le NEM ou le mPEG, comme indiqué, après réduction par le DTT. **d-f**, Comparaison de la réactivité de hPrx1, Tsa1 et Tsa1^{AA} avec H₂O₂ *in vivo*. Les thiols ont été dérivés par le NEM ou le mPEG, comme indiqué, après réduction par le DTT, en utilisant des lysats cellulaires de la souche Δ t_{sa}1 exprimant la hPrx1, Tsa1 ou Tsa1^{AA} et exposés à H₂O₂ à la concentration indiquée. **a, d**, Western blot des formes réduites (-SH) (2 x mPEG) et suroxydées (-SO₂H) (1 x mPEG) de Tsa1 (indiquées par des flèches noires), révélées par un anticorps anti-Prx1. **b, e**, Western blot de la forme Prx SO₂H en utilisant un anticorps Prx anti-SO₂/3 et les lysats cellulaires utilisés en a et c, respectivement. **c, f**, Quantification du degré d'oxydation (SO₂H/ SH + SO₂H) en fonction de la concentration en peroxyde.

Nous avons ensuite comparé la sensibilité à la suroxydation *in vivo* de hPrx1, Tsa1 et Tsa1^{AA}. Nous observons que de plus fortes concentrations d'H₂O₂ sont nécessaires pour suroxyder 50 % du mutant Tsa1^{AA} (500 mM) et à l'inverse, hPrx1 est beaucoup plus sensible puisque 100 μ M d'H₂O₂ sont suffisants pour atteindre cette valeur (Fig 69d,e). Nous remarquons une suroxydation basale de hPrx1 probablement due à la présence d'H₂O₂ endogène. Ces résultats sont en accord avec les données cinétiques obtenues dans notre étude qui montrent qu'*in vitro*, hPrx1 est plus sensible à la suroxydation que Tsa1, elle-même plus sensible de Tsa1^{AA}. Les résultats obtenus à partir des expériences de Western Blot avec un anticorps spécifique des formes suroxydées des Prx (SO₂/SO₃), bien que moins quantitatifs, fournissent des résultats similaires à la méthode utilisant la dérivation au malPEG.

L'ensemble de ces résultats confirme que les paramètres obtenus *in vitro* sont pertinents et valides *in vivo* dans le contexte cellulaire de la levure.

DISCUSSION-CONCLUSION

La sulfinylation des Cys est une modification des protéines potentiellement porteuse de fonctions de régulation. Mon projet de thèse a été consacré à l'étude des mécanismes de sulfinylation d'une famille de peroxydases à thiol, les Prx. Les modifications oxydatives des thiols dans les protéines sont des processus généralement contrôlés par la cinétique chimique. Le mécanisme de sulfinylation des Prx met ainsi en jeu une compétition cinétique entre la réaction de suroxydation d'un intermédiaire acide sulfénique et une autre voie réactionnelle qui inclut une transition conformationnelle et conduit à la réduction de cet intermédiaire sous forme disulfure. Comprendre ce mécanisme implique d'obtenir des informations de nature cinétique sur ces processus. En outre, ces données obtenues *in vitro* constituent une base pour comprendre et modéliser quantitativement les voies de signalisation redox *in vivo*.

La pertinence de ce principe a été souligné par d'autres auteurs, comme Elisabeth Veal: "Il serait opportun à l'avenir de mesurer les modifications intracellulaires des concentrations d'H₂O₂ ou de NADPH *in vivo* couplé à des modèles mathématiques incorporant des analyses cinétiques *in vitro*, au mécanisme de suroxydation des Prx et aux interactions avec leur partenaires (Trx, Srx...) car ces études, ensemble, constitueront des outils permettant de mieux comprendre comment les cellules répondent à différents niveaux de stress (ROS), et comprendre les rôles clés que jouent les Prx dans ces réponses." (Veal et al., 2017). Notre étude a permis d'apporter des éléments nouveaux à ces modèles et contribuera ainsi à une meilleure compréhension des voies de signalisation redox qui dépendent des Prx.

Nous avons montré que la Prx1 majeure de la levure, Tsa1, est 10 fois plus robuste vis-à-vis du phénomène de suroxydation que ses homologues mammifères. Ce résultat semble surprenant mais peut s'expliquer par le mode de vie unicellulaire de *S. cerevisiae*. L'exposition directe de la levure à son environnement, donc aux stress, implique que ses Prx ne soient pas exagérément sensibles à la suroxydation et donc à leur inactivation en tant que peroxydases. *A contrario*, l'environnement pluricellulaire dans un tissu chez les mammifères est cohérent avec le fait que les Prx soient sensibles à de faibles concentrations de peroxydes pour pouvoir déployer leurs nouvelles fonctions de transfert du signal redox et de protection par effet chaperon. Les résultats que nous avons obtenus *in vivo* reflètent la différence de sensibilité entre Tsa1 et hPrx1, et sont en accord

avec un plus faible niveau de peroxydes intracellulaire dans les cellules de mammifères en comparaison avec la levure (Domènech et al., 2018; Huang and Sikes, 2014).

Il est cependant important de considérer d'autres facteurs susceptibles de moduler la sensibilité à la suroxydation *in vivo*. En effet, en conditions physiologiques le couple $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ réagit avec H_2O_2 pour générer du peroxymonocarbonate, un peroxyde puissant capable d'amplifier les effets de H_2O_2 dans la cellule, en particulier *via* la suroxydation des Prx (Truzzi et al., 2019).

Le modèle enzymatique de la suroxydation des Prx1 revisité

Dans le modèle proposé en 2003, tous les événements chimiques et conformationnels du cycle peroxydase/sulfinylation avaient été présentés (Fig. 36 page 63). En considérant l'étape de changement conformationnel comme un équilibre rapide, ce modèle prédisait trois paramètres comme déterminants de la sensibilité à la suroxydation : k_{SO_2} , K_{LU} (constante d'équilibre) et k_{SS} . En utilisant une méthode d'étude en cinétique rapide de Tsa1 *S. cerevisiae*, basée sur la fluorescence des Trp, nous avons identifié que l'évènement conformationnel lié à la transition FF vers LU est indépendant cinétiquement de l'étape de formation du pont disulfure. Une constante cinétique pouvait donc être associée à cette transition conformationnelle, ce qui suggère que cette étape n'est en fait pas un équilibre rapide. Cette observation nous a permis d'établir que la sensibilité à la suroxydation est uniquement liée à la constante cinétique de sulfinylation et à la constante de vitesse de transition FF vers LU. Ceci indique que les étapes de suroxydation et de changement conformationnel sont deux voies en compétition directe (Fig. 70). La « pause cinétique » qui permet la suroxydation a donc lieu au moment du changement conformationnel et non de l'étape de formation du pont disulfure C_P - C_R . Ce mécanisme est également valable dans le cas des Prx de mammifères comme hPrx1. Dans ce cas, la cinétique du changement conformationnel étant plus lente, cette étape devient cinétiquement limitante et ne peut être distinguée de l'étape de résolution.

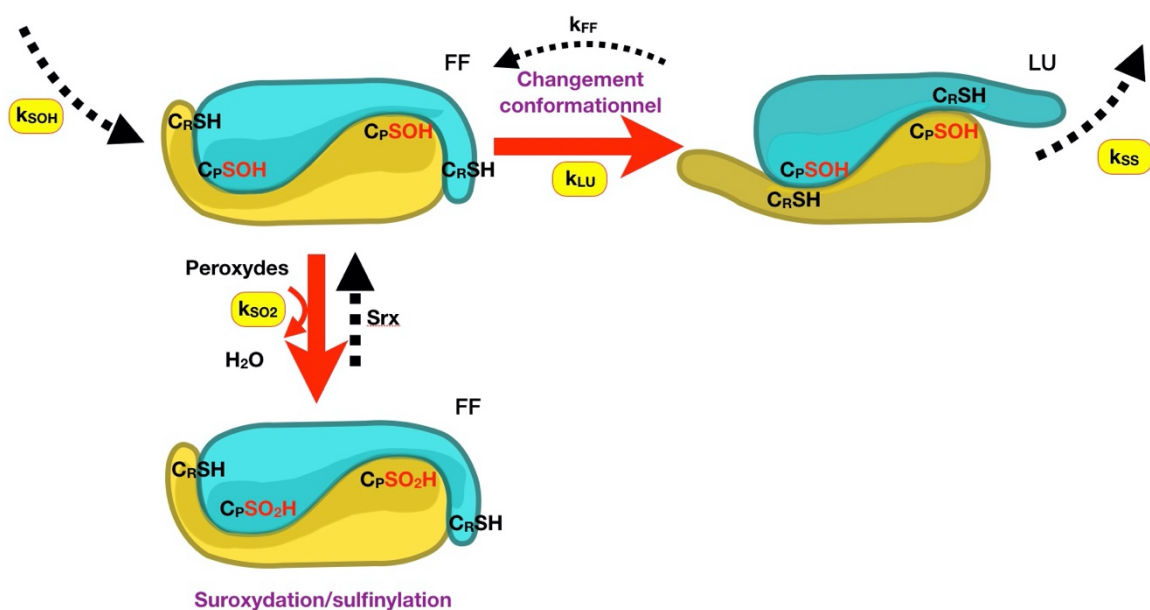


Fig. 70. Schéma du modèle *revisité* représentant en partie le cycle peroxydasique, la voie de suroxydation, les constantes de vitesse, les différents états redox et conformationnels des Prx de type Prx1. La *compétition* entre les étapes de suroxydation et de changement conformationnel est matérialisée par les flèches rouges. L'unité catalytique est le dimère en structure tête-bêche représenté en jaune et turquoise. Les sites actifs sont identifiés par les Cys C_P et C_R. La C_R est située dans la région C-terminale dont la conformation change entre les états FF et LU. La réduction de la Prx suroxydée par Srx est indiquée. FF = fully folded, LU = locally unfolded. Les constantes de vitesse de réduction des peroxydes k_{SOH}, de sulfinylation k_{SO2}, de formation du pont disulfure k_{SS}, ainsi que les constantes de vitesse associées à la transition conformationnelle k_{FF} et k_{LU} sont indiquées.

Plusieurs arguments sont en faveur de ce modèle revisité : **(i)** il permet de prédire la valeur de sensibilité des Prx (C_{Hyp1%}) à l'état stationnaire à partir des valeurs de k_{LU} et k_{SO2}, en accord avec valeurs de C_{Hyp1%} obtenues expérimentalement ; **(ii)** les cinétiques de la réaction de Tsa1 avec H₂O₂ (cycle catalytique unique) peuvent être globalement ajustées de façon satisfaisante par ce modèle, donnant **(iii)** des valeurs de constantes de vitesses k_{SO2}, k_{LU} et k_{SS} proches de celles mesurées par ajustement direct des cinétiques obtenues pour la Tsa1 sauvage et mutées. En particulier la constante de vitesse de suroxydation k_{SO2} obtenue est du même ordre de grandeur (10³ M⁻¹.s⁻¹) que celle mesurée directement grâce au mutant Tsa1^{C171A}. Il est intrigant de constater que nous n'avons pas détecté d'étape de changement conformationnel pour le mutant Tsa1^{C171A}. Une phase cinétique avec une constante de vitesse comprise entre 2 et 3 s⁻¹ a été observée, qui s'est avérée insensible à l'ajout d'agent viscogène et ne correspond donc pas au changement conformationnel. Il est possible que la mutation C171A, située dans la région C-

terminale, affecte la cinétique de la transition FF/LU, qui ne serait alors plus observable (Perkins et al., 2013).

Une observation importante découlant de l'analyse globale est que la transition Tsa1^{FF}-SOH/Tsa1^{LU}-SOH ne serait pas un équilibre rapide. En effet cette étape se comporte comme un événement quasi irréversible, ce qui implique que la formation du sulfénate SOH pourrait induire le changement conformationnel, et que la constante d'équilibre $K_{LU} = k_{LU}/k_{FF}$ serait largement supérieure à 1 pour l'intermédiaire Tsa1-SOH. Cette hypothèse est à l'inverse de ce qui était proposé jusqu'alors, considérant que l'équilibre était plutôt en faveur de la conformation FF, sur la base d'études sur la forme *réduite* de Prx. Ce résultat inattendu est toutefois en adéquation avec une étude à haute résolution d'une série de structures de PrxQ, obtenues lors de l'oxydation de la Cys C_P de l'enzyme sous forme SOH (Perkins et al., 2016). Ces résultats suggèrent que la formation de la fonction sulfénate dans la conformation FF génère une structure de haute énergie, déstabilisant le site actif et favorisant le changement FF/LU au niveau de l'hélice $\alpha 2$ dans le site actif. Cette hypothèse est également conforme à une structure de la PrxIV humaine (une Prx de type Prx1) obtenue sous forme acide sulfénique dans la conformation LU (Cao et al., 2011).

L'étude de mutants de la région C-terminale de Tsa1 apporte d'autres éléments quant à l'architecture du site actif des Prx. La réactivité exceptionnelle des Prx avec les peroxydes est due à la configuration du site actif dans la conformation FF qui permet d'activer la liaison peroxyde pour l'attaque par la Cys C_P. La stabilité de cette organisation dans le cas des Prx1 a été souvent associée à la présence de l'hélice α C-terminale comme « renfort » (Fig. 20). Cependant, nous avons caractérisé deux mutants, Tsa1^{AA} et Tsa1^{YF} dont le spectre CD à l'état réduit reflète un équilibre FF/LU déplacé en faveur de la conformation LU. Or la réaction de ces deux mutants avec H₂O₂ (paramètre k_{SOH}) s'est révélée relativement peu affectée par rapport à Tsa1 sauvage. Par conséquent, soit ces mutants existent en équilibre rapide FF/LU à l'état réduit, ce qui permet un déplacement non limitant LU→FF ; soit ils existent dans une conformation intermédiaire qui maintient l'organisation FF du site actif, compétente pour l'attaque sur le peroxyde, mais dont la région C-terminale serait déstabilisée, générant un spectre CD avec une signature de type LU. C'est ce qui a été observé dans certaines structures de conformation mixte de la Prx1 bactérienne AhpC (Perkins et al., 2013). Le dépliement de la région C-terminale ne serait donc pas suffisant pour induire celui du site actif. A

l'inverse, c'est la formation de l'acide sulfénique dans la conformation FF qui entraînerait le dépliement local du site actif, induisant à son tour le dépliement de l'extrémité C-terminale vers la forme LU complète.

L'étape de sulfinylation est-elle activée ?

La constante de vitesse de suroxydation k_{SO_2} est très élevée chez les Prx en comparaison avec d'autres protéines redox comme les protéines Tyrosine phosphatases (Tanner et al., 2011), ce qui suggère que la conformation du site actif de l'intermédiaire Prx-SOH sous forme FF facilite la suroxydation en acide sulfinique. Dans le cas de H_2O_2 , la valeur de k_{SO_2} est très similaire pour différentes enzymes de la famille Prx1, ce qui est cohérent avec la forte conservation du site actif de ces enzymes. Une étude de modélisation par une méthode mixte QM/MM suggère au contraire que dans le cas de AhpE, la réaction de H_2O_2 avec l'intermédiaire C_P -SOH ne serait pas catalysée dans le site actif. Il faut cependant noter que cette enzyme est spécifique de peroxydes organiques et réagit moins efficacement avec H_2O_2 , avec une constante k_{SO_2} de l'ordre de $40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Semelak et al., 2020).

De manière surprenante, nous avons montré que des substrats peroxydes organiques suroxydent Tsa1 avec une constante de vitesse de suroxydation beaucoup plus élevée que H_2O_2 et ce résultat a été confirmé *in vivo*. Ce résultat suggère que ces molécules doivent être reconnues dans l'environnement du site actif FF et peuvent établir des interactions via leur partie hydrophobe. Il est également en accord avec nos résultats montrant que la première étape de réaction de Tsa1 avec tBOOH et CuOOH est réversible, et fait donc intervenir une interaction non covalente avec Tsa1 avant l'attaque de la C_P . Par contre la formation du sulfénate est légèrement ralentie avec ces substrats en comparaison avec H_2O_2 , ce qui pourrait être dû à une accessibilité suboptimale du groupement peroxyde à la Cys C_P .

Nos résultats laissent entrevoir de nouvelles études structure-fonction d'une autre enzyme de la même famille, la Tsa2 de *S. cerevisiae*. Elle possède une forte identité de séquence avec Tsa1, mais est inductible par les peroxydes. Tsa2 est particulièrement impliquée dans la réponse aux peroxydes organiques, puisque la délétion du gène codant Tsa2 résulte en une sensibilité particulière des levures au tBOOH (Munhoz & Netto, 2004). De plus la surexpression de Tsa2 dans *S. cerevisiae* confère aux cellules une résistance accrue vis-à-vis de tBOOH, ce qui n'est pas le cas de Tsa1 (Biteau, Thèse 2003).

Ce comportement pourrait être dû à une spécificité de substrat et une sensibilité différente à la suroxydation, qu'il sera intéressant de comparer à celles de Tsa1 grâce à notre méthodologie et à l'aide de données structurales (Nielsen et al., 2016).

La suroxydation des autres familles de Prx

Peu de données quantitatives sont disponibles sur la sensibilité à la suroxydation de Prx d'autres familles. Une transition analogue à la transition FF/LU a été décrite pour la plupart des familles de Prx possédant un résidu Cys C_R, c'est-à-dire Prx1, Prx5, PrxQ et TPx (Perkins et al., 2015)(tableau 2 page 32). Cependant cette transition diffère nécessairement d'une famille à l'autre puisque la C_R est située à différentes positions dans la structure. La question du mécanisme de suroxydation et du rôle de la transition FF/LU dans la compétition entre le cycle peroxydase et la sulfinylation est donc posée.

Par exemple dans le cas de la TPx d'*E. coli*, une étude a montré par dichroïsme circulaire l'existence d'un changement de positionnement des acides aminés aromatiques lors du passage de la forme FF vers LU (Vazquez et al., 2020). Cette enzyme réduit préférentiellement les peroxydes organiques et est sensible à la suroxydation par le CuOOH avec un C_{hyp1%} de 156 µM (Nelson et al., 2013). Cependant, elle ne possède pas les motifs responsables de la sensibilité existant chez les Prx1 et est donc qualifiée de Prx robuste. La question se pose donc du rôle de ce changement conformationnel et des éléments de structure qui favorisent la suroxydation. Dans le cas de la famille Prx5, la Prx5 humaine possède une extension de 22 acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale, qui augmente sa constante de vitesse de recyclage de huit fois (Vazquez et al., 2020). Cette particularité structurale est-elle répercutée sur la sensibilité à la suroxydation de cette enzyme ? Enfin la Prx6 ne possède qu'une Cys, et est recyclée directement par le glutathion. A l'instar des enzymes de type Prx1, la Prx6 humaine est multifonctionnelle : sa modification par sulfinylation permettrait d'inhiber l'activité peroxydase au profit d'une activité phospholipase A2, deux activités impliquées dans la réparation des lipides membranaires oxydés en réponse à un stress oxydant ou au cours d'événements de signalisation (Fisher et al., 2017; Kim et al., 2008). Une étude récente indique que chez *S. cerevisiae* la suroxydation d'une Prx6 est essentielle pour prévenir l'accumulation de glutathion oxydée dans les mitochondries en conditions de stress oxydant (Calabrese et al., 2019). Quel est son mécanisme de suroxydation ? L'étape de

sulfinylation est-elle en compétition directe avec le glutathion, ou avec une étape conformationnelle comme Tsa1 ?

La sulfinylation d'autres protéines

Notre étude a permis de clarifier les mécanismes moléculaires contrôlant la sensibilité des Prx à la suroxydation. Récemment, une étude protéomique a permis d'identifier de nombreuses autres protéines sensibles à la suroxydation et de localiser la Cys cible (Akter et al., 2018). De façon inattendue, un nombre significatif de ces protéines sulfinylées se sont révélées être des substrats de Srx, suggérant que la sulfinylation est une modification post traductionnelle répandue à fonction de régulation. Ceci soulève la question du mécanisme de suroxydation de ces protéines. Il est probable que ce mécanisme mette en jeu une compétition analogue à celle des Prx, avec l'oxydation de la Cys cible sous forme sulfénique, puis une compétition entre une réaction de réduction, par un réducteur à thiol, et la réaction de sulfinylation.

Notre étude a permis de jeter les bases de l'étude des mécanismes de régulation des protéines sensibles à la sulfinylation. Parmi les nouveaux substrats de Srx découverts, DJ-1 est une protéine associée à la maladie de Parkinson possédant comme les Prx, des activités multiples, de type antioxydante déglycase et de type chaperon, régulées par sulfinylation. La protéine DJ-1 humaine est un homodimère qui possède 3 Cys : la Cys 106 est catalytique assurant l'activité déglycase (Richarme et al., 2015). Ce résidu, très réactif, est sensible à la suroxydation. Le résidu Cys 53 est impliqué dans un pont disulfure avec son homologue situé sur la seconde sous unité, stabilisant le dimère de DJ-1. Très récemment, la sulfinylation de la Cys 46 a été observée, et parallèlement la forme sulfinylée sur la Cys 46 s'est avérée être réduite par Srx (Akter et al., 2018). Ces deux Cys présentent-elles des sensibilités équivalentes à la sulfinylation en présence de peroxyde ou existe-t-il une gradation de la sensibilité permettant "d'allumer ou éteindre" une fonction précise dans des conditions de stress oxydant plus ou moins sévères ? La méthodologie développée dans ce projet sur les Prx pourrait être adaptée à DJ-1 et d'autres protéines sensibles à la sulfinylation, afin d'identifier les mécanismes généraux contrôlant cette modification redox, dont l'impact biologique est encore mal connu.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Matériel

1. Les souches bactériennes d'*Escherichia coli*

Nom de la souche	Utilisation
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> . Cette souche est utilisée pour la préparation de l'ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B-m_B-)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S). Souche dérivée de la souche BL21 (DE3) contenant des mutations ponctuelles du gène <i>lacI</i> et du promoteur <i>lacUV5</i> (Kwon et al., 2015; Miroux and Walker, 1996) Cette souche est utilisée pour la surexpression des protéines recombinantes (Tsa1, Trx1, hPrx1). Elle contient une copie chromosomique de la séquence codant l'ARN polymérase du bactériophage T7 placée sous le contrôle du promoteur <i>lacUV5</i> inductible par l'IPTG.

2. Les souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Nom de la souche	Utilisation
<i>S.cerevisiae</i> RDKY3615	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>lys2ΔBgl</i> , <i>hom3-10</i> , <i>ade2Δ1</i> , <i>ade8</i> , <i>hxt13::URA3</i>
<i>S.cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>S.cerevisiae</i> Δ <i>tsa1</i>	BY4741 <i>tsa1Δ::kanMX4</i>
<i>S.cerevisiae</i> MEHY1631	RDKY3615 <i>ogg1Δ tsa1Δ::PRXI</i>

3. Plasmides d'expression des protéines recombinantes

Nom du plasmide	Utilisation
pET28b-HT-Tsa1	Plasmide intégrant la séquence nucléotidique du gène <i>tsa1</i> (Tsa1 de <i>S.cerevisiae</i>) fusionnée avec une séquence codant une étiquette 6xHis en N-ter, sous contrôle du promoteur T7. Vecteur portant un gène de résistance à la kanamycine.
pET28b-HT-hPrx1	Plasmide intégrant la séquence nucléotidique du gène <i>prdx1</i> (Prx1 humaine) fusionnée avec une séquence codant une étiquette 6xHis en N-ter, sous contrôle du promoteur T7. Vecteur portant un gène de résistance à la kanamycine.
pET20b-Trx1	Plasmide intégrant la séquence nucléotidique du gène <i>trxA</i> (Trx1 de <i>E. coli</i>). Vecteur portant un gène de résistance à l'ampicilline.
pRS316-Myc-Tsa1	Plasmide intégrant la séquence nucléotidique du gène <i>tsa1</i> (Tsa1 de <i>S.cerevisiae</i>) fusionnée avec une séquence codant une étiquette Myc en N-ter, sous contrôle du promoteur lac. Vecteur portant un gène de résistance à l'ampicilline et porteur du marqueur d'auxotrophie URA3.
pRS316-Tsa1-A177S A178D	Plasmide intégrant la séquence nucléotidique du gène <i>tsa1</i> mutée (Tsa1 de <i>S.cerevisiae</i>) fusionnée avec une séquence codant une étiquette Myc en N-ter, sous contrôle du promoteur lac. Vecteur portant un gène de résistance à l'ampicilline et porteur du marqueur d'auxotrophie URA3.

4. Culture des bactéries et levures

Les milieux ci-dessous sont autoclavés 20 min à 120 °C sous une pression de 1 bar.

Pour les milieux solides, de l'agar est additionné à raison de 20 g/L avant le passage à l'autoclave.

Les antibiotiques sont ajoutés après l'étape de stérilisation, à une concentration finale de 200 mg/L pour ampicilline et 50 mg/L pour la kanamycine.

- **Milieu riche LB (Luria Bertani)** : Tryptone 20 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,5 ajusté par NaOH. Ce milieu est utilisé pour les précultures bactériennes des différentes protéines recombinantes et la production de Trx1.
- **Milieu ZYM5052** : Milieu LB, glucose (10 %), lactose (12 %), glycérol (5 %). Ce milieu est utilisé pour la production bactérienne de hPrx1, Tsa1 wt et mutants. (Studier, 2005)
- **Milieu SD** : Milieu synthétique minimal, extrait de levure sans acides aminés (0,67 %), glucose (2 %), additionné de l'acide aminé approprié. Ce milieu est utilisé pour la culture des levures.
- **Milieu YPD** : extrait de levure (1 %), peptone (2 %), glucose (2 %). Ce milieu est utilisé pour la culture des levures.

5. Les tampons et solutions d'usage courant

Tampon	Composition
Tampon Start	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5.
Tampon TE	Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8.
Tampon TE, KCl	Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8, KCl 1 M.
Tampon TK	Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, pH 7.
Tampon de migration SDS-PAGE	Glycine 14,25 g/L; Tris 3 g/L; SDS 1 g/L.
Bleu de dépôt pour gel SDS-PAGE	Tris-HCl 80 mM pH 6,8 ; SDS 3 %, glycérol 10 % ; Bleu de bromophénol 0,1% (100 mM de DTT est ajoutée dans des conditions réductrices).
Bleu natif pour dépôt sur gel d'agarose	EDTA 5 mM ; SDS 0,4 % ; glycérol 5 % ; bleu de bromophénol 0,2 %.
Solution de coloration pour gel SDS-PAGE	Éthanol 5 % ; acide acétique 7,5 %, Bleu de Coomassie G 250 0,1 %
Solution de décoloration pour gel SDS-PAGE	Éthanol 50 % ; acide acétique 10 %.
Tampon PBS (10X)	Na ₂ HPO ₄ 100 mM; KH ₂ PO ₄ 18 mM pH 7,3; NaCl 1.4 M; KCl 27 mM.
Tampon NaPi, NaF	Na ₂ HPO ₄ 10 mM; NaF 100 mM pH 7

6. Les oligonucléotides de clonage ou mutagenèse

Séquence 5'-3'	Usage
CTGCTGATAGGCATATGTCTTCAGGAAATG	Clonage gène <i>prdx1</i> <i>H.sapiens</i> for
CAGCCCAGAGCTCACTTCTGCTTGGAG	Clonage gène <i>prdx1</i> <i>H.sapiens</i> rev
CACATACATACCATATGGTCGCTCAAG	Clonage gène <i>tsa1</i> <i>S.cerevisiae</i> for
GTCATTTAGAGAGCTCTGCAAGCGTC	Clonage gène <i>tsa1</i> <i>S.cerevisiae</i> rev
GGTACTGTCTTGCCAGCTAACTGGACTCCAGG	mutagenèse Tsa1 C171A for
CCTGGAGTCCAGTTAGCTGGCAAGACAGTACC	mutagenèse Tsa1 C171A rev
CCTTCACTTTCGTCGCGCCAACCGAAATC	mutagenèse Tsa1 C48A for
GATTCGGTTGGCGCGACGAAAGTGAAGG	mutagenèse Tsa1 C48A rev
GACTCCAAGGAAGGTGGCGAAGCTGCCAAC	mutagenèse Tsa1 Y190G F191G for
GTTGGCAGCTTCGCCACCTTCCTTGGAGTC	mutagenèse Tsa1 Y190G F191G rev
GACTCCAAGGAATAATTCGAAGCTGCC	mutagenèse Tsa1 Δ 190-196
GGCAGCTTCGAATTATTCCTTGGAGTC	mutagenèse Tsa1 Δ 190-196
GCCTTCCAATTTACCGACAAGAACGG	mutagenèse Tsa1 W161F for
CCGTTCTTGTCGGTAAATTGGAAGGC	mutagenèse Tsa1 W161F rev
CCTTCACTTTCGTCAGCCCAACCGAAATCATTG	mutagenèse Tsa1 C48S for
CAATGATTTTCGGTTGGGCTGACGAAAGTGAAGG	mutagenèse Tsa1 C48S rev
CCTTTTGGCATTACCAATATCCC	mutagenèse Tsa1 W83F for
GGGATATTGGTAAATGCCAAAAGG	mutagenèse Tsa1 W83F rev
GCCATGTAACCTTACTCCAGGTGC	mutagenèse Tsa1 W173F for
GCACCTGGAGTAAAGTTACATGGC	mutagenèse Tsa1 W173F rev
CTACCATCAAGCTGACCGTTGAAG	mutagenèse Tsa1 P182L for
CTTCAACGGTCAGCTTGATGGTAG	mutagenèse Tsa1 P182L rev
GCTTGATGGTATCAGAACCTGGAGTC	mutagenèse Tsa1 A177S A178D for
GACTCCAGGTTCTGATACCATCAAGC	mutagenèse Tsa1 A177S A178D rev

En gras les mutations présentées dans cette étude.

II. Méthodes

1. Mutagenèse dirigée par PCR

La mutagenèse dirigée par PCR a été utilisée en employant l'ADN polymérase *Pfu*[®] (Fermentas). La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL, en présence de 0,02 unité d'enzyme *Pfu*[®] dans son tampon, de 0,2 µM de chaque dNTP (Fermentas), de 250 ng de plasmide recombinant et de 40 nM de chaque amorce complémentaire apportant les séquences mutées. La température et la durée de chaque étape réactionnelle sont ajustées en fonction du T_m des amorces et de la taille du plasmide. Après 30 cycles réactionnels, 10 µL de mélange réactionnel sont traités par l'endonucléase *DpnI* (Fermentas) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Après transformation des cellules *E. coli* DH5α super-compétentes et sélection des clones recombinants sur milieu sélectif, les plasmides sont amplifiés par mini-préparation et analysés par séquençage.

2. Production et purification des enzymes étudiées

Les souches, plasmides, milieux et tampons utilisés dans les techniques décrites ci-dessous sont indiqués dans la section Matériel.

A. Production et purification de Tsa1 recombinante portant une étiquette 6xHis

L'enzyme Tsa1 portant une étiquette His est produite dans la souche C41(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET28b-HT-Tsa1, dans du milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/l). Les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,1 unité d'absorbance à 600 nm, puis incubées à 37 °C sous agitation. L'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG (1 mM) à une absorbance à 600 nm d'environ 0,6 au bout de 3 à 4 heures. Les cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

a) Extraction

Après suspension du culot de cellules dans le tampon Start en présence de Benzonase® (20 U/mL) et de MgSO_4 (2 mM), les bactéries sont lysées par sonication (Branson Sonifier), à 4 °C, puis centrifugées à 20 000 g, 4 °C pendant 40 min, pour éliminer les débris cellulaires insolubles. Le surnageant (extrait cellulaire soluble) contient la protéine d'intérêt.

b) Chromatographie d'affinité sur résine à métal immobilisé Ni^{2+} (IMAC)

La protéine est retenue sur la résine grâce à des interactions spécifiques entre les ions Ni^{2+} , fixés préalablement à la résine, et l'étiquette 6xHis fusionnée du côté N-ter de Tsa1.

L'extrait cellulaire soluble, filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 μm , est injecté sur une colonne de résine Ni Sepharose HP (25 ml, Amersham Biosciences) couplée au système chromatographique ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée avec le tampon start, et en présence de 50 mM d'imidazole. La présence d'imidazole lors de la charge a pour but d'éliminer la fixation non spécifique de protéines cellulaires, tout en assurant la fixation de la totalité de la protéine Tsa1.

L'imidazole contenu dans le tampon d'élution entre en compétition avec les chaînes latérales des histidines de l'étiquette His de la Tsa1. L'élution est obtenue grâce à un palier d'imidazole à une concentration de 500 mM, et est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

c) Concentration et conservation

Les fractions contenant Tsa1 pure, identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE, sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La protéine Tsa1 est dialysée contre le tampon TK en présence de DTT (20 mM). Enfin la protéine est conservée congelée à -20°C. La concentration molaire de la protéine est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm (coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{nm}} = 29\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

B. Production et purification de hPrx1 recombinante portant une étiquette 6xHis

L'enzyme hPrx1 portant une étiquette His est produite dans la souche C41(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET28b-HT-hPrx1, dans du milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/l). Les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 0,1 unité d'absorbance à 600 nm, puis incubées à 37 °C sous agitation. L'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG (1 mM) à une absorbance à 600 nm d'environ 0,6 au bout de 3 à 4 heures. Les cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

a) Extraction

Le même protocole est utilisé que celui décrit précédemment.

b) Chromatographie d'affinité sur résine à métal immobilisé Ni²⁺ (IMAC)

La protéine est retenue sur la résine grâce à des interactions spécifiques entre les ions Ni²⁺, fixés préalablement à la résine, et l'étiquette 6xHis fusionnée du côté N-ter de Tsa1.

L'extrait cellulaire soluble, filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 µm, est injecté sur une colonne de résine Ni Sepharose HP (25 ml, Amersham Biosciences) couplée au système chromatographique ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée avec le tampon start, et en présence de 50 mM d'imidazole. La présence d'imidazole lors de la charge a pour but d'éliminer la fixation non spécifique de protéines cellulaires, tout en assurant la fixation de la totalité de la protéine Tsa1.

L'imidazole contenu dans le tampon d'élution entre en compétition avec les chaînes latérales des histidines de l'étiquette His de hPrx1. L'élution est obtenue grâce à un palier d'imidazole à une concentration de 500 mM, et est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

c) Concentration et conservation

Les fractions contenant hPrx1 pure, identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE, sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La protéine hPrx1 est dialysée contre le tampon TK en présence de DTT (20 mM). Enfin la protéine est conservée congelée à -20°C. La concentration molaire de la protéine est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm (coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{nm}} = 18\,450 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

C. Production et purification de la Trx1 d'*E. coli*

L'enzyme Trx1 est produite dans la souche C41(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET20b- Trx1, dans du milieu LB supplémenté en ampicilline (200 mg/l). Les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,1 unité d'absorbance à 600 nm, puis incubées à 37 °C sous agitation. L'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG (1 mM) à une absorbance à 600 nm d'environ 0,6 au bout de 3 à 4 heures. Les cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

a) Extraction

Le même protocole est utilisé que celui décrit précédemment.

b) Précipitation au sulfate d'ammonium

Après extraction, l'extrait cellulaire est dilué à une $\text{DO}_{280\text{nm}}$ de 50 puis est amené à 55% de saturation en SA et incubé 2 heures à 4 °C sous agitation. La protéine Trx1 est récupérée dans le culot après 30 min de centrifugation à 12000 g.

c) Filtration sur gel (ACA54)

Le culot de précipitation, repris dans le tampon TE, est déposé après ajout de DTT (20 mM) sur une colonne de filtration sur gel de type ACA54 de 2 L (Ultrogel AcA54, domaine de fractionnement de 5000 à 70000 Da, Pall®), couplée à une pompe Frac920, préalablement équilibrée avec le même tampon (TE). Cette étape permet de séparer la protéine Trx1 ayant une masse moléculaire de 11.7 kDa d'une grande

partie des contaminants protéiques. Les fractions contenant Trx1, identifiées par électrophorèse en condition dénaturante de type SDS-PAGE sont rassemblées.

d) Chromatographie échangeuse d'anions

Le même protocole est utilisé que dans le § (3) page 158. La Trx1 est éluée à une concentration de 320 mM de KCl.

e) Concentration et conservation

Les fractions contenant Trx1 sont concentrées par ultrafiltration sur concentrateur Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La Trx1 est conservée à -20°C. La concentration molaire est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm ($\epsilon = 14\,500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3. Caractérisation biochimique des protéines

A. Analyse des protéines recombinantes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Cette technique permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification. Après concentration des protéines par migration dans un gel à 5 % en polyacrylamide, celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 12,5 % en polyacrylamide. Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie R-250 (152).

B. Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes.

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été déterminé à l'aide du site ProtParamTool, Swiss Prot.

C. Dosage des groupements thiols libres par le 5,5-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB).

Le contenu en thiols libres des (7,35 μM) est choisie pour donner un signal de 0,1 DO_{412nm} par thiol libre. En conditions dénaturantes (SDS 2% final, en présence

d'urée 8 M), l'expérience permet de doser la totalité des cystéines réduites. Le tampon utilisé est TE (pH 8).

D. Détermination de la masse moléculaire des protéines par spectrométrie de masse

L'échantillon devant être exempt de trace de sels, les protéines sont dessalées par chromatographie en phase inverse sur une colonne Atlantis BEH (C8), 2,1 x 250 mm, 2 μ m (Waters) couplée au système UPLC Ultimate 3000 (Thermo Dionex). Les protéines éluées sont analysées par spectrométrie de masse. Les masses moléculaires des protéines ont été aimablement déterminées par le Dr Hortense Mazon au laboratoire "service commun de chromatographie et spectrométrie de masse de l'Université de Lorraine". L'appareil utilisé est un spectromètre de masse de type ESI-MS, MicrOTOF-Q (Bruker Daltonics).

4. Caractérisation enzymatique

A. Suroxydation de la cystéine catalytique d'une 2-Cys Prx sous forme acide sulfinique

La forme $\text{Tsa1}_{\text{SO}_2}$, est obtenue en présence de H_2O_2 et d'un réducteur permettant de placer l'enzyme en conditions de cycle multiple. La protéine Tsa1 est incubée à 30 °C en présence de 5 mM de H_2O_2 et de 100 mM de DTT, pendant 5 minutes, un second puis un troisième ajout de 5 mM de H_2O_2 chacun suivi d'une incubation de 5 minutes à 30 °C permettent d'atteindre un degré d'oxydation de la Cys C_p en acide sulfinique supérieur à 95 %. Le mélange réactionnel est dessalé par filtration sur gel sur une colonne PD-10 (GE Healthcare) pour éliminer DTT et H_2O_2 en excès. La concentration molaire de $\text{Tsa1C}_p\text{-SO}_2\text{H}$ est déterminée par spectrophotométrie à 280 nm. ($\epsilon_{280\text{nm}} = 29\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

B. Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire

- a) Test d'activité peroxydase des Prx *via* le système couplé Trx1/TR/NADPH.

Les tests d'activité sont effectués dans le tampon TK à 25 °C en utilisant la Trx1 et la TrxR d'*E. coli* produites et purifiées au laboratoire. La disparition du NADPH est suivie par la diminution de la DO_{340nm} au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV mc2 (Safas, Monaco). Le mélange réactionnel comporte : H_2O_2 (100 μM), Trx (150 μM), Trx réductase (2 μM), NADPH (200 μM), l'ajout de Tsa1 déclenchant la réaction. Une mesure à blanc est enregistrée systématiquement avant l'ajout de Tsa1 et est déduite de la mesure finale. Une mole de NADPH est consommée par mole de Tsa1 réduite, soit un coefficient d'extinction molaire à 340 nm de $6200 M^{-1}.cm^{-1}$.

b) Mesure de la sensibilité à la suroxydation des Prx via le système couplé Trx1/TR/NADPH.

La mesure de la sensibilité à la suroxydation ou $C_{Hyp1\%}$ a été effectuée en suivant la méthode développée par Nelson et al. Comme dans le paragraphe précédent (1.), les tests d'activité sont effectués dans le tampon TK à 25 °C en utilisant la Trx1 et la TR d'*E. coli* produites et purifiées au laboratoire. La disparition du NADPH est suivie par la diminution de la DO_{340nm} au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV mc2 (Safas, Monaco). Le mélange réactionnel comporte : H_2O_2 en concentrations variables, Trx (5 μM), Trx réductase (0.25 μM), NADPH (200 μM), l'ajout de Tsa1 (1 μM) déclenchant la réaction. Au cours de la réaction, l'enzyme se suroxyde et une fraction s'inactive à chaque cycle catalytique, entraînant une baisse de consommation de NADPH et une incurvation progressive de la droite initiale. Les courbes sont transformées en dérivées première et la constante de vitesse k_{inact} est ensuite déduite de la pente des droites obtenues. k_{inact} est ensuite divisée par la vitesse initiale au temps $t=0$ pour donner la fraction d'inactivation f_{inact} . En restant sous les 5% de fraction suroxydée, la courbe f_{inact} en fonction de [peroxydes] est une droite qui augmente linéairement avec la concentration en peroxyde. L'inverse de cette droite nous permet d'obtenir la concentration en peroxyde nécessaire pour suroxyder 100% de Tsa1 en un cycle catalytique. Pour obtenir $C_{Hyp1\%}$, valeur correspondant à la concentration en peroxyde nécessaire pour suroxyder uniquement 1% du pool d'enzyme, nous divisons le résultat précédent par 100.

C. Détermination des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire

a) Cinétique rapide par stopped-flow avec suivi de fluorescence intrinsèque

Un appareil de suivi de cinétiques rapides de type stopped flow a été utilisé (SX19MV-R, Applied Photophysics, Ltd, UK) (Fig. 71) pour déterminer les vitesses de réaction entre les Prxs et les différents substrats peroxydes. Les expériences de détection de fluorescence intrinsèque de la protéine sont réalisées à 25°C, dans le tampon TK, avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 295 nm et une collecte de la lumière émise au-delà de 320 nm grâce à un filtre adapté. L'appareil permet le mélange rapide, volume à volume, de deux composés distincts présent chacun dans une seringue, la première contient l'enzyme (Tsa1 wt ou mutants, hPrx) à une concentration finale de 5 μ M, la seconde contient le peroxyde que l'on souhaite étudier en concentrations variables. Six tirs sont enregistrés puis moyennés pour chaque valeur de peroxyde. Les données sont ensuite ajustées à une équation de type exponentielle grâce au logiciel fourni par le constructeur (ProData viewer). Lors des études en présence de viscosogène, des concentrations allant de 10% à 30% v/v de saccharose ont été ajoutées au réactifs (enzyme et peroxydes).

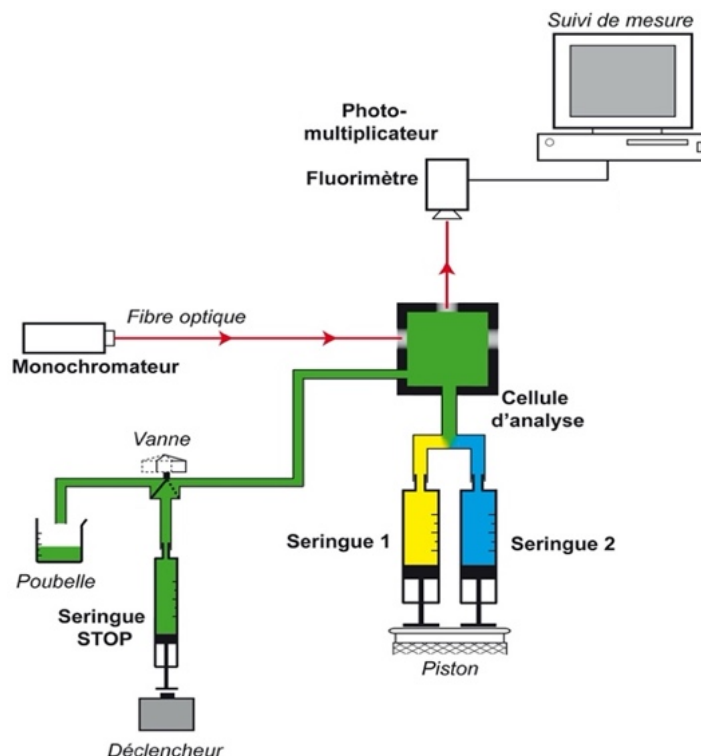


Fig. 71. Représentation schématique du système stopped flow. (Applied Photophysics, Ltd, UK) La seringue 1 (H_2O_2 ou peroxyde substrat) et la seringue 2 (Tsa1) permettent un mélange réactionnel rapide volume à volume. Un suivi d'émission de fluorescence du mélange en fonction du temps est alors déclenché. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm. Un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm.

b) Cinétique rapide par stopped flow avec suivi du signal de dichroïsme circulaire

Lors de ces expérimentations, l'appareil de suivi de cinétiques rapides de type stopped flow utilisé, est un module du spectromètre de dichroïsme circulaire (Chirscan-Plus, Applied Photophysics, Ltd, UK) permettant de déterminer les vitesses de changement de conformation de Tsa1 wt après réaction avec H_2O_2 . Les expériences sont réalisées à 25°C, dans le tampon Phosphate de sodium 10 mM, NaF 100 mM pH 7, utilisant le signal dichroïque dans l'UV proche généré à 270 nm. L'appareil permet le mélange rapide de deux solutions distinctes présentes chacune dans une seringue, la première contient l'enzyme Tsa1 wt à une concentration finale de 50 μM , la seconde contient H_2O_2 à 100 μM . 50 tirs accumulés puis moyennés ont été nécessaires pour obtenir un meilleur résultat final avec un plus faible rapport signal/bruit. La bande passante a été réglée sur 4 nm permettant une plus grande intensité lumineuse émise et détectée.

c) Détection des espèces par ESI-MS après séparation par chromatographie en phase inverse C8

Le suivi de l'évolution des espèces protéiques en présence de peroxydes, a été également réalisé par chromatographie en phase inverse. Les mélanges réactionnels contenant Tsa1^{C171A} (5 μ M) et peroxyde (200 μ M) sont réalisés en tampon TK. La réaction a été arrêtée après 1-5 s comme indiqué par acidification à l'aide du TFA (0,3 % concentration finale). Les aliquots ont été chargés sur une colonne UPLC Atlantis BEH (C8), 2,1 x 250 mm, 2 μ m (Waters), préalablement équilibrée dans H₂O, 0,1% de TFA, couplée au système UPLC Ultimate 3000 (Thermo). Les protéines ont été éluées en utilisant un gradient linéaire de 30 à 80 % de B (acétonitrile, TFA 0,1%), à un débit de 0,4 mL/min. Les fractions recueillies ont été concentrées 5x et stockées à -20 °C puis analysées par spectrométrie de masse.

5. Caractérisation biophysique des protéines

A. Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain

Afin de comparer le contenu global en structures secondaires des différentes formes de Tsa1, des spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés sur l'appareil Chirascan Plus (Applied Photophysics, Ltd, UK) en mode cuve. Les mesures dans l'UV lointain ont été obtenues en utilisant des cuves en quartz plates avec un trajet optique de 0,01 cm contenant 30 μ L de Tsa1 wt ou mutants à 50 μ M, dans le Tampon NaPi, NaF pH 7.

La fenêtre de longueurs d'ondes scannées se situe entre 180 et 260 nm avec un pas de 0,5 nm et un temps d'acquisition de 0,5 nm/s. Chaque expérience est la moyenne de trois mesures successives.

B. Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche.

Afin de déterminer si les formes redox de Tsa1 wt et mutants ont une signature spécifique liée à la modification de l'environnement immédiat des acides aminés aromatiques, des spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche ont été mesurés. Les mesures s'effectuent à l'aide d'une cuve en quartz de trajet optique 1 cm, dans le même tampon que précédemment et la fenêtre de mesure se situe entre 250 et 320 nm. Un pas de 1 nm est utilisé avec un temps d'acquisition de 1 nm/s. Un volume de 1,2 mL de Tsa1 wt ou mutants à 50 μ M est nécessaire. Le spectre final est la moyenne de trois mesures.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ådén, J., Wallgren, M., Storm, P., Weise, C.F., Christiansen, A., Schröder, W.P., Funk, C., and Wolf-Watz, M. (2011). Extraordinary μs – ms backbone dynamics in *Arabidopsis thaliana* peroxiredoxin Q. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1814, 1880–1890.
- Adimora, N.J., Jones, D.P., and Kemp, M.L. (2010). A Model of Redox Kinetics Implicates the Thiol Proteome in Cellular Hydrogen Peroxide Responses. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 731–743.
- Akter, S., Fu, L., Jung, Y., Conte, M.L., Lawson, J.R., Lowther, W.T., Sun, R., Liu, K., Yang, J., and Carroll, K.S. (2018). Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase. *Nat. Chem. Biol.* 14, 995–1004.
- Appenzeller-Herzog, C., Bánhegyi, G., Bogeski, I., Davies, K.J.A., Delaunay-Moisán, A., Forman, H.J., Görlach, A., Kietzmann, T., Laurindo, F., Margittai, E., et al. (2016). Transit of H_2O_2 across the endoplasmic reticulum membrane is not sluggish. *Free Radic. Biol. Med.* 94, 157–160.
- Augustin, W., Gellerich, F., Wiswedel, I., Evtodienko, Y., and Zinchenko, V. (1979). Inhibition of cation efflux by antioxidants during oscillatory ion transport in mitochondria. *FEBS Lett.* 107, 151–154.
- Bakhmutova-Albert, E.V., Yao, H., Denevan, D.E., and Richardson, D.E. (2010). Kinetics and Mechanism of Peroxymonocarbonate Formation. *Inorg. Chem.* 49, 11287–11296.
- Bakhtina, M., Lee, S., Wang, Y., Dunlap, C., Lamarche, B., and Tsai, M.-D. (2005). Use of Viscogens, dNTP α S, and Rhodium(III) as Probes in Stopped-Flow Experiments To Obtain New Evidence for the Mechanism of Catalysis by DNA Polymerase β^{+} . *Biochemistry* 44, 5177–5187.
- Beckman, J.S., and Freeman, B.A. (1990). Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Med. Sci.* 5.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Bersweiler, A., D’Autréaux, B., Mazon, H., Kriznik, A., Belli, G., Delaunay-Moisán, A., Toledano, M.B., and Rahuel-Clermont, S. (2017). A scaffold protein that chaperones a cysteine-sulfenic acid in H_2O_2 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 13, 909–915.
- Bienert, G.P., and Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 1596–1604.
- Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.
- Bolduc, J.A., Nelson, K.J., Haynes, A.C., Lee, J., Reisz, J.A., Graff, A.H., Clodfelter, J.E., Parsonage, D., Poole, L.B., Furdui, C.M., et al. (2018a). Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 293, 11901–11912.
- Bolduc, J.A., Nelson, K.J., Haynes, A.C., Lee, J., Reisz, J.A., Graff, A.H., Clodfelter, J.E., Parsonage, D., Poole, L.B., Furdui, C.M., et al. (2018b). Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* 293, 11901–11912.
- Boukhenouna, S., Mazon, H., Branlant, G., Jacob, C., Toledano, M.B., and Rahuel-Clermont, S. (2015). Evidence That Glutathione and the Glutathione System Efficiently Recycle 1-Cys Sulphiredoxin *In Vivo*. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 731–743.
- Calabrese, G., Peker, E., Amponsah, P.S., Hoehne, M.N., Riemer, T., Mai, M., Bienert, G.P., Deponte, M., Morgan, B., and Riemer, J. (2019). Hyperoxidation of mitochondrial peroxiredoxin limits H_2O_2 -induced cell death in yeast. *EMBO J.* 38.

- Calvo, I.A., Boronat, S., Domènech, A., García-Santamarina, S., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2013). Dissection of a Redox Relay: H₂O₂-Dependent Activation of the Transcription Factor Pap1 through the Peroxidatic Tpx1-Thioredoxin Cycle. *Cell Rep.* 5, 1413–1424.
- Cao, Z., and Lindsay, J.G. (2017). The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. In *Macromolecular Protein Complexes*, J.R. Harris, and J. Marles-Wright, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 127–147.
- Cao, Z., Subramaniam, S., and Bulleid, N.J. (2014). Lack of an Efficient Endoplasmic Reticulum-localized Recycling System Protects Peroxiredoxin IV from Hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* 289, 5490–5498.
- de Carvalho, M.D.C., De Mesquita, J.F., and Eleutherio, E.C.A. (2017). In Vivo Characterization of I91T Sod2 Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biochem.* 118, 1078–1086.
- Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S.G. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7017–7021.
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., and Babbitt, P.C. (2004). Divergence of Function in the Thioredoxin Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like Ancestor †. *Biochemistry* 43, 13981–13995.
- Cox, A.G., Brown, K.K., Arner, E.S.J., and Hampton, M.B. (2008). The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1097–1109.
- Dahl, J.-U., Gray, M.J., and Jakob, U. (2015). Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* 427, 1549–1563.
- Dalla Rizza, J., Randall, L.M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G., and Denicola, A. (2018). Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2: PRDX1, PRDX2 differential parameters. *Protein Sci.*
- Dalla Rizza, J., Randall, L.M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G., and Denicola, A. (2019). Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2: PRDX1, PRDX2 differential parameters. *Protein Sci.* 28, 191–201.
- D'Ambrosio, K., Limauro, D., Pedone, E., Galdi, I., Pedone, C., Bartolucci, S., and De Simone, G. (2009). Insights into the catalytic mechanism of the Bcp family: Functional and structural analysis of Bcp1 from *Sulfolobus solfataricus*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 76, 995–1006.
- Damiani, E., Paganga, G., Greci, L., and Rice-Evans, C. (1994). Inhibition of copper-mediated low density lipoprotein peroxidation by quinoline and indolinone nitroxide radicals. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1155–1161.
- Day, A.M., Brown, J.D., Taylor, S.R., Rand, J.D., Morgan, B.A., and Veal, E.A. (2012). Inactivation of a Peroxiredoxin by Hydrogen Peroxide Is Critical for Thioredoxin-Mediated Repair of Oxidized Proteins and Cell Survival. *Mol. Cell* 45, 398–408.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002a). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002b). A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. *Cell* 111, 471–481.
- Denicola, A., Souza, J.M., and Radi, R. (1998). Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3566–3571.

- Domènech, A., Ayté, J., Antunes, F., and Hidalgo, E. (2018). Using in vivo oxidation status of one- and two-component redox relays to determine H₂O₂ levels linked to signaling and toxicity. *BMC Biol.* 16, 61.
- Ellis, H.R., and Poole, L.B. (1997). Roles for the Two Cysteine Residues of AhpC in Catalysis of Peroxide Reduction by Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium* [†]. *Biochemistry* 36, 13349–13356.
- Etienne, F., Spector, D., Brot, N., and Weissbach, H. (2003). A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 378–382.
- Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011). Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 434–450.
- Folkes, L.K., Candeias, L.P., and Wardman, P. (1995). Kinetics and Mechanisms of Hypochlorous Acid Reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 120–126.
- Forman, H.J., and Fridovich, I. (1973). Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 396–400.
- Fourquet, S., Huang, M.-E., D’Autreaux, B., and Toledano, M.B. (2008). The Dual Functions of Thiol-Based Peroxidases in H₂O₂ Scavenging and Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1565–1576.
- Gaschler, M.M., and Stockwell, B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 419–425.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? 7.
- Gruez, A., and Branlant, G. (2012). Structural diversity in the recognition between reduced thioredoxin and its oxidized enzyme partners. *Biomol. Concepts* 3.
- Gruez, A., Libiad, M., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2010). Structural and Biochemical Characterization of Free Methionine- R -sulfoxide Reductase from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 285, 25033–25043.
- Hall, A., Karplus, P.A., and Poole, L.B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *Febs J* 276, 2469–2477.
- Hall, A., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2010). Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power Is Based on Transition-State Stabilization. *J. Mol. Biol.* 402, 194–209.
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 795–815.
- Hanzén, S., Vielfort, K., Yang, J., Roger, F., Andersson, V., Zamarbide-Forés, S., Andersson, R., Malm, L., Palais, G., Biteau, B., et al. (2016). Lifespan Control by Redox-Dependent Recruitment of Chaperones to Misfolded Proteins. *Cell* 166, 140–151.
- Haynes, A.C., Qian, J., Reisz, J.A., Furdul, C.M., and Lowther, W.T. (2013a). Molecular Basis for the Resistance of Human Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin 3 to Hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 29714–29723.
- Haynes, A.C., Qian, J., Reisz, J.A., Furdul, C.M., and Lowther, W.T. (2013b). Molecular basis for the resistance of human mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin 3 to hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 29714–29723.
- Higdon, A., Diers, A.R., Oh, J.Y., Landar, A., and Darley-Usmar, V.M. (2012). Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem. J.* 442, 453–464.

- Huang, B.K., and Sikes, H.D. (2014). Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol.* 2, 955–962.
- Ingold, I., and Conrad, M. (2018). Selenium and iron, two elemental rivals in the ferroptotic death process. *Oncotarget* 9.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., and Kimura, A. (1999). Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 27002–27009.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 17.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., et al. (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–635.
- Jarvis, R.M., Hughes, S.M., and Ledgerwood, E.C. (2012). Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1522–1530.
- Jeng, M.-F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* 2, 853–868.
- Jonsson, T.J., Murray, M.S., Johnson, L.C., and Lowther, W.T. (2008). Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. *J Biol Chem* 283, 23846–23851.
- Jönsson, T.J., Johnson, L.C., and Lowther, W.T. (2008). Structure of the sulphiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451, 98–101.
- Jonsson, T.J., Johnson, L.C., and Lowther, W.T. (2009). Protein engineering of the quaternary sulfiredoxin.peroxiredoxin enzyme.substrate complex reveals the molecular basis for cysteine sulfinic acid phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 33305–33310.
- Karplus, P.A. (2015). A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 80, 183–190.
- Kato, Y. (2014). The Formation of Lipid Hydroperoxide-Derived Amide-Type Lysine Adducts on Proteins: A Review of Current Knowledge. In *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules*, Y. Kato, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 21–39.
- Kil, I.S., Lee, S.K., Ryu, K.W., Woo, H.A., Hu, M.-C., Bae, S.H., and Rhee, S.G. (2012). Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H₂O₂-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. *Mol. Cell* 46, 584–594.
- Kim, K., Kim, H., and Stadtman, E.R. (1988). The Isolation and Purification of a Specific “Protector” Protein Which Inhibits Enzyme Inactivation by a Thiol/Fe(III)/O₂Mixed-function Oxidation System. 8.
- Kim, K.H., Lee, W., and Kim, E.E. (2016). Crystal structures of human peroxiredoxin 6 in different oxidation states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 717–722.
- Kwon, S.-K., Kim, S.K., Lee, D.-H., and Kim, J.F. (2015). Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Sci. Rep.* 5.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.

- Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 4537–4544.
- Li, S., Peterson, N.A., Kim, M.-Y., Kim, C.-Y., Hung, L.-W., Yu, M., Lekin, T., Segelke, B.W., Lott, J.S., and Baker, E.N. (2005). Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys Peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346, 1035–1046.
- Lyons, T.W., Reinhard, C.T., and Planavsky, N.J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* 506, 307–315.
- Marla, S.S., Lee, J., and Groves, J.T. (1997). Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14243–14248.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin —a fold for all reasons. *Structure* 3, 245–250.
- Medinas, D.B., Toledo, Jr., J.C., Cerchiaro, G., do-Amaral, A.T., de-Rezende, L., Malvezzi, A., and Augusto, O. (2009). Peroxymonocarbonate and Carbonate Radical Displace the Hydroxyl-like Oxidant in the Sod1 Peroxidase Activity under Physiological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 639–648.
- Meitzler, J.L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Roy, K., and Doroshov, J.H. (2014). NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2873–2889.
- Milev, N.B., Rhee, S.-G., and Reddy, A.B. (2018). Cellular Timekeeping: It's Redox o'Clock. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a027698.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298.
- Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A.V., Pace, P., O'Reilly, R.J., Hampton, M.B., Radom, L., and Winterbourn, C.C. (2011). Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide: A KINETIC AND COMPUTATIONAL STUDY. *J. Biol. Chem.* 286, 18048–18055.
- Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004). Evidence for a New Sub-class of Methionine Sulfoxide Reductases B with an Alternative Thioredoxin Recognition Signature. *J. Biol. Chem.* 279, 42462–42468.
- Nelson, K.J., Knutson, S.T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L.B., and Fetrow, J.S. (2011). Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 79, 947–964.
- Nelson, K.J., Parsonage, D., Karplus, P.A., and Poole, L.B. (2013). Evaluating peroxiredoxin sensitivity towards inactivation by peroxide substrates. *Methods Enzymol.* 527.
- Nielsen, M.H., Kidmose, R.T., and Jenner, L.B. (2016). Structure of TSA2 reveals novel features of the active-site loop of peroxiredoxins. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 72, 158–167.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D.C., Soares Netto, L.E., and Augusto, O. (2007). Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 326–334.
- del Olmo, M., del, Kramer, A., and Herzel, H. (2019). A Robust Model for Circadian Redox Oscillations. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2368.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* 277, 12016–12022.

- O'Neill, J.S., and Reddy, A.B. (2011). Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469, 498–503.
- O'Neill, J.S., van Ooijen, G., Dixon, L.E., Troein, C., Corellou, F., Bouget, F.Y., Reddy, A.B., and Millar, A.J. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469, 554–558.
- Packer, M.A., and Murphy, M.P. (1995). Peroxynitrite Formed by Simultaneous Nitric Oxide and Superoxide Generation Causes Cyclosporin-A-Sensitive Mitochondrial Calcium Efflux and Depolarisation. *Eur. J. Biochem.* 234, 231–239.
- Palde, P.B., and Carroll, K.S. (2015). A universal entropy-driven mechanism for thioredoxin–target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 7960–7965.
- Park, S.G., Cha, M.-K., Jeong, W., and Kim, I.-H. (2000). Distinct Physiological Functions of Thiol Peroxidase Isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 5723–5732.
- Parsonage, D., Nelson, K.J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P.A., Furdul, C.M., and Poole, L.B. (2015). Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. *Biochemistry* 54, 1567–1575.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2010). Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chem. Biol.* 5, 47–62.
- Perkins, A., Gretes, M.C., Nelson, K.J., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2012). Mapping the Active Site Helix-to-Strand Conversion of CxxxxC Peroxiredoxin Q Enzymes. *Biochemistry* 51, 7638–7650.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Williams, J.R., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2013). The Sensitive Balance between the Fully Folded and Locally Unfolded Conformations of a Model Peroxiredoxin. *Biochemistry* 52, 8708–8721.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–445.
- Perkins, A., Parsonage, D., Nelson, K.J., Ogbu, O.M., Cheong, P.H.-Y., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2016). Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure* 24, 1668–1678.
- Peskin, A.V., Low, F.M., Paton, L.N., Maghzal, G.J., Hampton, M.B., and Winterbourn, C.C. (2007). The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *J. Biol. Chem.* 282, 11885–11892.
- Peskin, A.V., Dickerhof, N., Poynton, R.A., Paton, L.N., Pace, P.E., Hampton, M.B., and Winterbourn, C.C. (2013). Hyperoxidation of Peroxiredoxins 2 and 3: RATE CONSTANTS FOR THE REACTIONS OF THE SULFENIC ACID OF THE PEROXIDATIC CYSTEINE. *J. Biol. Chem.* 288, 14170–14177.
- Pillay, C.S., Hofmeyr, J.-H.S., Olivier, B.G., Snoep, J.L., and Rohwer, J.M. (2009). Enzymes or redox couples? The kinetics of thioredoxin and glutaredoxin reactions in a systems biology context. *Biochem. J.* 417, 269–277.
- Portillo-Ledesma, S., Randall, L.M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P.A., Poole, L.B., Denicola, A., and Ferrer-Sueta, G. (2018). Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry* 57, 3416–3424.
- Prolo, C., Álvarez, M.N., and Radi, R. (2014). Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens: Peroxynitrite in Pathogen Invasion. *BioFactors* 40, 215–225.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., and Lunardi, J. (2002). Proteomics Analysis of Cellular Response to Oxidative Stress: EVIDENCE FOR *IN VIVO* OXIDATION OF PEROXIREDOXINS AT THEIR ACTIVE SITE. *J. Biol.*

Chem. 277, 19396–19401.

Rahuel-Clermont, S., Bchini, R., Barbe, S., Boutserin, S., André, I., and Talfournier, F. (2019). Enzyme Active Site Loop Revealed as a Gatekeeper for Cofactor Flip by Targeted Molecular Dynamics Simulations and FRET-Based Kinetics. *ACS Catal.* 9, 1337–1346.

Randall, L.M., Dalla Rizza, J., Parsonage, D., Santos, J., Mehl, R.A., Lowther, W.T., Poole, L.B., and Denicola, A. (2019). Unraveling the effects of peroxiredoxin 2 nitration; role of C-terminal tyrosine 193. *Free Radic. Biol. Med.* 141, 492–501.

Reddie, K.G., and Carroll, K.S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 746–754.

Reyes, A.M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011). Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 464–473.

Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., and Woo, H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17, 183–189.

Rouhier, N., Gelhaye, E., Corbier, C., and Jacquot, J.P. (2004). Active site mutagenesis and phospholipid hydroperoxide reductase activity of poplar type II peroxiredoxin. *Physiol. Plant.* 120, 57–62.

Roussel, X., Béchade, G., Kriznik, A., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., Branlant, G., and Rahuel-Clermont, S. (2008). Evidence for the Formation of a Covalent Thiosulfinate Intermediate with Peroxiredoxin in the Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* 283, 22371–22382.

Roussel, X., Kriznik, A., Richard, C., Rahuel-Clermont, S., and Branlant, G. (2009). Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* Passes through an Oxidized Disulfide Sulfiredoxin Intermediate That Is Reduced by Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 284, 33048–33055.

Saccoccia, F., Di Micco, P., Boumis, G., Brunori, M., Koutris, I., Miele, A.E., Morea, V., Sriratana, P., Williams, D.L., Bellelli, A., et al. (2012). Moonlighting by Different Stressors: Crystal Structure of the Chaperone Species of a 2-Cys Peroxiredoxin. *Structure* 20, 429–439.

Sakamoto, T., Maebayashi, K., Nakagawa, Y., and Imai, H. (2014). Deletion of the four phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes accelerates aging in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* 19, 778–792.

Smeets, A., Marchand, C., Linard, D., Knoop, B., and Declercq, J.-P. (2008). The crystal structures of oxidized forms of human peroxiredoxin 5 with an intramolecular disulfide bond confirm the proposed enzymatic mechanism for atypical 2-Cys peroxiredoxins. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 98–104.

Sobotta, M.C., Liou, W., Stöcker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., Scharf, A.N.D., and Dick, T.P. (2015). Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat. Chem. Biol.* 11, 64–70.

Soito, L., Williamson, C., Knutson, S.T., Fetrow, J.S., Poole, L.B., and Nelson, K.J. (2011). PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* 39, D332–D337.

Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., and Dick, T.P. (2018). The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 558–573.

- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- Tairum, C.A., de Oliveira, M.A., Horta, B.B., Zara, F.J., and Netto, L.E.S. (2012). Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. *J. Mol. Biol.* **424**, 28–41.
- Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2002). A Comparative Study on the Hydroperoxide and Thiol Specificity of the Glutathione Peroxidase Family and Selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* **277**, 41254–41258.
- Tanaka, T., Izawa, S., and Inoue, Y. (2005). *GPX2*, Encoding a Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Homologue, Codes for an Atypical 2-Cys Peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 42078–42087.
- Tanner, J.J., Parsons, Z.D., Cummings, A.H., Zhou, H., and Gates, K.S. (2011). Redox Regulation of Protein Tyrosine Phosphatases: Structural and Chemical Aspects. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 77–97.
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., Lemaire, S.D., and Rey, P. (2009). Regeneration Mechanisms of *Arabidopsis thaliana* Methionine Sulfoxide Reductases B by Glutaredoxins and Thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **284**, 18963–18971.
- Teixeira, F., Tse, E., Castro, H., Makepeace, K.A.T., Meinen, B.A., Borchers, C.H., Poole, L.B., Bardwell, J.C., Tomás, A.M., Southworth, D.R., et al. (2019). Chaperone activation and client binding of a 2-cysteine peroxiredoxin. *Nat. Commun.* **10**.
- Tobin, D.M., and Ramakrishnan, L. (2013). TB: the Yin and Yang of lipid mediators. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 641–645.
- Toledano, M.B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**, 351–357.
- Trindade, D.F., Cerchiaro, G., and Augusto, O. (2006). A Role for Peroxymonocarbonate in the Stimulation of Biothiol Peroxidation by the Bicarbonate/Carbon Dioxide Pair. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1475–1482.
- Truzzi, D.R., Coelho, F.R., Paviani, V., Alves, S.V., Netto, L.E.S., and Augusto, O. (2019). The bicarbonate/carbon dioxide pair increases hydrogen peroxide-mediated hyperoxidation of human peroxiredoxin 1. *J. Biol. Chem.* jbc.RA119.008825.
- Turner-Ivey, B., Manevich, Y., Schulte, J., Kistner-Griffin, E., Jezierska-Drutel, A., Liu, Y., and Neumann, C.A. (2013). Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer. *Oncogene* **32**, 5302–5314.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40.
- Van Raamsdonk, J.M., and Hekimi, S. (2012). Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5785–5790.
- Vazquez, D.S., Zeida, A., Agudelo, W.A., Montes, M.R., Ferrer-Sueta, G., and Santos, J. (2020). Exploring the conformational transition between the fully folded and locally unfolded substates of *Escherichia coli* thiol peroxidase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10.1039.D0CP00140F**.
- Veal, E., Jackson, T., and Latimer, H. (2018). Role/s of ‘Antioxidant’ Enzymes in Ageing. In *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, J.R. Harris, and V.I. Korolchuk, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 425–450.
- Veal, E.A., Underwood, Z.E., Tomalin, L.E., Morgan, B.A., and Pillay, C.S. (2017). Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid. Redox Signal.*

- Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M.B., and Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8875–8880.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928.
- Watanabe, T., and Nakamura, T. (1979). The Effects of Linoleate Hydroperoxide on Respiration and Oxidative Phosphorylation of Rat Liver Mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 86, 1041–1047.
- West, J., Roston, T., David, J., Allan, K., and Loberg, M. (2018). Piecing Together How Peroxiredoxins Maintain Genomic Stability. *Antioxidants* 7, 177.
- Winterbourn, C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278–286.
- Winterbourn, C.C. (2013). The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 3–25.
- Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 549–561.
- Winterbourn, C.C., and Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 322–328.
- Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2017). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophys. J.* 12.
- Woo, H.A., Won Kang, S., Kim, H.K., Yang, K.-S., Chae, H.Z., and Rhee, S.G. (2003). Reversible Oxidation of the Active Site Cysteine of Peroxiredoxins to Cysteine Sulfinic Acid: IMMUNOBLOT DETECTION WITH ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE HYPEROXIDIZED CYSTEINE-CONTAINING SEQUENCE. *J. Biol. Chem.* 278, 47361–47364.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., and Poole, L.B. (2003a). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2003b). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653.
- Yewdall, N.A., Venugopal, H., Desfosses, A., Abrishami, V., Yosaatmadja, Y., Hampton, M.B., Gerrard, J.A., Goldstone, D.C., Mitra, A.K., and Radjainia, M. (2016). Structures of Human Peroxiredoxin 3 Suggest Self-Chaperoning Assembly that Maintains Catalytic State. *Structure* 24, 1120–1129.
- Zeida, A., Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Denicola, A., Estrin, D.A., and Radi, R. (2019). Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols: Focus Review. *Chem. Rev.* [acs.chemrev.9b00371](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00371).

Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin Sulfinylation

Alexandre Kriznik, Marouane Libiad, Hélène Le Cordier, Samia Boukhenouna, Michel B. Toledano,
and Sophie Rahuel-Clermont*

Cite This: *ACS Catal.* 2020, 10, 3326–3339

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

SI Supporting Information

ABSTRACT: Peroxiredoxins from the Prx1 subfamily (Prx) are moonlighting peroxidases that operate in peroxide signaling and are regulated by sulfinylation. Prxs offer a major model of protein–thiol oxidative modification. They react with H_2O_2 to form a sulfenic acid intermediate that either engages into a disulfide bond, committing the enzyme into its peroxidase cycle, or again reacts with peroxide to produce a sulfonic acid that inactivates the enzyme. Sensitivity to sulfinylation depends on the kinetics of these two competing reactions and is critically influenced by a structural transition from a fully folded (FF) to locally unfolded (LU) conformation. Analysis of the reaction of the Tsa1 *Saccharomyces cerevisiae* Prx with H_2O_2 by Trp fluorescence-based rapid kinetics revealed a process linked to the FF/LU transition that is kinetically distinct from disulfide formation and suggested that sulfenylate formation facilitates local unfolding. Use of mutants of distinctive sensitivities and of different peroxide substrates showed that sulfinylation sensitivity is not coupled to the resolving step kinetics but depends only on the sulfenic acid oxidation and FF-to-LU transition rate constants. In addition, stabilization of the active site FF conformation, the determinant of sulfinylation kinetics, is only moderately influenced by the Prx C-terminal tail dynamics that determine the FF $\rightarrow$ LU kinetics. From these two parameters, the relative sensitivities of Prxs toward hyperoxidation with different substrates can be predicted, as confirmed by in vitro and in vivo patterns of sulfinylation.

KEYWORDS: enzyme, thiol peroxidase, sulfenic acid, sulfinic acid, redox regulation, conformational transition, rapid kinetics

■ INTRODUCTION

Sulfenylation of cysteine (Cys) thiolate is increasingly recognized as important in cell regulation and signaling.¹ Eukaryotic peroxiredoxins (Prxs) from the Prx1 subfamily are thiol peroxidases and the first enzyme family shown to be regulated by reversible Cys sulfenylation, an hitherto thought irreversible oxidative modification that coevolved with the sulfenic acid reductase sulfiredoxin (Srx).^{2–5} Prxs are major peroxide-reducing enzymes, reacting with substrates by attack of a peroxidatic Cys C_P that becomes sulfenylated (C_P–SOH). In the peroxidatic cycle, the C_P–SOH condenses with the enzyme resolving Cys C_R to form a disulfide bond, the reduction of which by thioredoxin (Trx) completes the cycle (Figure 1a). Alternatively, the C_P–SOH can react with a second peroxide molecule to form a sulfenic acid (C_P–SO₂H), which inactivates the enzyme. Prxs inactivation by sulfenylation (also referred to as hyperoxidation) is thought as critical for allowing unimpeded H₂O₂ cell signaling, as if active, they would, by their high abundance and high substrate reactivity, quench the H₂O₂ signal.^{3,6} For instance, an Srx-dependent 24 h rhythmic sulfenylation of Prx3 occurs in mammalian mitochondria, which fosters H₂O₂ mitochondrial buildup and rhythmic cytosolic release, thereby contributing to establish the circadian nature of corticosteroid secretion.⁷ As a major target of Trx, Prx sulfenylation serves to free the function of Trx

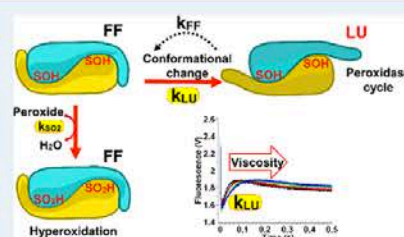
to other targets during severe oxidative stress.⁸ Prx sulfinylation also provides a gain of function by stabilizing its oligomeric structure, thereby switching it into a molecular chaperone⁹ or fostering protein interactions.¹⁰

Prokaryotic Prxs are resistant to hyperoxidation, whereas eukaryotic ones, especially the Prx1 subfamily, are sensitive.³ Further, within sensitive Prxs, a large range of sulfinylation sensitivity levels exists, as for instance the higher sensitivity of human Prx2 relative to Prx1 and Prx3.^{11,12} These differences may indicate differential enzyme regulation depending on the concentration of H₂O₂.¹³ Karplus and collaborators identified structural signatures that distinguish hyperoxidation-sensitive Prxs from the resistant ones, one of which is a Tyr-Phe motif located in the C-terminal helix, and proposed a mechanistic model of how these features generate sensitivity³ (Figure 1). Prxs are obligate symmetrical homodimers in which both subunits contribute to the assembly of each of the two active sites by providing either the C_p or the C-terminal tail-C_R to one site (Figure 1b). In the Karplus model, reduced Prx exists

Received: October 16, 2019

Revised: January 14, 2020

Published: January 31, 2020



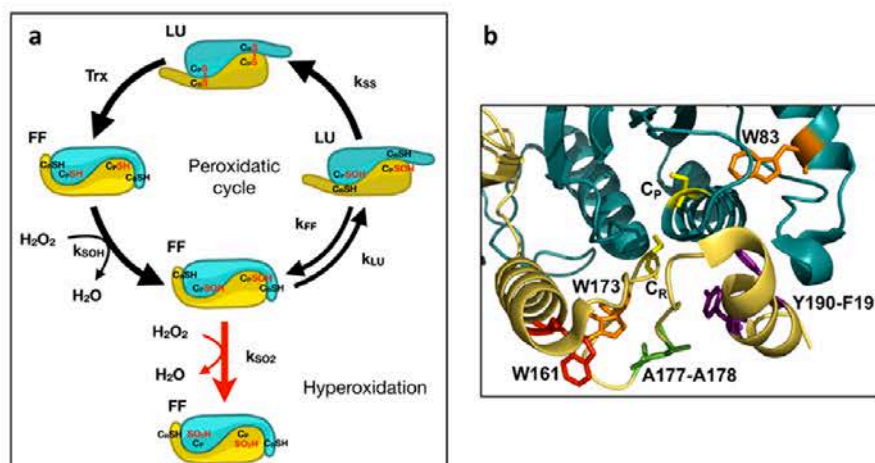


Figure 1. (a) Prx1 catalytic cycle. The Prx1 peroxidase cycle and hyperoxidation mechanism are shown at the level of the Prx1 dimeric unit to highlight the conformational state [fully folded (FF) and locally unfolded (LU)] of the active site identified by the peroxidatic Cys C_P and C-terminal tail identified by resolving Cys C_R . The rate constants of peroxide reduction k_{SOH} , sulfinylation k_{SO_2} , resolution k_{SS} , and FF–LU transition k_{FF} and k_{LU} are indicated. (b) Zoom into the catalytic site of Tsa1. The subunit containing the C_P is shown in blue, and the subunit containing the C_R is shown in yellow (PDB code 3SBC). Residues C_P and C_R are shown in yellow, W83 and W173 in orange, and W161 in red. Within the C-terminal tail, residues A177 and A178 are highlighted in green and the Y190–F191 motif in purple.

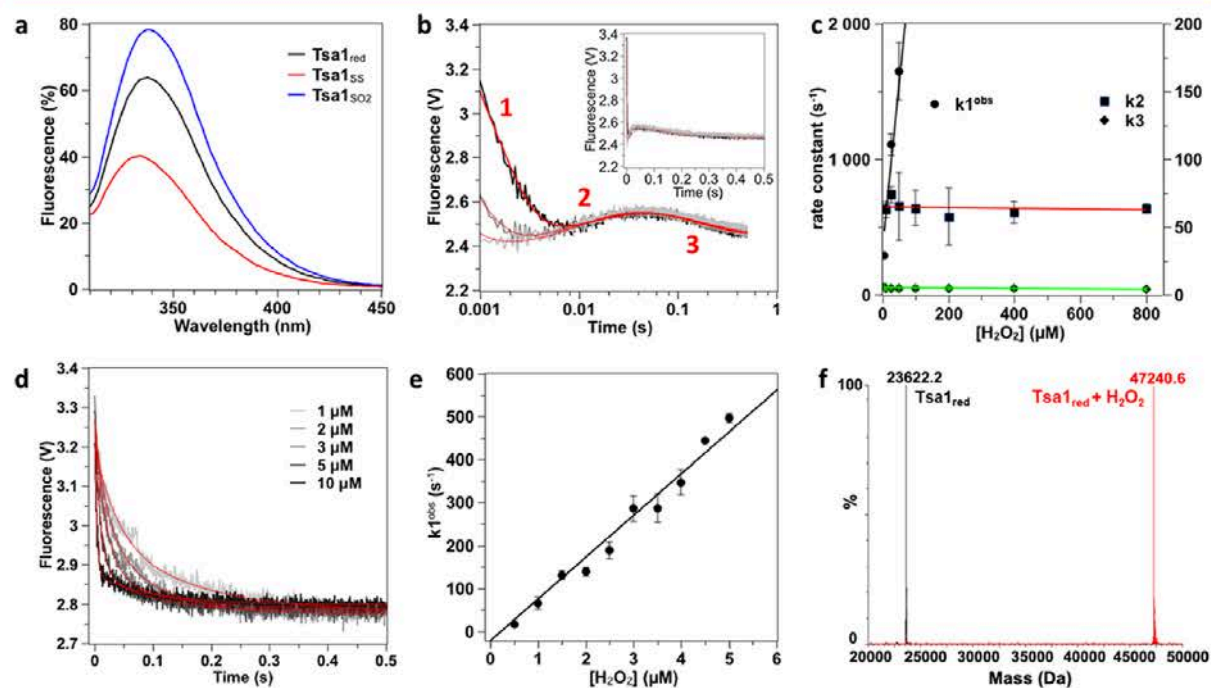


Figure 2. Wild-type Tsa1 oxidizes H_2O_2 by three-phase kinetics. (a) Trp fluorescence emission spectra of reduced (black), disulfide (red), and hyperoxidized (blue) Tsa1 ($2 \mu M$) after excitation at 295 nm. (b) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 ($5 \mu M$) with H_2O_2 ($10 \mu M$, light gray; $25 \mu M$, gray; and $50 \mu M$, black) monitored by Trp fluorescence. The excitation wavelength is set at 295 nm, and the signal is collected above 320 nm. The time courses are shown in log time scale to highlight the three phases and fitted against a three-exponential equation (red lines). In the inset, time courses are shown in linear X-scale. Each curve is the average of six runs. (c) Second-order plots and linear fits of the observed rate constants k_1^{obs} (circles, black line), k_2 (squares, red line), and k_3 (diamond, green line) vs H_2O_2 concentration. Very similar results were obtained using the untagged native Tsa1, showing that the N-terminal His tag has no impact on Tsa1 catalysis. (d) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 ($0.5 \mu M$) with low H_2O_2 concentrations (from 0.5 to $5 \mu M$) monitored by Trp fluorescence. Only phases 1 and 3 are observable in these conditions. Each trace is the average of six runs and is fitted according to a biphasic equation (red line). (e) Precise determination of k_1 by a second-order plot and linear fit of the fast phase rate constants k_1^{obs} measured in (d). (f) Superimposed deconvoluted mass spectra of the Tsa1 redox species before and after 5 s reaction with $10 \mu M H_2O_2$ followed by acid quenching.

Table 1. Steady-State, Pre-Steady-State, and Hyperoxidation Kinetics Parameters of Wild-Type and Mutant Tsa1 with H₂O₂

Tsa1	H ₂ O ₂				
	Tsa1 ^{Y190G F191G}	Tsa1 ^{A177S A178D}	wild-type		Tsa1 ^{W161F}
$k_{\text{apparent}}^{\text{steady-state}}$ (s ⁻¹)	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2	global fit	2.8 ± 0.5
$C_{\text{hyp1\%}}$ (μM)	X	2620 ± 220	730 ± 100		440 ± 90
k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.7 × 10 ^{7a}	(4 ± 1.4) × 10 ⁷	(9.7 ± 0.4) × 10 ⁷	k_{SOH}	(1.0 ± 0.01) × 10 ⁸
k_2 (s ⁻¹)		216 ± 41	64 ± 5	k_{LU}	65 ± 1
k_3 (s ⁻¹)	3 ± 0.1	5.3 ± 0.6	4.6 ± 0.3	k_{SS}	5.8 ± 0.1
k_4 (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b	0	(1.0 ± 0.4) × 10 ³	(2.1 ± 0.2) × 10 ³	k_{SO_2}	(2.9 ± 0.1) × 10 ³

^aUp to 50 μM. ^bMeasured on C171A mutants. Data are reported as the mean value obtained from two independent experiments performed on distinct protein productions ± standard deviation (s.d.).

in a fully folded (FF) conformation that stabilizes an active site, endowing C_p with extraordinary H₂O₂ reactivity. A conformational transition from the FF to a locally unfolded (LU) state, in which the helix carrying C_p and the enzyme C-terminal tail partially unfold, enables C_p–SOH and C_R condensation into a disulfide bond. When the enzyme is in the FF state, however, the C_p–SOH can further react with H₂O₂ to generate sulfinic acid. Enzyme sulfinylation and the conformational FF–LU transition equilibrium appear positioned as two reciprocally exclusive competing events. In this model, the Tyr-Phe C-terminal helix motif, by stabilizing to the FF conformation, generates sulfinylation sensitivity^{3,14–16} (Figure 1b).

Kinetic and mass spectrometry-based evaluation of Prx intrinsic hyperoxidation sensitivity has so far relied on the hypothesis that the FF–LU transition is in rapid equilibrium, that is, that the FF → LU and LU → FF processes occur much faster than the resolving and hyperoxidation steps.^{11,12} A steady-state sensitivity index $C_{\text{hyp1\%}}$, defined as the concentration of H₂O₂ required to oxidize 1% of the sites in one enzyme catalytic cycle, has been derived from the above mechanistic model as a function of the kinetic rate constants of the disulfide formation step, k_{SS} ; the hyperoxidation step, k_{SO_2} ; and the FF–LU equilibrium constant K_{LU} ¹⁷ (Figure 1a). These methods enabled the identification of other structural determinants of hyperoxidation sensitivity in the C-terminal tail, in the C_p environment and in the dimer–dimer interface.^{18–20} In addition, pre-steady-state analyses using rapid kinetic approaches allowed resolution of the Prx catalytic steps for sulfinic acid and disulfide formation^{13,21,22} and, recently, for hyperoxidation.¹² However, assessing nonchemical steps within a catalytic cycle is challenging, and thus few studies have provided direct information on FF → LU and LU → FF transition kinetics,²³ which is critical to understand the origin of Prx sulfinylation sensitivity.

We address here the hyperoxidation mechanism of the major *Saccharomyces cerevisiae* Prx1-type enzyme Tsa1 by pre-steady-state and steady-state kinetics using Trp fluorescence, circular dichroism (CD), and in vivo analysis. The reaction of Tsa1 with peroxides monitored in single turnover using a stopped-flow apparatus showed multiphasic kinetics, of which one is kinetically distinct from the resolving step and can be assigned to a conformation change associated with the FF–LU transition, thus suggesting that the FF–LU transition does not fulfill the proposed rapid equilibrium hypothesis. Using this approach, mutants of distinctive sensitivities, and the comparison of H₂O₂ and organic peroxide substrates, we established that hyperoxidation sensitivity is independent of the resolving step kinetics, allowing us to refine the

hyperoxidation index $C_{\text{hyp1\%}}$, which in fact appears to only depend on the sulfinylation and FF-to-LU transition rate constants. Our results also suggest that the molecular determinants that control each of these two parameters are distinct. We now can calculate $C_{\text{hyp1\%}}$, a critical parameter for in vivo modeling of redox regulation. Understanding the sulfinylation mechanism is also relevant in view of the recently discovered new sulfiredoxin sulfinylated substrates.¹

RESULTS

Disulfide Bond Formation Is Kinetically Resolved from a Conformational Process in Tsa1 Peroxidase Cycle.

To kinetically resolve the catalytic steps, the reaction of Tsa1 with H₂O₂ was explored by monitoring the change of enzyme Trp fluorescence over time under single turnover conditions in the absence of Trx. Tsa1 contains three Trp residues, one located close to the active site (W83), another in helix α5 preceding the C-terminal tail (W161), and the last in the C-terminal tail close to the resolving Cys (W173) (Figure 1b). The intrinsic sensitivity of Trp fluorescence to alterations of the redox state of Tsa1, with 62 and 124% emission change for the C_p–C_R disulfide (Tsa1_{SS}) and hyperoxidized (Tsa1_{SO₂}) forms, respectively, relative to the reduced enzyme (Tsa1_{red}), provided a powerful reaction-monitoring probe (Figure 2a). The reaction of Tsa1 (5 μM) with H₂O₂ generated three-exponential kinetics, fast (phase 1) and slow (phase 3) ones, both displaying a decrease in fluorescence, which flanked the remaining one (phase 2) characterized by a fluorescence increase (Figure 2b). At lower amounts of Tsa1 and H₂O₂, the phase 1 rate constant appeared linearly dependent on the H₂O₂ concentration (Figure 2d,e), indicating a second-order, bimolecular process, which could thus correspond either to H₂O₂ binding, a process expected to be reversible, or to the irreversible Cys C_p attack on H₂O₂.²² However, the low y-intercept of the $k_1^{\text{obs}}/\text{H}_2\text{O}_2$ plot (Figure 2e), which implied an essentially irreversible process, and the absence of signal with the C_p to Ser mutant Tsa1^{C48S}, which indicated a requirement of C_p (Figure S1), suggest that the kinetic phase 1 reflects the C_p attack on H₂O₂ and concomitant C_p–SOH intermediate formation. The phase 1 second-order rate constant k_1 of $9.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1) fits previously reported values.²⁴ In contrast, phases 2 and 3 were characterized by H₂O₂-independent observed rate constants k_2 and k_3 , respectively (Figure 2c), and therefore reflect first-order, monomolecular events that do not directly involve H₂O₂ as a reactant. As a first approach to assign the second and third phases to mechanistic steps, we analyzed by mass spectrometry the nature of redox products obtained after completion of the reaction of reduced Tsa1 with 10 μM H₂O₂ (Figure 2f). Dimeric Tsa1_{SS} was by far

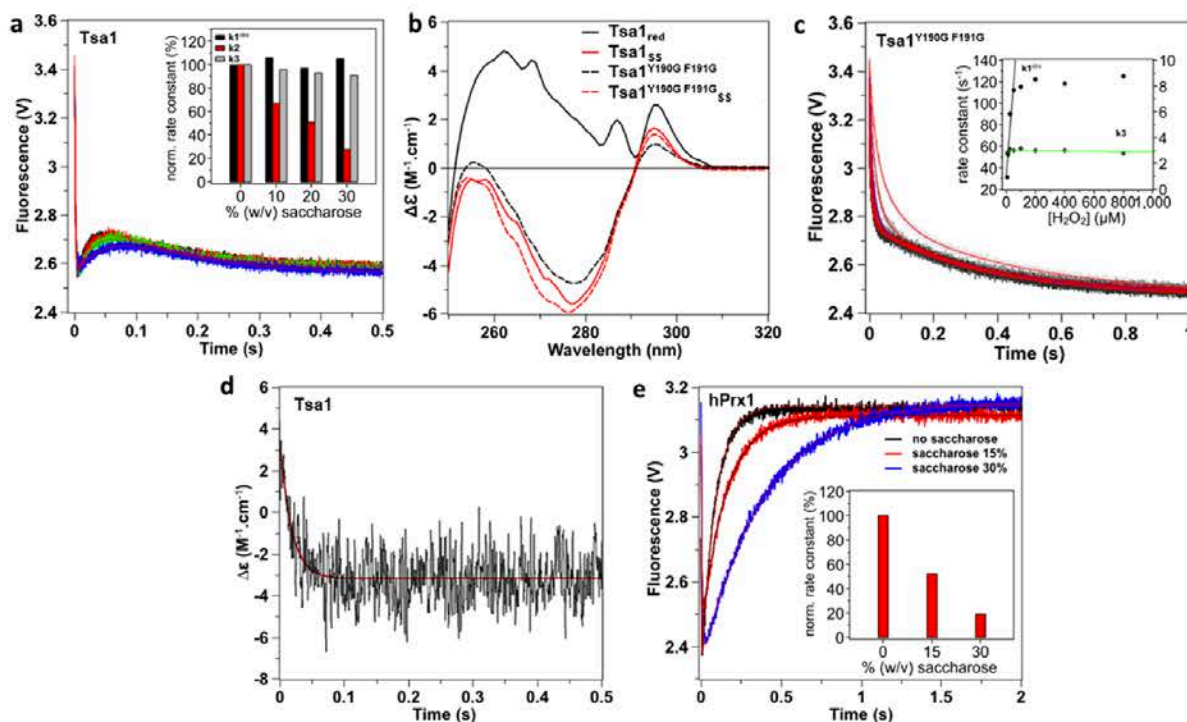


Figure 3. Attribution of phase 2 to a conformational transition. (a) Effect of saccharose (0% black, 10% red, 20% green, and 30% blue) on the reaction of Tsa1 (5 μ M) with H_2O_2 (10 μ M) monitored as in Figure 2, fitted against a three-exponential equation (red lines). Inset: effect of saccharose concentration on rate constants k_1^{obs} , k_2 , and k_3 normalized to 0% saccharose. The stopped-flow mixer efficiency in viscous solutions was established by mixing Trp and up to 30% saccharose, which showed no artifactual effects on the dilution kinetics (Figure S2). (b) Near-UV circular dichroism spectra of 50 μ M wild-type Tsa1 (plain) and Tsa1^{Y190G F191G} (dashed line) under the reduced (black) and disulfide (red) forms. Measurements were performed in a 1 cm cuvette in a phosphate 10 mM and NaF 100 mM buffer (pH 7) and are the average of three records. (c) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 (5 μ M) with H_2O_2 (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, and 800 μ M, light gray to black) monitored as in Figure 2, fitted against a biexponential equation (red lines). Inset: second-order plots and linear fits of the observed rate constants for the fast phase k_1^{obs} (circles, black line) and slow phase k_3 (diamond, green line). (d) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 (50 μ M) with H_2O_2 (100 μ M) monitored by a near-UV CD signal at 270 nm. The trace is the average of 50 runs, and the first-order fit is shown in red. (e) Effect of saccharose (0% black, 15% red, and 30% blue) on the reaction of human Prx1 (5 μ M) with H_2O_2 (10 μ M) monitored as in Figure 2 and fitted against a biexponential equation (red or black lines). Inset: effect of saccharose concentration on the rate constant of the increasing phase normalized to 0% saccharose.

the major species, thus indicating that no hyperoxidation occurred in these conditions. We thus hypothesized that phases 2 and 3, which are characterized by rate constants of 64 s^{-1} and k_3 of 4.6 s^{-1} (Table 1), reflect either a conformational change associated with the FF-to-LU transition or C_P – C_R disulfide formation.

To test whether phases 2 or 3 could be attributed to a conformational transition, we repeated the stopped-flow experiment in the presence of increasing concentration of saccharose, a viscogen expected to slow down protein motions without interfering with chemical processes.^{25,26} Conditions were chosen to ensure kinetic resolution of the three phases, that is, 5 μ M Tsa1 and 10 μ M H_2O_2 . The efficiency of the stopped-flow mixer in viscous solutions was verified by mixing Trp and up to 30% saccharose (Figure S2). As shown in Figure 3a, increasing saccharose from 0 to 30% significantly reduced k_2 by 75%, without altering k_1^{obs} and k_3 or only very slightly. Similar results were obtained with fructose or sorbitol as viscogen (Figure S3). To establish whether phase 2 corresponded to a conformational change linked to the FF-to-LU transition, we analyzed the behavior of the Y190G-F191G Tsa1 mutant (Tsa1^{Y190G F191G}), which is expected to exist

primarily in the LU conformation due to C-terminal α helix destabilization.³ The conformational state of the protein was first assessed by circular dichroism (Figure 3b). The spectrum of reduced Tsa1, which exists in the FF conformation,²⁴ exhibited three positive maxima at 262, 287, and 296 nm. The spectrum of Tsa1_{ss}, which adopts the LU conformation, exhibited a minimum at 277 nm and a positive maximum at 295 nm, thus showing much larger difference upon oxidation compared to human Prx1 (hPrx1) and human Prx2 (hPrx2).^{12,16} Further, the reduced Tsa1^{Y190G F191G} spectrum was similar to the Tsa1_{ss} one and only slightly altered upon H_2O_2 oxidation, which is consistent with the LU conformation, as previously observed for hPrx2.¹⁶ Similar results were obtained in the far-UV CD Tsa1 spectra (Figure S4). Kinetics of Tsa1^{Y190G F191G} oxidation by H_2O_2 revealed a biphasic profile, the first phase of which has a H_2O_2 -dependent rate constant k_1 of $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ up to 50 μ M, and then, it reaches a plateau at $\sim 120 \text{ s}^{-1}$, likely corresponding to C_P –SOH formation (Figure 3c). The second slower process was characterized by a fixed rate constant of $3.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ close to the k_3 value measured for the wild type (Figure 3c and Table 1). However, the viscogen-sensitive phase 2 was absent here,

strongly suggesting that in the wild-type enzyme this phase reflects a protein structural motion associated with the FF–LU transition.

To further support this conclusion, we independently monitored the FF–LU transition using the large near-UV CD signal change observed between Tsa1 and Tsa1_{SS} at 270 nm. The low sensitivity of the CD signal in stopped-flow mode required use of 50 μ M wild type reduced Tsa1 and 100 μ M H₂O₂, which prevented visualizing the first phase of predicted very fast observed rate constant of 10^4 s^{−1}. Under these conditions, the near-UV CD-monitored reaction obeyed monophasic kinetics characterized by a rate constant of 54 ± 2 s^{−1} close to the k_2 value of 64 s^{−1} measured using Trp fluorescence, thus suggesting that the same process is monitored (Figure 3d). Overall, these data support that phase 2 reflects a conformation change linked to the FF–LU transition. Since dimeric Tsa1_{SS} is the final product of the reaction in these conditions (Figure 2f), phase 3 must then correspond to the formation of the C_P–C_R disulfide bond.

To extend these results, we compared the kinetics of H₂O₂ reduction of human Prx1 (hPrx1) and Tsa1 by Trp fluorescence. The hPrx1 reaction with 10 μ M H₂O₂ obeyed biphasic kinetics (Figure 3e) as reported,¹² which consists in a fast decreasing phase equivalent to Tsa1 phase 1 (sulfenic acid formation) and a second increasing phase of rate constant 10.8 s^{−1} previously attributed to C_P–C_R disulfide formation.¹² The latter rate constant value was strongly dependent on saccharose concentration, indicating that, as for Tsa1, the kinetics of this phase is at least in part controlled by a process associated with a conformation change (Figure 3e, inset). Thus, in contrast to Tsa1, the hPrx1 FF–LU associated process and disulfide bond formation are not resolved and hPrx1 phase 2 thus kinetically reflects the conformational event.

Tsa1 Hyperoxidation Sensitivity and Conformation Change Kinetics Are Correlated. To correlate the kinetics of the above individual events with the sensitivity to hyperoxidation, we used the method developed by Nelson,¹⁷ which provides a measure of the hyperoxidation sensitivity index $C_{\text{hyp}1\%}$ from the fraction of hyperoxidized enzyme per catalytic cycle in multiple turnover conditions, that is, in the steady state in the presence of the Trx system. Deviation from linear kinetics resulting from enzyme oxidative inactivation is monitored here by the consumption of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm in a NADPH/Tsa1/Trx/Trx reductase coupled assay (Figure 4a). As shown previously,¹⁷ the deduced rate constant of inactivation normalized to the peroxidase turnover rate constant (f_{inact}) was linearly dependent on H₂O₂ concentration, yielding a slope value that reflected the sensitivity to hyperoxidation (Figure 4b) and provided the $C_{\text{hyp}1\%}$ value, that is, the concentration of H₂O₂ required to hyperoxidize 1% of sites in one cycle. For hPrx1, we measured a $C_{\text{hyp}1\%}$ of 80 μ M, in good correlation with the reported value of 62 μ M.¹⁷ Surprisingly, Tsa1 appeared 9-fold less sensitive than hPrx1 (Figure 4b), with a $C_{\text{hyp}1\%}$ of 730 μ M (Table 1).

To identify mechanistic determinants of hyperoxidation sensitivity, we designed Tsa1 mutations located close to the C-terminal region that are expected to alter $C_{\text{hyp}1\%}$. The W161F mutant (Tsa1^{W161F}) modifies the C-terminus of helix $\alpha 5$. The A177S–A178D mutant (Tsa1^{A177S A178D}) replaces some known determinants of $C_{\text{hyp}1\%}$ by the residues present at the same location in hPrx1,¹⁹ and the above-mentioned Tsa1^{Y190G F191G} adopts mostly the LU conformation (Figures 1b and 3b). All

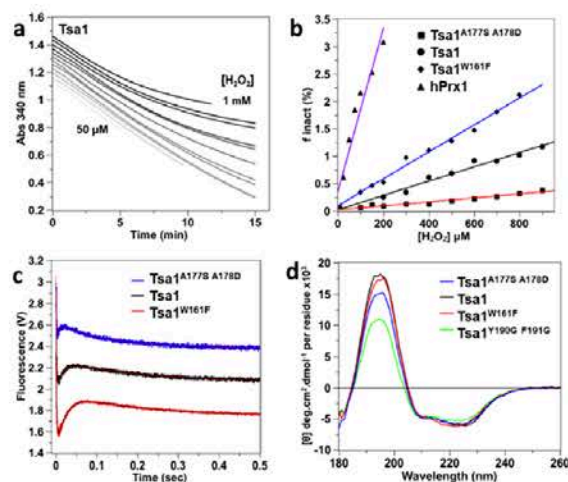


Figure 4. Steady-state hyperoxidation sensitivity of wild-type and mutant Tsa1 with H₂O₂. (a) Steady-state kinetics for the determination of hyperoxidation sensitivity of Tsa1 monitored by consumption of NADPH (200 μ M) at 340 nm in the presence of thioredoxin reductase (0.25 μ M), Trx (5 μ M), Tsa1 (1 μ M), and variable amounts of H₂O₂ (from 50, 100, 150, 200, 300, etc. to 1 mM) in TK buffer. The time courses have been shifted on the y axis for clarity. (b) Secondary plot of the inactivated fraction f_{inact} per turnover deduced from (a) vs H₂O₂ concentration. The hyperoxidation index $C_{\text{hyp}1\%}$ is deduced from the slope of the linear fit for wild type (black circles, black line fit), mutants Tsa1^{W161F} (black diamonds, blue line fit) and Tsa1^{A177S A178D} (black squares, red line fit), and hPrx1 (black triangles, purple line fit). Data are the mean of two independent experiments. (c) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1^{A177S A178D}, Tsa1, or Tsa1^{W161F} (5 μ M, top to bottom) with H₂O₂ (10 μ M) monitored by Trp fluorescence as in Figure 2b, fitted against a three-exponential equation (red or black line). Time courses have been shifted on the y axis for clarity. (d) Far-UV CD spectra of 5 μ M Tsa1 (black), Tsa1^{W161F} (red), Tsa1^{A177S A178D} (blue), and Tsa1^{Y190G F191G} (green) under the reduced state. Measurements were performed in a 0.01 cm flat cell in phosphate (10 mM) NaF (100 mM) buffer (pH 7) and are the average of three records.

mutants had wild-type peroxidase activity, reducing H₂O₂ with a steady-state rate constant of ca. 2.4 – 2.8 s^{−1} (Table 1). Tsa1^{Y190G F191G} was not sensitive to hyperoxidation (Figure S5), as expected, whereas Tsa1^{W161F} and Tsa1^{A177S A178D} were more and less sensitive than the wild type, with $C_{\text{hyp}1\%}$ of 440 and 2620 μ M, respectively (Figure 4b and Table 1). Under single turnover conditions, these two mutants obeyed triphasic kinetics (Figure 4c), with rate constants k_1 of 6.7×10^7 and 4×10^7 M^{−1} s^{−1} and k_3 of 7.0 and 5.3 s^{−1}, respectively, close to the wild type (Table 1, Figures S6 and S7). In contrast, their k_2 were inversely correlated with hyperoxidation sensitivity, with values of 37 and 216 s^{−1} for Tsa1^{W161F} and Tsa1^{A177S A178D}, respectively, relative to the wild type (64 s^{−1}). In keeping with the $C_{\text{hyp}1\%}$ and k_2 correlation, as the most hyperoxidation-sensitive enzyme, hPrx1 yielded a k_2 of 10.2 s^{−1}. Further, the presence of saccharose caused changes of Tsa1 mutant kinetics similar to those seen with wild type, supporting that phase 2 indeed identifies a conformational event also in both mutants (Figures S8 and S9). In addition, the far-UV CD spectra of reduced Tsa1^{W161F} had a wild-type profile, whereas Tsa1^{A177S A178D} displayed an intermediate signature between the FF and LU conformations, which suggested displacement of the equilibrium toward the LU

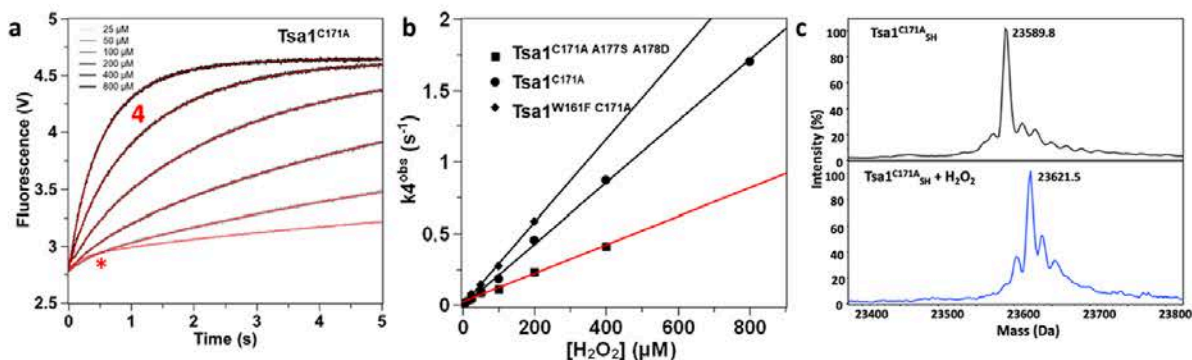


Figure 5. Direct observation of hyperoxidation kinetics with C171A mutants. (a) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1^{C171A} (5 μM) with H₂O₂ (25, 50, 100, 200, 400, and 800 μM as indicated) monitored by Trp fluorescence, fitted against a biexponential equation (red lines). Phase 4 is labeled. The * indicates a small, faster phase that is not attributed. (b) Second-order plot and linear fit of the slow phase observed rate constant k_4^{obs} (deduced from panel (a) fits) against H₂O₂ concentration, for Tsa1^{C171A} (black circles, black fit), Tsa1^{W161F C171A} (black diamonds, black fit), and Tsa1^{C171A A177S A178D} (black squares, red fit). (c) Deconvoluted mass spectra of the Tsa1^{C171A} redox species before and after 5 s reaction with 200 μM H₂O₂, followed by acid quenching.

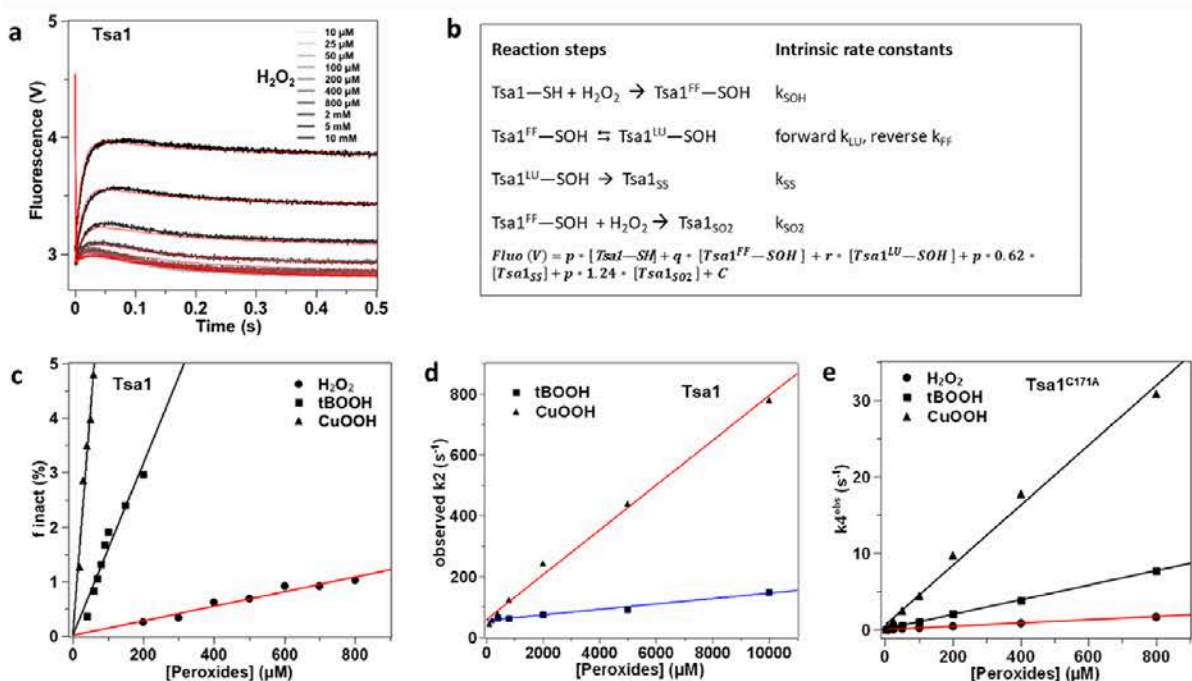


Figure 6. Kinetic integration of all mechanistic steps. (a) Pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 (5 μM) with increasing H₂O₂ as indicated, monitored by Trp fluorescence as in Figure 2b. The data are globally fitted (red lines) using Kintek Explorer software and the model and equation shown in (b). It must be noted that k_{LU} and k_{SS} behaved as dependent parameters in the fit, although the concordance between k_{LU} and the value deduced from CD monitoring (65 vs 54 s⁻¹) validated the global fit results. (b) Kinetic model and equation used for Tsa1 reaction global fitting. Fluorescence intensity factors for Tsa1_{SS} and Tsa1_{SO2} were fixed at 62 and 124% of the Tsa1-SH value (p) (based on Figure 2a) and intensity factors for Tsa1^{FF}-SOH (q) and Tsa1^{LU}-SOH (r) were fit to 63 and 66% of the Tsa1-SH (p) value, respectively. The k_{SOH} was fixed at the k_1 value ($9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) measured at low Tsa1 concentration in Figure 2d,e. The parameter C was adjusted to account for the background fluorescence. The fit was not improved by fitting individual background values for each H₂O₂ concentration. (c) Secondary plot and linear fit of the Tsa1 inactivated fraction per turnover f_{inact} with $t\text{BOOH}$ (squares, deduced from Figure S12a, black fit) and CuOOH (triangle, deduced from Figure S12b, black fit), compared with H₂O₂ (black circles, red fit from Figure 4b). The hyperoxidation index $C_{\text{hyp1\%}}$ is deduced from the slope of the linear fits. Data are the mean of two independent experiments. (d) Second-order plots and linear fits of the observed rate constant k_2 vs peroxide concentration, deduced by fit of pre-steady-state kinetics for the reaction of Tsa1 (5 μM) with $t\text{BOOH}$ (squares, blue line) and CuOOH (triangles, red line) from Figure S13 against a three-exponential equation. (e) Determination of the rate constant k_4 for the Tsa1^{C171A} reaction with $t\text{BOOH}$ and CuOOH . Second-order plots and linear fits of the rate constant k_4^{obs} against peroxide concentration, obtained from pre-steady-state kinetics of the reaction with $t\text{BOOH}$ (squares, black fit) and CuOOH (triangle, black fit), compared to H₂O₂ (circles, red fit, from Figure 5b).

Table 2. Calculated and Experimental Hyperoxidation Sensitivity of Tsa1, Human Prxs, and AhpC

Prx	Tsa1 ^{A177S A178D}	Tsa1	Tsa1 ^{W161F}	Tsa1	Tsa1
peroxide	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	<i>t</i> BOOH	CuOOH
k_{LU} (s ⁻¹)	216 ± 42	64 ± 5	37 ± 1	59 ± 6	57 ± 5
k_4^a (M ⁻¹ s ⁻¹)	10 ³ ± 400	(2.1 × 10 ³) ± 200	(2.9 × 10 ³) ± 70	(9.5 × 10 ³) ± 200	(39 × 10 ³) ± 500
calculated C _{hyp1%} (μM)	2160 ± 1280	305 ± 53	128 ± 7	62 ± 8	16 ± 1
experimental C _{hyp1%} (μM)	2620 ± 220	730 ± 100	440 ± 93	63 ± 15	11 ± 2
Prx	hPrx1	hPrx1	hPrx2	hPrx3	AhpC
peroxide	H ₂ O ₂	ONOOH	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
k_{LU} (s ⁻¹)	10.8 ± 2	10.8 ± 2	0.2–0.6 ^{12,13,16}	20 ¹¹	>205 calculated
k_4^a (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.77 × 10 ³ ¹²	2.8 × 10 ⁵ ¹²	(1.73–1.97) × 10 ³ ^{12,16}	2 × 10 ³ estimated	410 ¹²
calculated C _{hyp1%} (μM)	61 ± 13	0.4	1–3	100	
experimental C _{hyp1%} (μM)	80 ± 5/50 ¹⁸		5 ¹⁸	127 ²⁷	>5000 ¹⁸

^aMeasured on C171A mutants. Data are reported as the mean value obtained from two independent experiments performed on distinct protein productions ± s.d.

conformation in the reduced state (Figure 4d). The inverse correlation seen between the sensitivity to hyperoxidation and the rate constant k_2 thus suggests a direct competition between hyperoxidation and the FF–LU conformational transition, also excluding an influence of the kinetics of C_P–C_R disulfide formation on the sensitivity to hyperoxidation.

Direct Assessment of the Kinetics of Tsa1 Hyperoxidation. To complete dissection of the hyperoxidation mechanism, we sought to assess the sulfinylation rate constant (Figure 1a). To directly measure this parameter, we used the Tsa1^{C171A} mutant, which, by lacking C_R, does not form the catalytic disulfide bond and thus could provide a means of isolating the reaction of H₂O₂ with the C_P–SOH intermediate. Upon reacting Tsa1^{C171A} with H₂O₂ (>25 μM) under single turnover conditions, Trp fluorescence increased during 5 s with a biphasic kinetics. Here, the reaction of H₂O₂ with C_P (phase 1) was too fast to be observed, since Tsa1^{C171A} has a wild-type reactivity toward H₂O₂ ($k_1 = 7.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Figure S10). The first phase of small amplitude had an H₂O₂-independent rate constant of 2–3 s⁻¹ and corresponds to a process that remains to be attributed. The second phase (phase 4) was slower, of larger but fixed amplitude, and had an H₂O₂-dependent rate constant k_4^{obs} , which indicated a bimolecular reaction involving H₂O₂, characterized by a second-order value of $2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1 and Figure 5a,b). Phase 4 suggested the occurrence of sulfinylation, based on its increasing fluorescence signal and on the increased fluorescence seen for sulfinylated Tsa1_{SO₂} (Figure 2a). Furthermore, mass spectrometry identified Tsa1^{C171A}_{SO₂} as the major redox species upon completion of a reaction with 200 μM H₂O₂ (Figure 5c). These data thus indicate that phase 4 reflects the Tsa1^{C171A}–SOH reaction with H₂O₂ that leads to enzyme hyperoxidation. The deduced rate constant of Tsa1^{C171A} hyperoxidation k_4 of $2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was in agreement with those obtained for human Prx1 and Prx2,¹² suggesting similar kinetics of hyperoxidation of Prx1-type Prxs from diverse origins. When combined to C171A, the W161F (Tsa1^{W161F C171A}) and A177S-A178D (Tsa1^{C171A A177S A178D}) Tsa1 mutants had a similar hyperoxidation behavior to Tsa1^{C171A}, characterized by rate constants k_4 of 2.9×10^3 and $1.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively (Figure 5b and Table 1).

High Peroxide Level or Reactivity Recapitulates the Full Hyperoxidation Mechanism. To integrate all kinetic steps within the full mechanism, we then used conditions that allow hyperoxidation in single turnover for the wild-type

enzyme to be observed. According to the hypothesis of a direct competition between hyperoxidation and the FF-to-LU transition, higher H₂O₂ concentrations should overcome the kinetic barrier of the conformation step, with phase 2 becoming a composite of the fluorescence signals of the two competing reactions. Tsa1 stopped-flow kinetic series were performed with increasing concentrations of H₂O₂, up to 10 mM. We observed that the phase 2 amplitude increased with H₂O₂, suggesting that this phase must at least in part incorporate an event generating a more fluorescent species, presumably the Tsa1_{SO₂} (Figure 6a). These data were globally fitted against a model (Figure 6a,b) based on the Prx catalytic cycle (Figure 1), which returned intrinsic k_{LU} , k_{SS} , and k_{SO_2} rate constants close to the k_2 , k_3 , and k_4 observed values, respectively, obtained by direct fitting (Table 1). This confirmed that the hyperoxidation rate constant k_4 obtained using the C171A mutants can be used as an estimate for k_{SO_2} . Furthermore, adding an additional step in which the Tsa1–SOH in the LU form reacts with H₂O₂ did not improve the fit, as expected. In addition, making the Tsa1–SOH LU-to-FF reaction reversible returned a very low rate constant value, k_{FF} , and did not improve the fit either. These data suggest that the rapid equilibrium hypothesis does not apply as they imply that, although intrinsically reversible, the Tsa1–SOH FF-to-LU transition nevertheless behaves as a quasi-irreversible process in the catalytic cycle.

To further assess this interpretation, simulations of the kinetics of Tsa1_{SO₂} formation were performed based on the model from Figure 6b and compared to the observed values (Figure S11). Combined with the results from CD and fluorescence-based kinetics, these simulations support that for the Tsa1^{FF}–SOH $\rightleftharpoons$ Tsa1^{LU}–SOH equilibrium, the forward and reverse rate constants are consistent with k_{LU} of 65 s⁻¹ and an upper k_{FF} value of 0.6 s⁻¹, respectively. Since the k_{LU} values are of comparable order of magnitude to those of the disulfide formation and hyperoxidation rate constants, these results support the notion that the rapid equilibrium hypothesis likely does not apply in this case.

Using alternate organic peroxide substrates with high reactivity should similarly impact hyperoxidation sensitivity by increasing the competition against the conformation step. We found that Tsa1 was much more sensitive to hyperoxidation by organic peroxides, with C_{hyp1%} of 63 μM for *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BOOH) and 11 μM for cumene

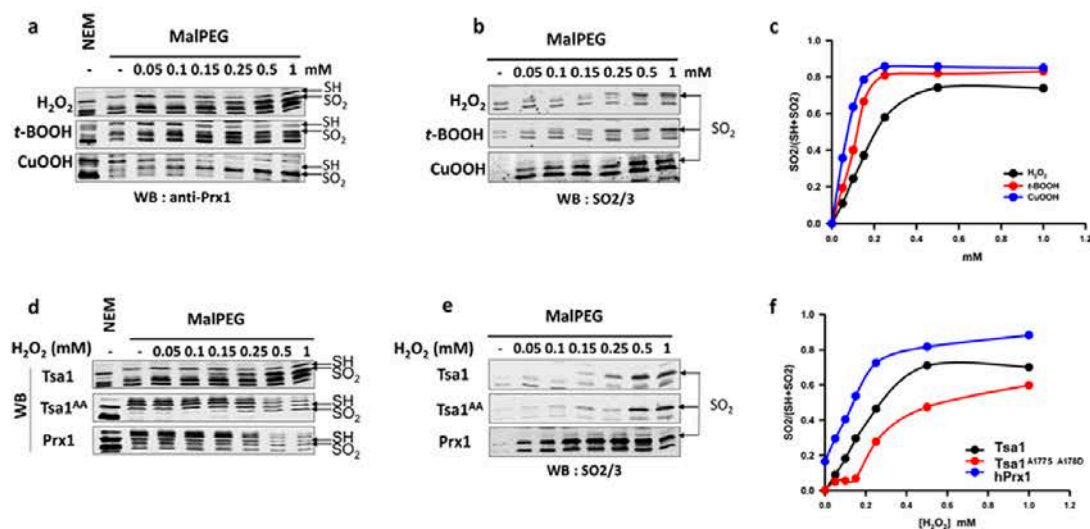


Figure 7. Hyperoxidation of wild-type and mutants Tsa1 with H_2O_2 and $t\text{BOOH}$ in *S. cerevisiae*. (a–c) Tsa1 is more reactive toward organic peroxides than with H_2O_2 in vivo. Tsa1 hyperoxidation in cells exposed to H_2O_2 , $t\text{BOOH}$, and CuOOH , during 5 min at the indicated concentrations. Thiols were derivatized by *N*-ethylmaleimide (NEM) or mPEG, as indicated, after reduction with dithiothreitol (DTT), as described in methods. (d–f) Comparison of the H_2O_2 reactivity of Prx1, Tsa1, and Tsa1^{A177S A178D} in vivo. Thiols were derivatized by NEM or mPEG, as indicated, after reduction with DTT, as described in methods, using cell lysates of Δtsa1 expressing human Prx1, Tsa1, or Tsa1^{A177S A178D} and exposed to H_2O_2 at the indicated concentration. (a, d) Western blot of reduced (–SH) ($2 \times$ mPEG) and hyperoxidized (–SO₂H) ($1 \times$ mPEG) forms of Tsa1 (indicated by black arrows), revealed with an anti-Prx1 antibody. (b, e) Western blot of the Prx SO₂H form using a Prx anti-SO₂/3 antibody and the cell lysates used in (a) and (c), respectively. (c, f) Quantification of the degree of oxidation (SO₂H/SH + SO₂H) vs peroxide concentration.

hydroperoxide (CuOOH), that is, 12- and 66-fold lower, respectively, relative to H_2O_2 (Figures 6c, S12a,b, and Table 2). As observed with H_2O_2 , Trp fluorescence monitoring of the reduction of $t\text{BOOH}$ by Tsa1 displayed a three-phase kinetics (Figure S13a), characterized by k_1 of $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ that remained much higher than the subsequent steps (Figure S13a, inset). Further, the saccharose-sensitive phase 2 could be assigned to the FF–LU-linked step (Figure S14a,b). Phase 2 amplitude increased with the $t\text{BOOH}$ concentration, likely due to the combination of the FF/LU event and the formation of Tsa1_{SO₂}, as observed for the H_2O_2 data set. If the two reactions were in competition, as in the proposed model, the observed rate constant for this phase should increase linearly with the peroxide concentration, with a slope corresponding to k_{SO_2} . The observed k_2 indeed increased linearly with the concentration of both $t\text{BOOH}$ and CuOOH , further supporting the direct competition mechanism (Figure 6d). Linear fit yielded y -intercept values of 59 and 57 s^{-1} , respectively, corresponding to k_{LU} , unchanged relative to H_2O_2 , and slopes of 8.8×10^3 and $7.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, corresponding to k_{SO_2} . In support of this interpretation, $t\text{BOOH}$ and CuOOH hyperoxidized Tsa1^{C171A} with rate constants k_4 of 9.5×10^3 and $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in the same range, respectively (Figure 6e and Table 2). Therefore, in addition to the enzyme intrinsic FF–LU transition kinetics, the hyperoxidation sensitivity is also a function of $\text{C}_p\text{–SOH}$ reactivity, that is, the hyperoxidation rate constant k_{SO_2} .

Integration of Kinetic Mechanism and Steady-State Hyperoxidation Sensitivity. Can we predict Prx hyperoxidation sensitivity based on kinetics rate constants? The method of Nelson¹⁷ measures $C_{\text{hyp1\%}}$ based on the assumption

that the FF–LU transition behaves as a rapid equilibrium in the catalytic cycle, but our results suggest that the Tsa1–SOH FF–LU transition does not fit the rapid equilibrium hypothesis. If this is true, the fraction of hyperoxidized enzyme per catalytic cycle f_{inact} can be defined as follows

$$f_{\text{inact}} = \frac{k_{\text{SO}_2}[\text{ROOH}][\text{Prx}^{\text{FF}}\text{–SOH}]}{k_{\text{SO}_2}[\text{ROOH}][\text{Prx}^{\text{FF}}\text{–SOH}] + k_{\text{LU}}[\text{Prx}^{\text{FF}}\text{–SOH}] - k_{\text{FF}}[\text{Prx}^{\text{LU}}\text{–SOH}]}$$

with ROOH standing for the peroxide substrate, $\text{Prx}^{\text{FF}}\text{–SOH}$ for the sulfenic acid intermediate in the FF conformation, and $\text{Prx}^{\text{LU}}\text{–SOH}$ for the sulfenic acid intermediate in the LU conformation. Furthermore, considering the FF-to-LU transition as practically irreversible nullifies the $k_{\text{FF}}[\text{Prx}^{\text{LU}}\text{–SOH}]$ term, simplifying the equation to

$$f_{\text{inact}} = \frac{k_{\text{SO}_2}[\text{ROOH}]}{k_{\text{SO}_2}[\text{ROOH}] + k_{\text{LU}}}$$

and

$$f_{\text{inact}} = \frac{k_{\text{SO}_2}[\text{ROOH}]}{k_{\text{LU}}} \quad (1)$$

if inactivation occurs in less than 5% of the enzyme molecules, which comply to the conditions used in this study.³ Thus, as with the Nelson method, f_{inact} is expected to be linearly dependent on the peroxide concentration but with a slope equal to $k_{\text{SO}_2}/k_{\text{LU}}$ (eq 1). A summary of the k_{LU} and k_4 (used as an estimate of k_{SO_2} for enzymes possessing the C_R) rate constants measured for Tsa1 and a comparison of the $C_{\text{hyp1\%}}$ value calculated from these values with the experimental ones

(Figure 4b) showed a good agreement for wild-type Tsa1, Tsa1 mutants, H_2O_2 , and organic peroxides (Table 2 and Figure S15). In the case of human Prxs, as the disulfide formation step was not kinetically resolved from the rate-limiting FF-to-LU transition (Figure 3e), we used the reported rate constants of the resolving step^{11,12} as proxy of k_{LU} . Based on published human Prxs k_{SO_2} , experimental or estimated values,^{11,12} the hyperoxidation sensitivity index $C_{\text{hyp1\%}}$ is again predicted with a good agreement compared to the experimental values published with H_2O_2 (Table 2 and Figure S15). This interpretation also explains the results obtained by Randall et al.,¹⁶ using the equation “direct $C_{\text{hyp1\%}}$ ” = $0.01 \times k_{\text{res}}/k_{\text{SO}_2}$, with k_{res} corresponding to the observed resolving phase rate constant. These comparisons further support a mechanistic model in which the degree of hyperoxidation sensitivity is controlled by the FF-to-LU transition kinetics of the sulfenic intermediate and not by the disulfide formation event. In the case of AhpC, the reverse calculation using a $C_{\text{hyp1\%}} > 5 \text{ mM}^{18}$ and a k_{SO_2} of $410 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ¹⁶ gave an estimation of the FF-to-LU rate constant $>205 \text{ s}^{-1}$, similar to the Tsa1^{A177S A178D} mutant.

Relative Hyperoxidation Sensitivity of Prxs in Vivo.

To assay Prx sulfinylation in vivo, we monitored the differential migration of reduced vs sulfenylated Prx seen upon alkylation with methyl-PEG (24)-maleimide (mPEG). mPEG adds 1239.44 Da per modified residue and can only alkylate reduced, but not sulfenylated, Cys residues, thereby differentiating the reduced from the sulfenylated enzyme. We first compared the reactivity of Myc-tagged and untagged Tsa1, using a Myc-specific and a human-Prx antibody, the latter also reacting with Tsa1, and although it produces multiple nonspecific signals, it allows quantification (Figure S16a). Upon mPEG alkylation of the reduced enzyme, migration of either enzyme form was up-shifted to a molecular size corresponding to the addition of two mPEG moieties (2-mPEG), which lines up with the two Tsa1 Cys residues C_p and C_r . When cells were exposed to H_2O_2 , the 2-mPEG-modified band disappeared upon increasing H_2O_2 concentration, with appearance of a new lower-migrating band, which corresponds to Tsa1 modified by one mPEG, presumably at C_r , as carrying C_p in the sulfinate form, as confirmed by immunoblotting with an anti- $\text{SO}_2/3$ antibody (Figure S16b). The Tsa1 sulfinylation level can thus be determined by the relative intensity ratio of the 1-mPEG and 2-mPEG Tsa1 bands ($\text{SO}_2/\text{SO}_2 + \text{SH}$, Figure S16c), irrespective of absolute levels of the enzyme. The compared sulfinylation profiles of Myc-Tsa1 and Tsa1 showed that although they displayed similar sulfinylation sensitivity, both reaching 50% saturation at $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 , Myc-Tsa1 sulfinylation was delayed at $\text{H}_2\text{O}_2 < 100 \mu\text{M}$, indicating that the N-terminal Myc tag alters enzyme reactivity (Figure S16b).

We thus used untagged Tsa1 to next compare the enzyme sulfinylation profile in response to a 5 min cell exposure to H_2O_2 and organic peroxides (Figure 7a). Sulfinylation reached 50% at the doses of 75, 125, and $200 \mu\text{M}$, for CuOOH, tBOOH, and H_2O_2 , respectively, consistent with in vitro data that indicated a much higher hyperoxidation sensitivity toward organic peroxides, relative to H_2O_2 . We next compared the in vivo sulfinylation sensitivity of Tsa1^{A177S A178D} and hPrx1 to that of Tsa1. As expected from the in vitro kinetics, Tsa1^{A177S A178D} required much higher doses of H_2O_2 to reach 50% sulfinylation ($500 \mu\text{M}$), relative to Tsa1 ($200 \mu\text{M}$) (Figure 7d,e). As expected too, hPrx1 was far more reactive,

reaching 50% sulfinylation at $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 , also displaying a non-negligible basal sulfinylation, ca. 20%, presumably caused by endogenous H_2O_2 . Western blot of the same lysates with the anti-Prx $\text{SO}_2/3$, although less quantitative, provided results similar to those of the mPEG procedure (Figure 7b,e). It is worth noting that full 100% enzyme sulfinylation was never reached, also plateauing at a higher value with tBOOH and CuOOH, relative to H_2O_2 , and at a much lower value in the case of the Tsa1^{A177S A178D} mutant, which presumably result from the assay integrating both intrinsic enzyme reactivity rates and the cellular peroxide degradation, as best exemplified with the Tsa1^{A177S A178D} mutant. In summary, the sulfinylation parameters measured in vitro are valid in the cellular context.

DISCUSSION

The mechanistic foundations of Prx1-type sulfinylation were established by the seminal work of Wood, Poole, and Karplus in a model that integrated three parameters as determinants of the sensitivity to hyperoxidation.³ By Trp fluorescence-based rapid kinetics of the *S. cerevisiae* Prx1-type Tsa1, we have identified a conformational event linked to the FF-to-LU transition that is kinetically distinct from the recycling step. This finding establishes that hyperoxidation sensitivity is dictated by only two parameters, the sulfinylation step per se and the FF $\rightarrow$ LU rate constants (Figure 1a). Accordingly, formation of Tsa1 SO_2 and the conformational FF-to-LU transition appear as two reciprocally exclusive competing paths, with the “kinetic pause” that enables Tsa1 SO_2 formation occurring prior to the conformational transition. A slow FF-to-LU transition, as it happens in hPrx1, however becomes rate-limiting for the subsequent resolving step (Figure 3e). In addition, our data suggest that the stability of the active site FF conformation, which sets the sulfinylation kinetics, is only moderately influenced by the C-terminal tail conformation, which sets FF $\rightarrow$ LU kinetics.

This model is supported by several lines of experimental evidence. First, using a wide range of H_2O_2 concentrations relevant to hyperoxidation, Tsa1 reaction kinetics could be globally fitted according to the mechanism corresponding to Figure 1a. Importantly, global fitting and simulations suggest that once the C_p -SOH intermediate is formed, the FF-to-LU transition is practically not reversible, as initially thought. Indeed, based on the model from Figure 6b, simulations suggest an upper k_{FF} value of 0.6 s^{-1} for the reverse Tsa1^{FF}-SOH $\rightleftharpoons$ Tsa1^{LU}-SOH reaction, giving an equilibrium constant $K_{\text{LU}}^{\text{SOH}} = k_{\text{LU}}/k_{\text{FF}} > 108$ (Figure S11). Since in the reduced state Tsa1-SH the FF conformation is favored, this therefore suggests that sulfenate formation has a profound effect on the FF/LU equilibrium in triggering local unfolding. This unexpected finding in fact fits ultrahigh-resolution structure analysis of reaction snapshots obtained with the robust bacterial PrxQ. These data suggested that the rate constant k_{LU} is higher than k_{FF} , based on the fact that the nascent sulfenate in the FF state forms in a high-energy structure, which promotes local unfolding by destabilization of the active site.²⁸ As already suggested in this study,²⁸ we propose that a slower FF-to-LU local unfolding process, as the one measured here for the sensitive Tsa1 and hPrx1, is due to an active site adjustment that accommodates sulfenate formation and movement. Second, use of our refined model to derive the steady-state hyperoxidation sensitivity, $C_{\text{hyp1\%}}$, predicts k_{LU} and k_{SO_2} as the only determinant kinetic steps, in

good agreement with the $C_{\text{hyp1\%}}$ experimentally measured values (Figure S15). Third, a global fit returned a rate constant of H_2O_2 -dependent hyperoxidation k_{SO_2} similar to the value measured directly using the Tsa1^{C171A} mutant, in the $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ range.

The much higher hyperoxidation rate constants of Prx, relative to other redox-sensitive proteins,²⁹ suggest that the active site in the Prx–SOH FF conformation favors hyperoxidation by activating H_2O_2 , as it does for activating the initial reaction of C_p with H_2O_2 .³⁰ The similarity of the k_{SO_2} for H_2O_2 measured for Tsa1 and human Prxs¹² is consistent with the high conservation of Prxs active sites. The hyperoxidation rate constants measured with *t*BOOH and CuOOH were surprisingly much higher than those of H_2O_2 . These organic peroxides may establish interactions in the vicinity of the FF active site by virtue of their aliphatic or aromatic moieties, respectively, which could favor the positioning of the peroxide function relative to the sulfenate. Conversely, the *t*BOOH k_{SOH} value was slightly lower than the very high, close to the diffusion limit, k_{SOH} value measured with H_2O_2 , which could be a consequence of the organic peroxide bulkier structure relative to H_2O_2 , reducing active site accessibility.

We characterized the Tsa1 A177S–A178D mutation, which substitutes these two residues in Tsa1 by those present at the same location in hPrx1 initially identified as C-terminal tail-determinants influencing $C_{\text{hyp1\%}}$.¹⁹ We found that this mutant had wild-type values for k_{SOH} and for the amplitude of phase 1 but paradoxically a CD profile indicative of a FF–LU equilibrium shifted toward the LU conformation. Such a shifted FF–LU equilibrium would have been expected to decrease k_{SOH} if indeed the C-terminal helix contributes to active site stability and hence to C_p H_2O_2 reactivity.³⁰ This result can be explained by two nonmutually exclusive hypotheses: (i) The equilibrium shifted in favor of the LU conformation is a rapid equilibrium, ensuring nonlimiting LU $\rightarrow$ FF displacement upon H_2O_2 reaction with Tsa1^{FF}–SH. This is consistent with the high conformational exchange rate measured for PrxQ.²³ (ii) The Tsa1^{A177S A178D} mutant exists in a mixed conformation, maintaining the active site in an FF conformation competent for a highly efficient C_p attack on H_2O_2 ³⁰ and destabilizing to some extent the C-terminal tail, as observed in some structures of AhpC.³¹ In the Tsa1^{A177S A178D} mutant, as in wild-type Tsa1, sulfenic acid formation would be the trigger of the active site transition to the LU state, then “pushing” the C-terminal tail toward a full LU form and shifting the FF/LU equilibrium in favor of LU, which is consistent with the conclusions obtained by Perkins et al. on AhpC.³¹ Similar interpretation may apply for the Tsa1^{Y190G F191G} mutant CD spectrum that displayed the full LU signature, but its kinetics paradoxically showed only a 6-fold decrease of k_1 ($1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, second-order kinetics up to $50 \mu\text{M}$ H_2O_2) relative to the wild type. In this mutant, the absence of the buttressing effect of the C-terminal helix favors faster local active site unfolding by the formed C_p –SOH, thereby disfavoring hyperoxidation, while the C-terminal tail remaining in the LU conformation prevents phase 2 occurrence. These two examples support the notion that the unfolding of the C-terminal tail is not sufficient to induce the FF-to-LU transition at the active site, in agreement with previous studies.³¹ We thus propose that molecular determinants of hyperoxidation sensitivity fall into two classes: those stabilizing the FF active site conformation and thus favoring

high peroxide C_p reactivity (k_{SO_2} and necessarily k_{SOH}) and those influencing the C-terminal tail flexibility that determine k_{LU} (Figure 8).



Figure 8. Scheme illustrating the two proposed classes of Prx sulfenylation determinants. Mutants FF/LU affecting the C-terminal tail flexibility have high FF-to-LU kinetics, retain high peroxide reactivity, and are not sensitive to sulfenylation; mutants affecting the active site structure have poor peroxide reactivity and are predicted to be poorly sensitive to sulfenylation, irrespective of the FF–LU kinetics.

How do the in vitro Prx hypersensitivity parameters described here translate into biological contexts? To answer this question, we monitored Prx sulfenylation levels after a short, 5 min peroxide exposure. We observed a H_2O_2 -dose response effect, consistent with the intracellular H_2O_2 level dependence of the kinetics of sulfenylation. Under these conditions, the hyperoxidation parameters established in vitro were predictive of in vivo relative sensitivities of the enzyme sets toward hyperoxidation, when comparing both H_2O_2 and organic peroxides, which have distinct k_{SO_2} and Prxs with distinct k_{LU} . The much higher sensitivity of hPrx1 relative to Tsa1, which displayed a basal level of sulfenylation when expressed in *S. cerevisiae*, is consistent with the measured lower $C_{\text{hyp1\%}}$ of hPrx1 and might reflect the much lower intracellular peroxide levels of mammalian cells relative to yeast.^{32,33}

In conclusion, our work provides a quantitative basis to predict in vivo relative hyperoxidation sensitivities for different Prx types, based on enzymatic parameters determined in vitro. It sets the bases for new Prxs structure–function studies and to approach the mechanism of the regulation of other proteins by reversible Cys sulfenylation, which is more common than initially thought.¹

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals were of reagent grade and were used without additional purification. Tris was from VWR (West Chester, PA). Tris, (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BOOH), cumene hydroperoxide (CuOOH), saccharose, Trp, NaF, KCl, and MgCl_2 were from Merck (Darmstadt, Germany). NADPH was obtained from Roche (Basel, Switzerland), and dithiothreitol (DTT) and ammonium sulfate were from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Hydrogen peroxide (H_2O_2) was from Acros Organics (Geel, Belgium). Peroxide stock concentrations were measured accurately by the peroxidase enzymatic coupled assay using Tsa1/Trx/Trx reductase/NADPH, following the total NADPH consumption at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Recombinant Protein Preparation. Recombinant thioredoxin1 (Trx), Trx reductase from *Escherichia coli*, and wild-type and mutant His-tagged Tsa1 (Tsa1) from *S. cerevisiae* were produced and purified following the experimental

procedures previously described.^{34–36} Tsa1 mutants were generated by standard polymerase chain reaction (PCR) site-directed mutagenesis and sequenced to confirm that no mutations had been introduced in the amplification reactions.

The pET28bHT-hPrx1 plasmid encoding the N-terminal His tag fusion protein of human Prx1 was obtained by cloning the *prdx1* open reading frame amplified by PCR (GC-rich system, Roche Applied Science, Basel, Switzerland) using a complementary DNA (cDNA) clone from *Homo sapiens* (RZPD, German science center for genome research, clone IRAUP969E034) as template into the pET28b(+) plasmid between the NdeI and SacI sites. The forward primer contained a NdeI restriction site, and the reverse primer contained a SacI restriction site (sequences of oligonucleotides not shown). *E. coli* C41(DE3) [*F*[−]ompT hsdSB (*rB*[−]mB[−]) gal dcm (DE3)] transformants containing the pET28bHT-hPrx1 plasmid were grown by overnight culture at 37 °C for 24 h in the autoinducible ZYM-5052 medium³⁷ supplemented with kanamycin (50 mg L^{−1}). Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer B (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5), and disrupted by sonication. hPrx1 contained in the soluble fraction was purified on a Ni-Sepharose column equilibrated with buffer B plus 50 mM imidazole, connected to an ÄKTA Avant system (GE Healthcare, France) and eluted by a 0.5 M imidazole step. At this stage, wild-type and mutant proteins were pure as checked by electrophoresis on 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses. After overnight dialysis in a 20 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl, pH 7.5, buffer, purified hPrx1 was stored at −80 °C in the presence of 10 mM DTT and was stable for several weeks under these conditions.

The plasmid pET20bTsa1 encoding the *S. cerevisiae* 2-Cys-Prx Tsa1 (referred to as native Tsa1) was obtained by cloning the Tsa1 open reading frame amplified by PCR using *S. cerevisiae* W303 genomic DNA as template into the pET20b plasmid between the NdeI and SacI sites, as described for hPrx1. The recombinant protein was produced as described for hPrx1. For native Tsa1 purification, the protein contained in the soluble fraction of the cellular extract was precipitated by ammonium sulfate at 55% saturation, followed by hydrophobic chromatography on a phenyl-Sepharose column (Amersham Biosciences) equilibrated with a 20 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl, pH 7, buffer plus 1 M ammonium sulfate, eluted with a linear 1–0 M ammonium sulfate gradient. Final purification was achieved by anion exchange chromatography on a Q-Sepharose column equilibrated with buffer A, by an elution by a 0–1 M NaCl linear gradient. The protein was characterized and stored as described for hPrx1.

Immediately before use, the proteins were incubated with 20 mM TCEP for 20 min on ice, followed by desalting in TK buffer (50 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7) on a PD-10 column. Protein monomer concentration was determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient of 29 500 M^{−1} cm^{−1} for Tsa1³⁴ and 18 450 M^{−1} cm^{−1} for hPrx1. Preparation of Tsa1_{SO₂} was performed as previously described³⁴ and of Tsa1_{SS} by addition of 1.2 equiv of H₂O₂ to reduced Tsa1 in solution. The intrinsic fluorescence emission spectra of Tsa1 (2 μM) were recorded on a SAFAS Xenius fluorimeter at an excitation wavelength of 295 nm using a photomultiplier voltage of 450 V.

Stopped-Flow Rapid Kinetics. The reaction of wild-type and mutant Tsals with peroxide substrates was followed in single turnover conditions by monitoring intrinsic fluorescence intensity at 25 °C in buffer TK on an SX19MV-R stopped-flow apparatus (Applied Photophysics) equipped with a 5 μL cell, fitted for fluorescence measurements, with excitation wavelength set at 295 nm and emitted light collected above 320 nm using a cutoff filter. One syringe contained Tsa1 (5 μM, final concentration after mixing), and the other syringe contained the peroxide substrate. Equal volumes of each syringe were rapidly mixed to start the reaction. An average of at least six runs was recorded for each concentration of peroxide. The data set obtained at variable peroxide concentrations was fitted against multiexponential equation using Pro-Data viewer (Applied Photophysics) or SciDavis 1.2 software. For experiments in the presence of viscogen, the desired concentration (10–20 or 30%) was added to buffer TK.

Steady-State Tsa1 Peroxidase Activity. Tsa1 peroxidase activity was measured in TK buffer using the Trx/Trx reductase/NADPH coupled assay (1 μM Trx reductase, 200 μM NADPH, 150 μM Trx) with 100 μM H₂O₂, started by addition of 0.5 or 1 μM Tsa1 at 25 °C. Initial rate measurements were carried out on a UVmc2 spectrophotometer (Safas, Monaco) by following the decrease of absorbance at 340 nm due to the consumption of NADPH. A blank measurement recorded in the absence of Tsa1 was systematically deduced from the assay to account for nonspecific oxidation of Trx or Trx reductase.

Steady-State Hyperoxidation Sensitivity. The hyperoxidation sensitivity index $C_{hyp1\%}$ was measured using a method adapted from Nelson et al.¹⁷ Tsa1 (1 μM) peroxidase activity was measured as for the steady-state assay, in the presence of 5 μM Trx, 0.25 μM Trx reductase, 200 μM NADPH, and variable peroxide substrate in buffer TK by monitoring absorbance at 340 nm over 15 min on a UVmc2 spectrophotometer (Safas, Monaco). As Tsa1 becomes hyperoxidized over the course of the reaction (with a fraction inactivated at each turnover), the absorbance trace deviates from linear kinetics. The rate constant of inactivation k_{inact} was deduced from the slope of the kinetic trace first-order derivative and divided by the initial rate constant measured at time 0 to give the fraction of inactivation per turnover f_{inact} . Because the conditions were chosen to limit the hyperoxidized fraction to less than 5% (Figures 4b, 5b, and 6c), it increases linearly with the peroxide concentration.¹⁷ The reciprocal of the slope of f_{inact} vs peroxide gives the peroxide concentration virtually required to hyperoxidize 100% of Tsa1 in one turnover. It is divided by 100 to give $C_{hyp1\%}$ corresponding to the peroxide concentration at which 1% of the enzyme molecules will be oxidatively inactivated per turnover.

Circular Dichroism. CD spectra of wild-type and mutant Tsals were recorded at 25 °C on a Chirascan Plus spectrometer (Applied Photophysics, U.K.). Far-UV measurements were carried out in a 0.01 cm pathlength flat quartz cell at 50 μM Tsa1 in a 10 mM sodium phosphate and 100 mM sodium fluoride, pH 7, buffer. For near-UV measurements, the same conditions were used, using a 1 cm pathlength cuvette. Scans were recorded with 1 nm steps from 260 to 180 nm (far-UV) or 320 to 250 nm (near-UV), and each experiment was averaged over three scans. The kinetics of the reaction of Tsa1 (50 μM) with H₂O₂ (100 μM) was monitored using the CD signal at 270 nm on the same apparatus coupled with a stopped-flow module. The bandwidth was opened to 4 nm to

increase the detected light intensity. An average of 50 measurements was acquired to minimize the signal/noise ratio.

Yeast Strains, Plasmids, and Growth Media. The *S. cerevisiae* strains used in this study are derivatives of BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0)³⁸ and RDKY3615 (MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63, his3Δ200) and listed in Table 3. Cells were grown at 30 °C in synthetic minimal media

Table 3. *S. cerevisiae* Strains

strains	genotype	reference
RDKY3615	MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63, his3Δ200, lys2ΔBgl, hom3-10, ade2Δ1, ade8, hxt13::URA3	39
BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0	38
Δtsa1	met15Δ0 ura3Δ0	40
MEHY1631	BY4741 tsa1Δ::kanMX4 RDKY3615 ogg1Δ tsa1Δ::PRX1	41

(SD) (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% glucose) supplemented with the appropriate amino acid or YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose). The plasmids used in this study are pRS316-Myc-Tsa1⁴ and pRS316-Tsa1 A177S-A178D that was generated by subcloning of the ORF of pET28b-Tsa1 A177S-A178D between *Xba*I and *Sac*I into pRS316.

mPEG Differential Cysteine Derivatization Procedure To Monitor Peroxiredoxin Sulfenylation in Vivo. Yeast cells (10 mL) grown to an OD_{600 nm} of 0.5 were exposed to H₂O₂, tBOOH, and CuOOH at the indicated concentration for 5 min. Trichloroacetic acid (TCA) (100%) was added to the cell culture to a final concentration of 20%. The cell culture was centrifuged at 6000g for 5 min at 4 °C. Pellets were washed with 20% TCA, and cells were lysed with glass beads in 0.2 mL of TCA (20%). Lysates were pelleted down by centrifugation at 14 000g for 15 min at 4 °C. Pellets were washed twice with acetone; dried; solubilized in 0.2 mL of a buffer containing 10 mM DTT, cOmplete mini ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free protease inhibitor cocktail (Roche) and 25 μg mL⁻¹ phenylmethylsulfonylfluoride, 2% SDS, and 100 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-ethanesulfonic acid (Hepes) (pH 7.4); and incubated at 25 °C for 30 min. Samples were precipitated by 20% TCA and centrifuged at 14 000g for 15 min at 4 °C. After two washes with acetone, the dried pellets were solubilized in 0.1 mL of a buffer containing 10 mM methyl-PEG (24)-maleimide (Thermo Fisher) or 50 mM NEM, cOmplete of mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) and 25 μg mL⁻¹ phenylmethylsulfonylfluoride, 2% SDS, and 100 mM Hepes (pH 7.4) and incubated at 25 °C for 60 min. Protein samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described,⁴² and proteins were immune-detected with an anti-Prx1 (Santa Cruz Biotechnology, ref sc-137222), anti-Myc (9E10), or Prx anti-SO₂/3 antibody kindly provided by S.G. Rhee.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.9b04471>.

Complementary kinetic experiments (Figures S1–S3, S5–S10, and S12–S14); far-UV CD spectra of wild-type Tsa1 and Tsa1^{Y190G F191G} under the reduced and disulfide forms (Figure S4); simulation of the kinetics of formation of Tsa1_{SO₂} (Figure S11); comparison of the calculated and experimental C_{hyp1%} for wild-type and mutant Tsa1s (Figure S15); validation of the in vivo procedure to monitor Prx hyperoxidation (Figure S16) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Sophie Rahuel-Clermont – IMoPA, Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France; UMS2008 IBSLor, Biophysics and Structural Biology Core Facility, Université de Lorraine, CNRS, INSERM, F-54000 Nancy, France; orcid.org/0000-0001-5143-0105; Email: sophie.rahuel@univ-lorraine.fr

Authors

Alexandre Kriznik – IMoPA, Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France; UMS2008 IBSLor, Biophysics and Structural Biology Core Facility, Université de Lorraine, CNRS, INSERM, F-54000 Nancy, France

Marouane Libiad – Laboratoire Stress oxydant et Cancer, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR9198, CNRS, CEA-Saclay, Université Paris-Saclay, iBiTecS/SBIGEM, F-91198 Gif-sur-Yvette, France

Hélène Le Cordier – IMoPA, Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France

Samia Boukhenouna – IMoPA, Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France

Michel B. Toledano – Laboratoire Stress oxydant et Cancer, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR9198, CNRS, CEA-Saclay, Université Paris-Saclay, iBiTecS/SBIGEM, F-91198 Gif-sur-Yvette, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.9b04471>

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Dr. H. Mazon for help with mass spectrometry analyses, Dr. F. Talfournier for insightful discussions, and J. Charbonnel for efficient technical help. This work was supported by ANR grant ANR-17-CE11-0034-02 to M.B.T. and S.R.-C., Ligue contre le Cancer to S.R.-C., the University de Lorraine and Région Grand Est. The authors acknowledge support of the group by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir-ANR). This work was granted access to the Biophysics and Structural Biology Core Facility of UMS2008 IBSLor CNRS-UL-INSERM and mass spectrometry platform SCMS of Université de Lorraine.

■ REFERENCES

- (1) Akter, S.; Fu, L.; Jung, Y.; Conte, M. L.; Lawson, J. R.; Lowther, W. T.; Sun, R.; Liu, K.; Yang, J.; Carroll, K. S. Chemical Proteomics

Reveals New Targets of Cysteine Sulfinic Acid Reductase. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 995–1004.

(2) Chevallet, M.; Wagner, E.; Luche, S.; van Dorsselaer, A.; Leize-Wagner, E.; Rabilloud, T. Regeneration of Peroxiredoxins during Recovery after Oxidative Stress. Only Some Overoxidized Peroxiredoxins Can Be Reduced during Recovery After Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37146–37153.

(3) Wood, Z. A.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science* **2003**, *300*, 650–653.

(4) Biteau, B.; Labarre, J.; Toledano, M. B. ATP-Dependent Reduction of Cysteine–Sulphinic Acid by *S. cerevisiae* Sulphiredoxin. *Nature* **2003**, *425*, 980–984.

(5) Nelson, K. J.; Knutson, S. T.; Soito, L.; Klomsiri, C.; Poole, L. B.; Fetrow, J. S. Analysis of the Peroxiredoxin Family: Using Active-Site Structure and Sequence Information for Global Classification and Residue Analysis. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2011**, *79*, 947–964.

(6) Fourquet, S.; Huang, M. E.; D'Autreaux, B.; Toledano, M. B. The Dual Functions of Thiol-Based Peroxidases in H₂O₂ Scavenging and Signaling. *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, *10*, 1565–1576.

(7) Kil, I. S.; Lee, S. K.; Ryu, K. W.; Woo, H. A.; Hu, M.-C.; Bae, S. H.; Rhee, S. G. Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H₂O₂-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 584–594.

(8) Day, A. M.; Brown, J. D.; Taylor, S. R.; Rand, J. D.; Morgan, B. A.; Veal, E. A. Inactivation of a Peroxiredoxin by Hydrogen Peroxide Is Critical for Thioredoxin-Mediated Repair of Oxidized Proteins and Cell Survival. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 398–408.

(9) Jang, H. H.; Lee, K. O.; Chi, Y. H.; Jung, B. G.; Park, S. K.; Park, J. H.; Lee, J. R.; Lee, S. S.; Moon, J. C.; Yun, J. W.; et al. Two Enzymes in One: Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function. *Cell* **2004**, *117*, 625–635.

(10) Turner-Ivey, B.; Manevich, Y.; Schulte, J.; Kistner-Griffin, E.; Jezierska-Drutel, A.; Liu, Y.; Neumann, C. A. Role for Prdx1 as a Specific Sensor in Redox-Regulated Senescence in Breast Cancer. *Oncogene* **2013**, *32*, 5302–5314.

(11) Peskin, A. V.; Dickerhof, N.; Poynton, R. A.; Paton, L. N.; Pace, P. E.; Hampton, M. B.; Winterbourn, C. C. Hyperoxidation of Peroxiredoxins 2 and 3. Rate Constants for the Reactions of the Sulfinic Acid of the Peroxidatic Cysteine. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14170–14177.

(12) Dalla Rizza, J.; Randall, L. M.; Santos, J.; Ferrer-Sueta, G.; Denicola, A. Differential Parameters between Cytosolic 2-Cys Peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2: PRDX1, PRDX2 Differential Parameters. *Protein Sci.* **2019**, *28*, 191–201.

(13) Portillo-Ledesma, S.; Randall, L. M.; Parsonage, D.; Dalla Rizza, J.; Karplus, P. A.; Poole, L. B.; Denicola, A.; Ferrer-Sueta, G. Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing. *Biochemistry* **2018**, *57*, 3416–3424.

(14) Koo, K. H.; Lee, S.; Jeong, S. Y.; Kim, E. T.; Kim, H. J.; Kim, K.; Song, K.; Chae, H. Z. Regulation of Thioredoxin Peroxidase Activity by C-Terminal Truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 312–318.

(15) Jara, M.; Vivancos, A. P.; Hidalgo, E. C-Terminal Truncation of the Peroxiredoxin Tpx1 Decreases Its Sensitivity for Hydrogen Peroxide without Compromising Its Role in Signal Transduction. *Genes Cells* **2008**, *13*, 171–179.

(16) Randall, L. M.; Dalla Rizza, J.; Parsonage, D.; Santos, J.; Mehl, R. A.; Lowther, W. T.; Poole, L. B.; Denicola, A. Unraveling the Effects of Peroxiredoxin 2 Nitration; Role of C-Terminal Tyrosine 193. *Free Radical Biol. Med.* **2019**, *141*, 492–501.

(17) Nelson, K. J.; Parsonage, D.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. Evaluating Peroxiredoxin Sensitivity Toward Inactivation by Peroxide Substrates. In *Methods Enzymology*; Cadenas, E.; Packer, L., Eds.; Hydrogen Peroxide and cell signaling, Part B; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Vol. 527, pp 21–40.

(18) Bolduc, J. A.; Nelson, K. J.; Haynes, A. C.; Lee, J.; Reisz, J. A.; Graff, A. H.; Clodfelter, J. E.; Parsonage, D.; Poole, L. B.; Furdul, C. M.; Lowther, W. T. Novel Hyperoxidation Resistance Motifs in 2-Cys Peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 11901–11912.

(19) Poynton, R. A.; Peskin, A. V.; Haynes, A. C.; Lowther, W. T.; Hampton, M. B.; Winterbourn, C. C. Kinetic Analysis of Structural Influences on the Susceptibility of Peroxiredoxins 2 and 3 to Hyperoxidation. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 411–421.

(20) Kamariah, N.; Sek, M. F.; Eisenhaber, B.; Eisenhaber, F.; Grüber, G. Transition Steps in Peroxide Reduction and a Molecular Switch for Peroxide Robustness of Prokaryotic Peroxiredoxins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, No. 37610.

(21) Nelson, K. J.; Perkins, A.; Van Swearingen, A. E. D.; Hartman, S.; Brereton, A. E.; Parsonage, D.; Salisbury, Jr., Freddie, R.; Karplus, P. A.; Poole, L. B. Experimentally Dissecting the Origins of Peroxiredoxin Catalysis. *Antioxid. Redox Signaling* **2018**, 521–536.

(22) Parsonage, D.; Nelson, K. J.; Ferrer-Sueta, G.; Alley, S.; Karplus, P. A.; Furdul, C. M.; Poole, L. B. Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1567–1575.

(23) Adén, J.; Wallgren, M.; Storm, P.; Weise, C. F.; Christiansen, A.; Schröder, W. P.; Funk, C.; Wolf-Watz, M. Extraordinary Ms–Ms Backbone Dynamics in Arabidopsis Thaliana Peroxiredoxin Q. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2011**, *1814*, 1880–1890.

(24) Tairum, C. A.; Santos, M. C.; Breyer, C. A.; Geyer, R. R.; Nieves, C. J.; Portillo-Ledesma, S.; Ferrer-Sueta, G.; Toledo, J. C.; Toyama, M. H.; Augusto, O.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, No. 33133.

(25) Bakhtina, M.; Lee, S.; Wang, Y.; Dunlap, C.; Lamarche, B.; Tsai, M.-D. Use of Viscogens, DNTPaS, and Rhodium(III) as Probes in Stopped-Flow Experiments To Obtain New Evidence for the Mechanism of Catalysis by DNA Polymerase β . *Biochemistry* **2005**, *44*, 5177–5187.

(26) Rahuel-Clermont, S.; Bchini, R.; Barbe, S.; Boutserin, S.; André, I.; Talfournier, F. Enzyme Active Site Loop Revealed as a Gatekeeper for Cofactor Flip by Targeted Molecular Dynamics Simulations and FRET-Based Kinetics. *ACS Catal.* **2019**, 1337–1346.

(27) Haynes, A. C.; Qian, J.; Reisz, J. A.; Furdul, C. M.; Lowther, W. T. Molecular Basis for the Resistance of Human Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin 3 to Hyperoxidation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 29714–29723.

(28) Perkins, A.; Parsonage, D.; Nelson, K. J.; Ogba, O. M.; Cheong, P. H.-Y.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure* **2016**, *24*, 1668–1678.

(29) Tanner, J. J.; Parsons, Z. D.; Cummings, A. H.; Zhou, H.; Gates, K. S. Redox Regulation of Protein Tyrosine Phosphatases: Structural and Chemical Aspects. *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 77–97.

(30) Hall, A.; Nelson, K.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Structure-Based Insights into the Catalytic Power and Conformational Dexterity of Peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 795–815.

(31) Perkins, A.; Nelson, K. J.; Williams, J. R.; Parsonage, D.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. The Sensitive Balance between the Fully Folded and Locally Unfolded Conformations of a Model Peroxiredoxin. *Biochemistry* **2013**, *52*, 8708–8721.

(32) Huang, B. K.; Sikes, H. D. Quantifying Intracellular Hydrogen Peroxide Perturbations in Terms of Concentration. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 955–962.

(33) Domènech, A.; Ayté, J.; Antunes, F.; Hidalgo, E. Using in Vivo Oxidation Status of One- and Two-Component Redox Relays to Determine H₂O₂ Levels Linked to Signaling and Toxicity. *BMC Biol.* **2018**, *16*, 61.

(34) Roussel, X.; Béchade, G.; Kriznik, A.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S.; Branlant, G.; Rahuel-Clermont, S. Evidence for the Formation of a Covalent Thiosulfinate Intermediate with Peroxiredoxin in the Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 22371–22382.

- (35) Mössner, E.; Huber-Wunderlich, M.; Glockshuber, R. Characterization of *Escherichia coli* Thioredoxin Variants Mimicking the Active-Sites of Other Thiol/Disulfide Oxidoreductases. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1233–1244.
- (36) Mulrooney, S. B. Application of a Single-Plasmid Vector for Mutagenesis and High-Level Expression of Thioredoxin Reductase and Its Use to Examine Flavin Cofactor Incorporation. *Protein Expression Purif.* **1997**, *9*, 372–378.
- (37) Studier, F. W. Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 207–234.
- (38) Brachmann, C. B.; Davies, A.; Cost, G. J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J. D. Designer Deletion Strains Derived from *Saccharomyces Cerevisiae* S288C: A Useful Set of Strains and Plasmids for PCR-Mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast* **1998**, *14*, 115–132.
- (39) Schmidt, K. H.; Pennaneach, V.; Putnam, C. D.; Kolodner, R. D. Analysis of Gross-Chromosomal Rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology; DNA Repair, Part B*; Academic Press, 2006; Vol. 409, pp 462–476.
- (40) Noichri, Y.; Palais, G.; Ruby, V.; D'Autreaux, B.; Delaunay-Moisan, A.; Nyström, T.; Molin, M.; Toledano, M. B. In Vivo Parameters Influencing 2-Cys Prx Oligomerization: The Role of Enzyme Sulfinylation. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 326–333.
- (41) Iraqui, I.; Faye, G.; Ragu, S.; Masurel-Heneman, A.; Kolodner, R. D.; Huang, M.-E. Human Peroxiredoxin PrxI Is an Orthologue of Yeast Tsa1, Capable of Suppressing Genome Instability in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1055–1063.
- (42) Delaunay, A.; Isnard, A.-D.; Toledano, M. B. H₂O₂ Sensing through Oxidation of the Yap1 Transcription Factor. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5157–5166.

Supporting
information

**Dynamics of a Key Conformational Transition in the Mechanism of Peroxiredoxin
Sulfinylation**

by

Alexandre Kriznik^{1,2}, Marouane Libiad³, Hélène Le Cordier¹, Samia Boukhenouna¹, Michel B
Toledano³ & Sophie Rahuel-Clermont^{1,2*}

¹ IMoPA, Université de Lorraine, CNRS, Biopole, Campus Biologie Santé, F-54000 Nancy, France

² UMS2008 IBSLor, Biophysics and Structural Biology core facility, Université de Lorraine, CNRS, INSERM, Biopole, Campus Biologie Santé, F-54000 Nancy, France

³ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR9198, CNRS, CEA-Saclay, Université Paris-Saclay, iBiTecS/SBIGEM, Laboratoire Stress oxydant et Cancer, Bat 142, F-91198 Gif-sur- Yvette Cedex, France

* E-mail: sophie.rahuel@univ-lorraine.fr

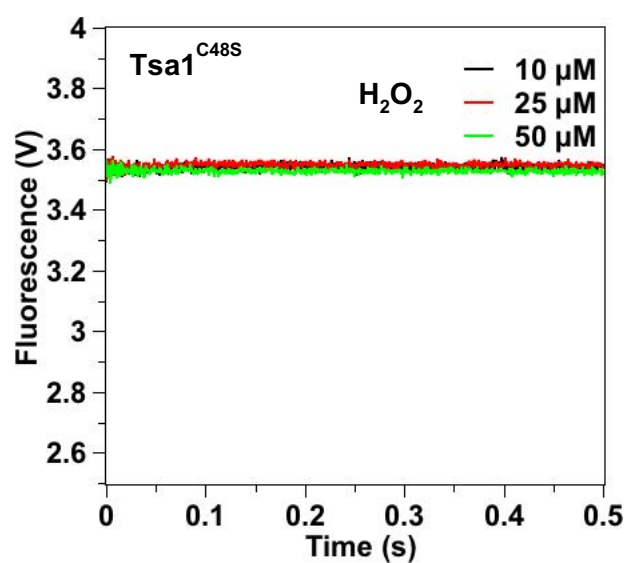


Figure S1. Pre-steady state kinetics for the reaction of Tsa1^{C48S} (5 μM) with increasing H₂O₂ (10, 25, 50 μM) monitored by Trp fluorescence as in Fig. 2b.

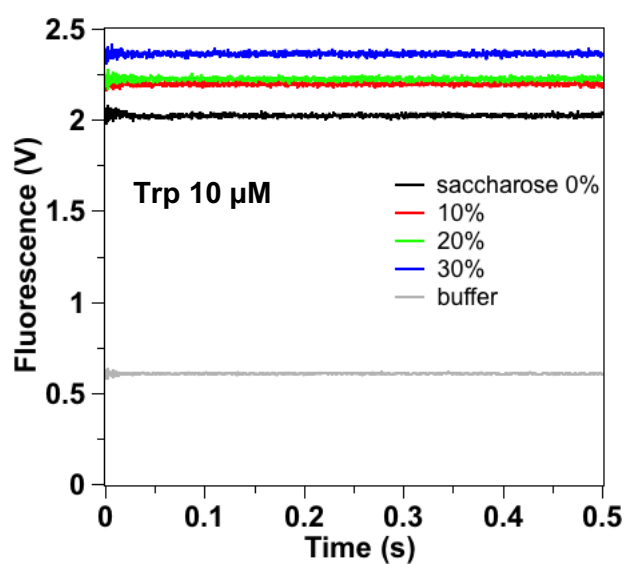


Figure S2. Test of stop flow mixer efficiency in viscous solutions, based on the effect of saccharose (0% black, 10 % red, 20% green and 30% blue) on Trp amino-acid fluorescence (10 μM) monitored as in Fig. 2b.

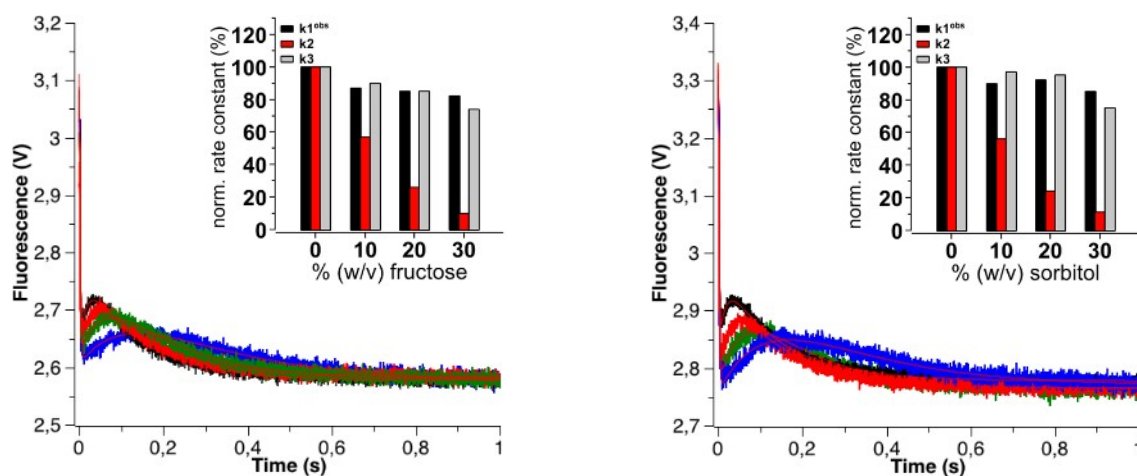


Figure S3. Effect of viscogens fructose (a) and sorbitol (b) (0% black, 10 % red, 20% green and 30% blue) on the reaction of Tsa1 (5 μ M) with H₂O₂ (10 μ M) monitored as in Fig. 2, fitted against a 3- exponential equation (red lines). Insets, effect of viscogen concentration on rate constants k_1^{obs} , k_2 and k_3 normalized to 0% viscogen.

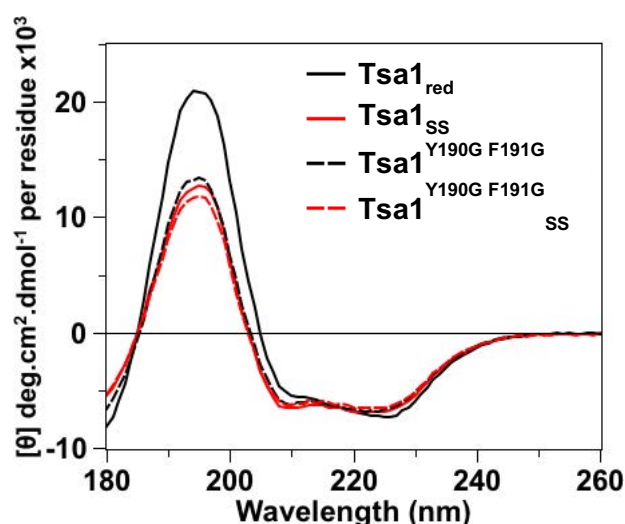


Figure S4. Far-UV CD spectra of 5 μ M wild-type Tsa1 (plain) and Tsa1^{Y190G F191G} (dash line) under the reduced (black) and disulfide (red) forms. Measurements were performed in a 0.01 cm flat cell in phosphate (10 mM) NaF (100 mM) buffer pH 7 and are the average of three record

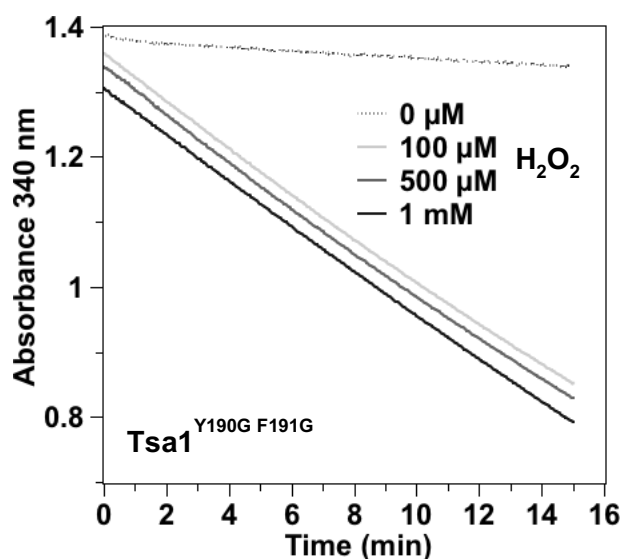


Figure S5. Steady state kinetics for the determination of the hyperoxidation sensitivity of Tsa1^{Y190G F191G} with H₂O₂ monitored by consumption of NADPH (200 μM) at 340 nm in the presence *E. coli* thioredoxin reductase (0.25 μM), *E. coli* Trx1 (5 μM), Tsa1 (1 μM) and variable amounts of H₂O₂ (from 100 μM to 1 mM) in TK buffer. The time courses have been shifted on the y-axis for clarity.

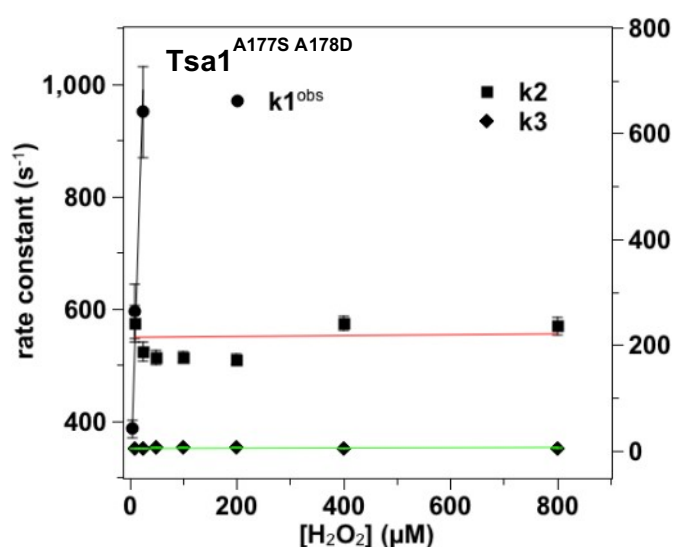


Figure S6. Second order plots and linear fits of the observed rate constants k₁^{obs} (circles, black line), k₂ (squares, red line) and k₃ (diamond, green line) for Tsa1^{A177S A178D} reaction kinetics with H₂O₂.

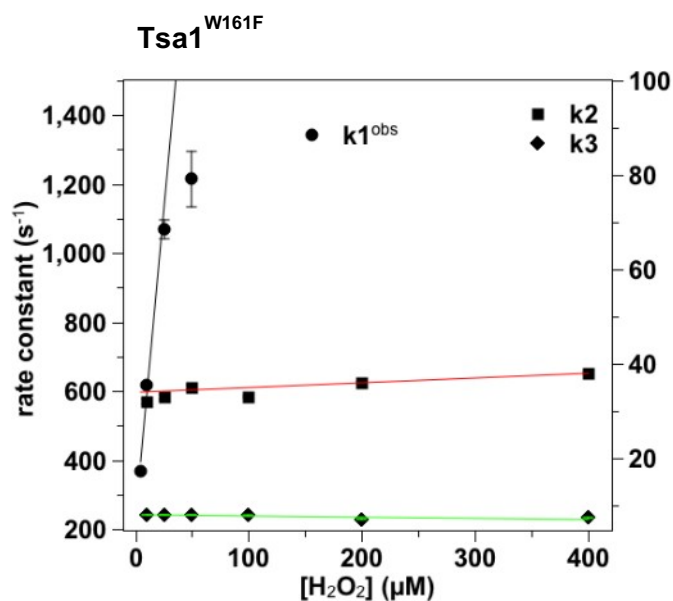


Figure S7. Second order plots and linear fits of the observed rate constants k_1^{obs} (circles, black line), k_2 (squares, red line) and k_3 (diamond, green line) for $\text{Tsa1}^{\text{W161F}}$ reaction kinetics with H_2O_2 .

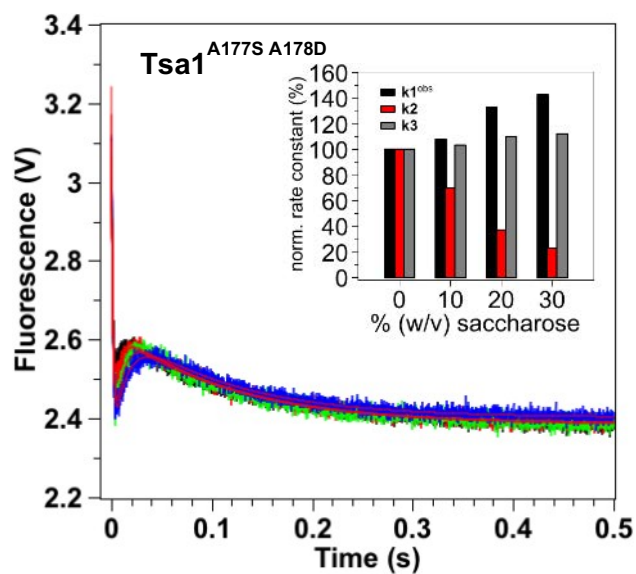


Figure S8. Effect of saccharose (0% black, 10 % red, 20% green and 30% blue) on the reaction of $\text{Tsa1}^{\text{A177S A178D}}$ (5 μM) with H_2O_2 (10 μM) monitored as in Fig. 2b, fitted against a 3-exponential equation (red line). Inset, effect of saccharose concentration on rate constants k_1^{obs} , k_2 and k_3 normalized to 0% saccharose.

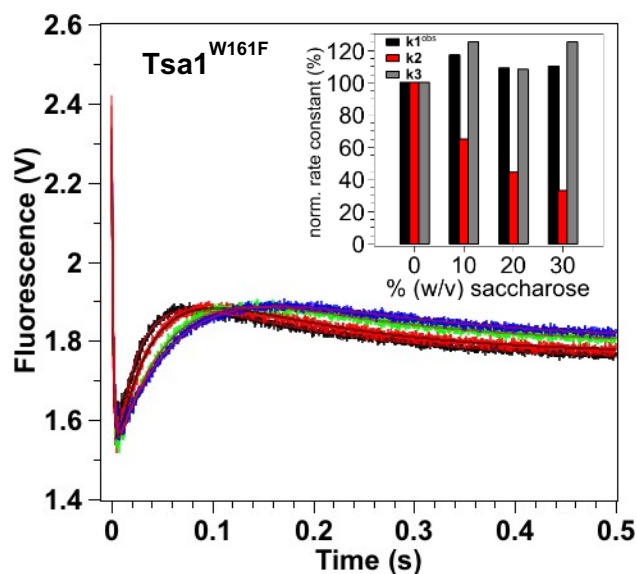


Figure S9. Effect of saccharose (0% black, 10 % red, 20% green and 30% blue) on the reaction of Tsa1^{W161F} (5 μ M) with H₂O₂ (10 μ M) monitored as in Fig. 2b, fitted against a 3-exponential equation (red or black line). Inset, effect of saccharose concentration on rate constants k_1^{obs} , k_2 and k_3 normalized to 0% saccharose.

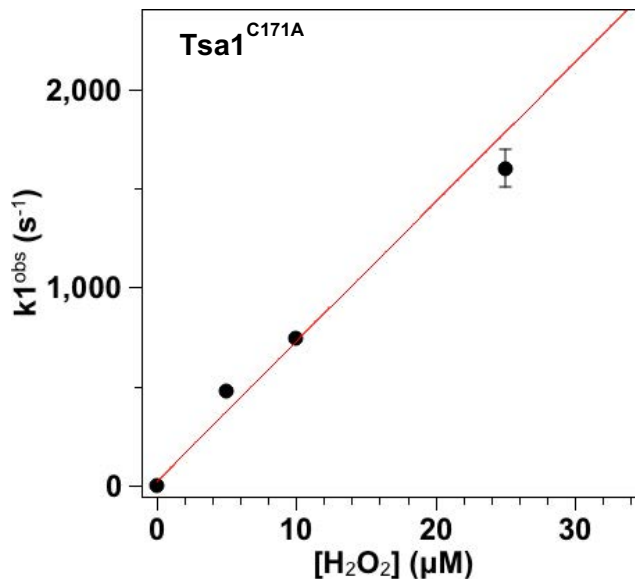


Figure S10. Second order plot and linear fit of the observed rate constants k_1^{obs} vs H₂O₂ concentration, for the reaction kinetics of Tsa1^{C171A} with H₂O₂.

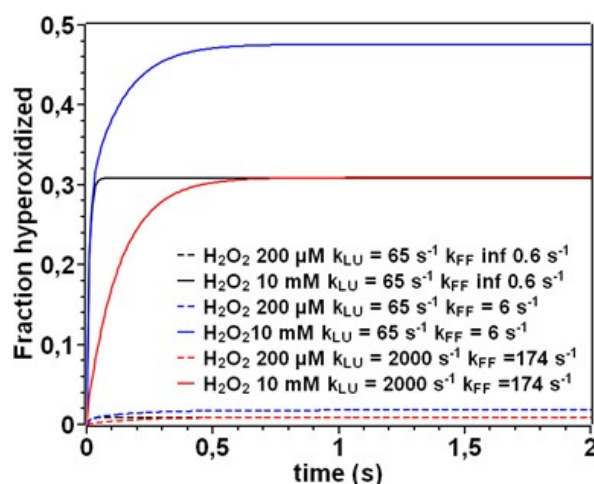


Figure S11. Simulation of the kinetics of formation of Tsa1_{SO2}. Simulations were performed based on the model from Figure 6b, using the fitted rate constants values k_{SOH} and k_{SO2} reported in Table 1 and the indicated values for k_{LU} , k_{FF} and H_2O_2 concentrations. Using fluorescence intensity factors of 62 and 124 % for Tsa1_{SS} and Tsa1_{SO2} respectively (Figure 2a), the fraction of Tsa1 in each state at completion of the reaction was estimated from Figure 6a data. At H_2O_2 concentrations of 200 μM and 10 mM, Tsa1_{SO2} contributes to 1% and 30 % of the total, and Tsa1_{SS} the remainder up to 100 % (black lines). Fixing k_{LU} at the fitted value of 65 s^{-1} and setting k_{FF} to values higher than 0.6 s^{-1} increased the hyperoxidized fraction to values incompatible with experimental observations. For instance, with $k_{\text{FF}} = 6 \text{ s}^{-1}$ Tsa1_{SO2} reaches 2 and 48 % at 200 μM and 10 mM H_2O_2 , respectively (blue lines). This supports that $k_{\text{FF}} \ll k_{\text{LU}}$.

To simulate the $\text{Tsa1}^{\text{FF}} - \text{SOH} \rightleftharpoons \text{Tsa1}^{\text{LU}} - \text{SOH}$ in rapid equilibrium, k_{LU} was set at 2000 s^{-1} , in which case fractions of Tsa1_{SO2} consistent with observation were obtained for $k_{\text{FF}} = 174 \text{ s}^{-1}$ (red lines). However in this case the FF to LU conformational event would be too fast to be observed in fluorescence, and the rate constant of Tsa1_{SO2} formation would be of $\sim 5 \text{ s}^{-1}$, i.e., mostly controlled by k_{SS} .

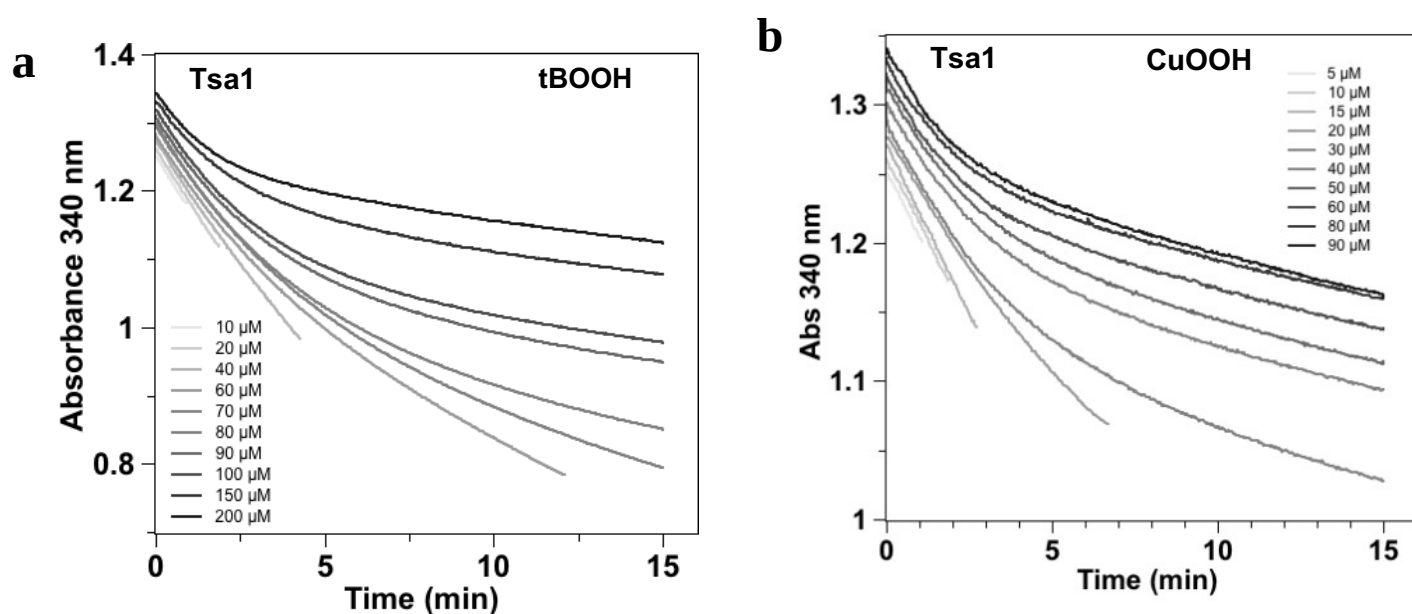


Figure S12. Steady state kinetics for the determination of hyperoxidation sensitivity of Tsa1 with tBOOH monitored by consumption of NADPH (200 μM) at 340 nm in the presence thioredoxin reductase (0.25 μM), Trx1 (5 μM), Tsa1 (1 μM) and variable amounts of (a) tBOOH (from 10 to 200 μM as indicated), and (b) CuOOH (as indicated). The time courses have been shifted on the y-axis for clarity.

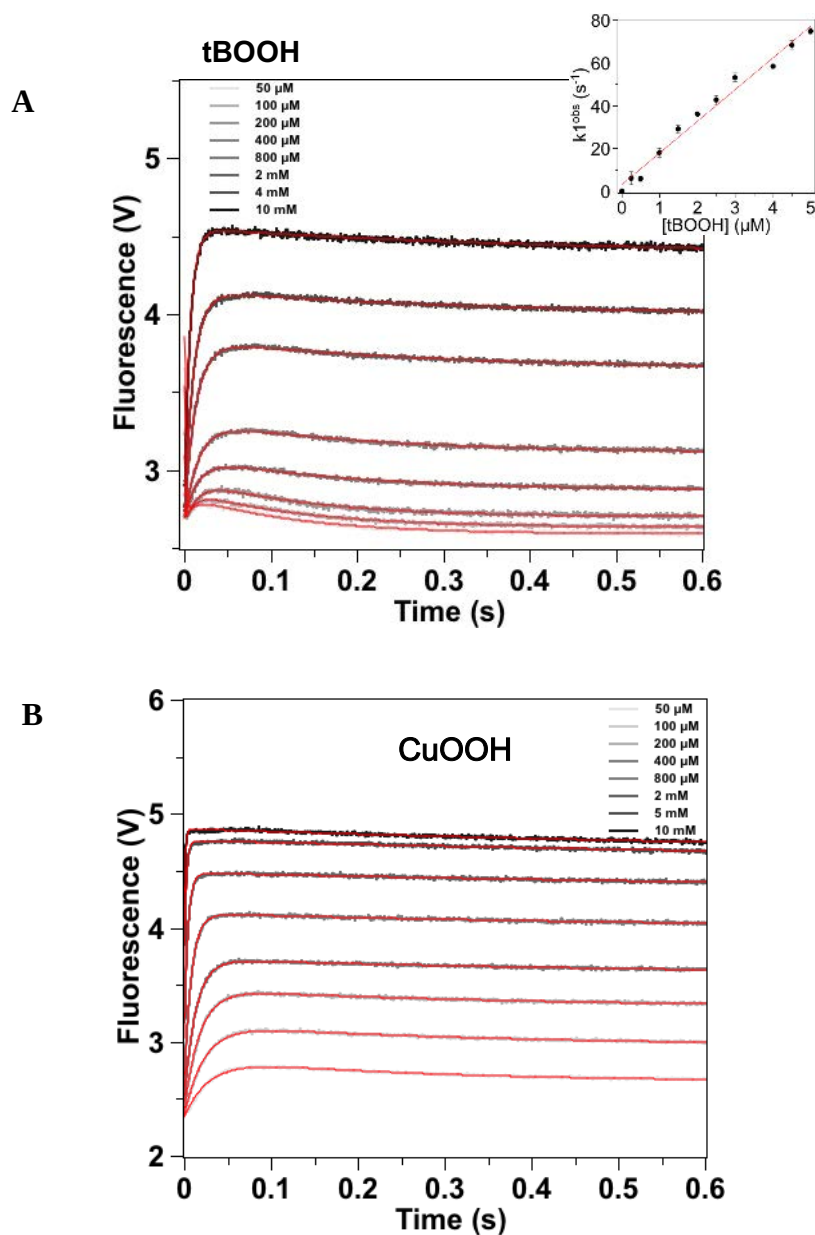


Figure S13. a. Pre-steady state kinetics for the reaction of Tsa1 (5 μM) with tBOOH (as indicated) monitored as in Fig. 2B, fitted against a multiexponential equation (red line). Inset, precise determination of k_1 by second order plot and linear fit of the rate constants k_1^{obs} obtained from kinetics measured for the reaction of Tsa1 (0.5 μM) with low tBOOH concentrations (from 0.5 to 5 μM).

b. Pre-steady state kinetics for the reaction of Tsa1 (5 μM) with CuOOH (as indicated) monitored as in Fig. 2B, fitted against a multiexponential equation (red line)

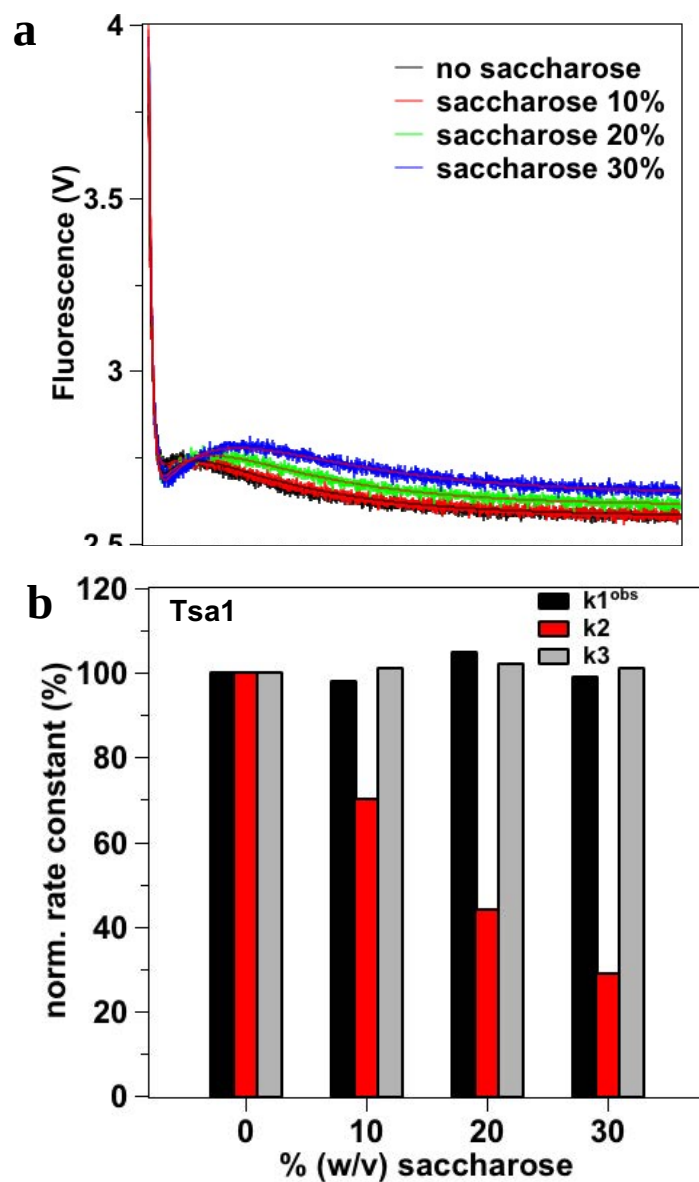


Figure S14. a, effect of saccharose (0% black, 10 % red, 20% green and 30% blue) on the reaction of Tsa1 (5 μ M) with tBOOH (10 μ M) monitored as in Fig. 2b, fitted against a 3-exponential equation (red or black line). b, effect of saccharose concentration on rate constants $k1^{obs}$, $k2$ and $k3$ normalized to 0% saccharose.

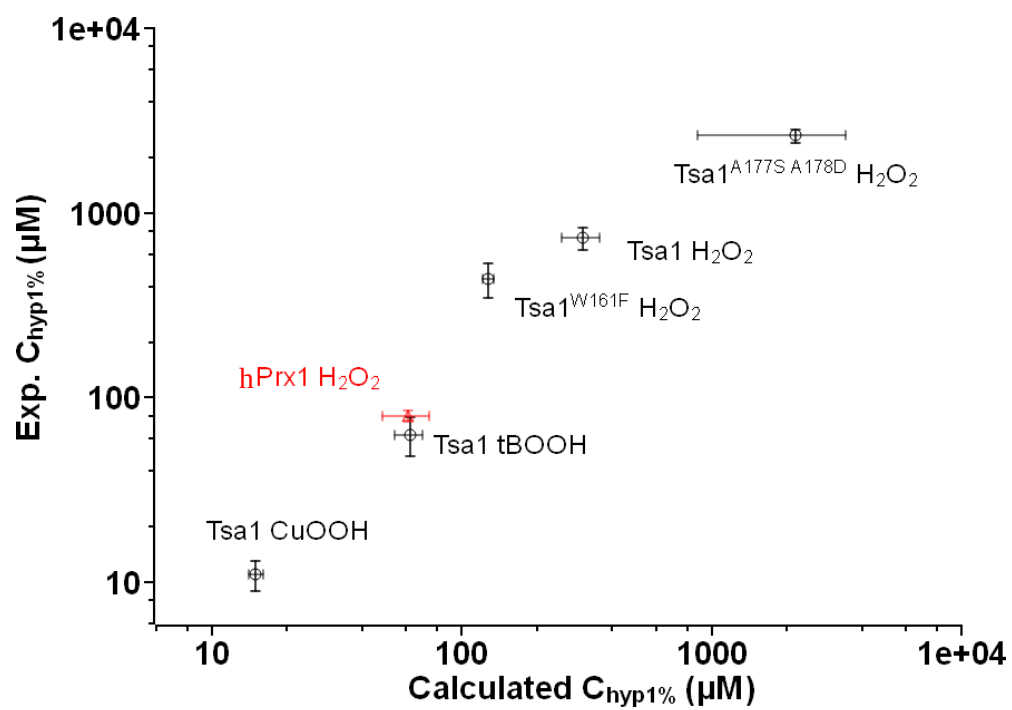


Figure S15. Comparison of the calculated and experimental Chyp1% for wild-type and mutant Prxs

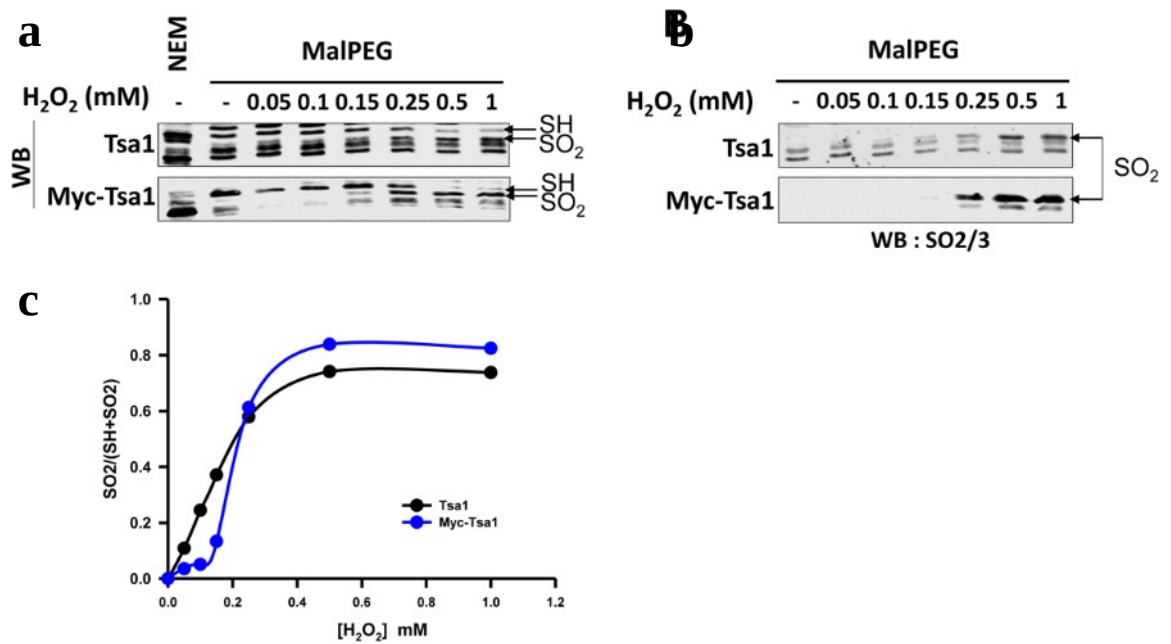


Figure S16. Validation of the mPEG differential cysteine derivatization procedure to monitor Prx hyperoxidation using N-terminal tagged Tsa1 (Myc-Tsa1), and comparison of the reactivity of Myc-Tsa1 and Tsa1 towards H₂O₂. a,b, Thiols were derivatized by NEM or mPEG, as indicated, after reduction with DTT, as described in methods, using cell lysates of $\Delta tsa1$ expressing human Tsa1 or Myc-Tsa1 and exposed to H₂O₂ at the indicated concentration. a, Western blot of reduced (-SH) (2 X mPEG) and hyperoxidized (-SO₂H) (1 X mPEG) forms of Tsa1 and Myc-Tsa1 (indicated by black arrows), revealed with an anti-Prx (Tsa1) or anti-Myc (Myc-Tsa1) antibody. Quantification of the degree of oxidation (SO₂H/ SH + SO₂H) is shown below the western blot (c). b, Western blot of the SO₂H forms of Tsa1 and Myc-Tsa1, using a Prx anti-SO_{2/3} antibody and the cell lysates used in a.

Enzymologie du mécanisme de régulation des Peroxyrédoxines par suroxydation au cours de la signalisation cellulaire redox

La suroxydation des peroxyrédoxines (Prx) est un mécanisme post-traductionnel essentiel impliqué dans la régulation et la signalisation cellulaire redox. Les Prx sont des peroxydases à thiol, qui réagissent avec les peroxydes pour former un intermédiaire acide sulfénique. Leur sensibilité à la suroxydation dépend de la compétition entre la réaction de sulfinylation et la formation d'un pont disulfure au cours du cycle peroxydase. Cette compétition est contrôlée par une transition conformationnelle entre deux conformations FF : structurée et LU : localement déstructurée. Dans ce projet, nous abordons le mécanisme de suroxydation de Tsa1, la principale Prx1 cytosolique de *S. cerevisiae*, par des analyses cinétiques à l'état pré-stationnaire en cinétique rapide, à l'état stationnaire et *in vivo*. Une phase cinétique correspondant à un changement de conformation associé à la transition FF/LU a été identifiée, montrant que la formation de l'acide sulfénique facilite cette transition. L'utilisation de mutants de sensibilité à la suroxydation altérée et de différents substrats peroxydes a permis de montrer que la sensibilité est découplée de l'étape de formation du pont disulfure et ne dépend que des constantes de vitesse de sulfinylation et de transition conformationnelle FF/LU. A partir de ces deux paramètres, nous pouvons prédire l'indice de sensibilité à la suroxydation $C_{Hyp1\%}$, une prédiction démontrée *in vitro* et *in vivo*.

Mots clés : Peroxyrédoxine, acide sulfénique, régulation redox, suroxydation, changement conformationnel.

Enzymology of the regulatory mechanism of Peroxiredoxins by hyperoxidation during redox cell signalling

Peroxiredoxins from the Prx1 subfamily (Prx) are moonlighting peroxidases that operate in peroxide signaling and are regulated by sulfinylation. Prxs offer a major model of protein-thiol oxidative modification. They react with H_2O_2 to form a sulfenic acid intermediate that either engages into a disulfide bond, committing the enzyme into its peroxidase cycle, or again reacts with peroxide to produce a sulfinic acid that inactivates the enzyme. Sensitivity to sulfinylation depends on the kinetics of these two competing reactions and is critically influenced by a structural transition from a fully folded (FF) to locally unfolded (LU) conformation. Analysis of the reaction of the Tsa1 *Saccharomyces cerevisiae* Prx with H_2O_2 by Trp fluorescence-based rapid kinetics revealed a process linked to the FF/LU transition that is kinetically distinct from disulfide formation and suggested that sulfenate formation facilitates local unfolding. Use of mutants of distinctive sensitivities and of different peroxide substrates showed that sulfinylation sensitivity is not coupled to the resolving step kinetics but depends only on the sulfenic acid oxidation and FF-to-LU transition rate constants. From these two parameters, the relative sensitivities of Prxs toward hyperoxidation with different substrates can be predicted, as confirmed by *in vitro* and *in vivo* patterns.

Key words: Peroxiredoxin, sulfinic acid, redox regulation, hyperoxidation, conformation change.