



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'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Samia BOUKHENOUNA**

**Enzymologie des étapes clés de régulation du système Peroxyrédoxine /
Sulfirédoxine dans le contexte de la signalisation cellulaire redox.**

Le 17 Novembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mr Fernando RODRIGUES-LIMA
Mr Bertrand FRIGUET

Professeur, Université Paris Diderot, Paris
Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Examineurs :

Mr Jacques MAGDALOU
Mr Charles TELLIER
Mr Michel B. TOLEDANO

Directeur de recherche, CNRS, Nancy
Professeur, Université de Nantes, Nantes
Directeur de recherche, CEA, Saclay

Directeur de thèse :

Mme Sophie RAHUEL-CLERMONT Chargée de recherche, HDR, CNRS, Nancy

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame Christiane Branlant pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire AREMS (ex : UMR 7214 CNRS-UHP). Je remercie tout particulièrement Monsieur Guy Branlant de m'avoir acceptée dès mon stage de licence dans son équipe d'enzymologie moléculaire et structurale et de m'avoir permis de réaliser ce travail. C'est à travers ses cours que j'ai découvert l'enzymologie et que j'ai appris à aimer cette discipline. Je le remercie également pour les nombreuses discussions scientifiques et pour ses conseils.

Mes remerciements vont également à la nouvelle direction du laboratoire IMoPA (UMR 7365 CNRS-UL) ; Monsieur Jean-Yves Jouzeau et Monsieur Bruno Charpentier qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie tout particulièrement Sophie Rahuel-Clermont, ma directrice de thèse, qui m'a formée, guidée et encouragée de mes débuts au laboratoire jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Nos discussions ont sans aucun doute développé mon esprit critique. Merci pour tout.

Ce travail a été réalisé grâce à une collaboration avec le laboratoire IBITec-S, LSOC du CEA à Saclay, dirigé par Monsieur Michel Toledano. Je tiens vivement à le remercier de m'avoir acceptée dans son laboratoire, de m'avoir fait part de son expérience et de ses précieux conseils. Je remercie également Aeid Igharia qui m'a initiée aux expériences in vivo sur des cellules de levure.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Fernando Rodrigues-lima et Monsieur Bertrand Friguet d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, je les remercie sincèrement. Je remercie aussi vivement Monsieur Charles Tellier et Monsieur Michel Toledano qui ont accepté d'examiner ce travail. Je remercie tout particulièrement Monsieur Jacques Magdalou qui a suivi ce travail de recherche depuis mon stage de master 2, et qui a également accepté d'être examinateur de cette thèse.

Mes remerciements vont également :

À Kira, Christophe, François, Hortense, Arnaud, Benjamin, Séverine, Sabrina et Hélène pour les discussions scientifiques (ou pas scientifiques !), les échanges, les conseils et surtout pour la bonne humeur. Je remercie tout particulièrement Sandrine, qui malgré un emploi du temps surchargé a su trouver le temps pour lire ce manuscrit et me faire part de ses conseils.

À l'ensemble des "enzymologist-boys", anciens (Xavier, Raphael...) et les petits nouveaux (JC, Jack, Omar...) pour les discussions diverses. Pensées spéciales à ; Alex (pour

son enthousiasme, sa grande disponibilité et ses blagues, de vrais moments de coupure !), Marouane (pour son aide et ses conseils), Toinou (pour toutes les discussions et surtout les petits gâteaux dans des sachets fraîcheur), Thib (pour ses blagues, ses chansons ; malgré l'étrange répertoire...TOURNER LES SERVIETTEES...lol), Johny (pour sa présence et son encouragement, et les pauses midi au KMP). Mais également à l'ARN-boy futur kiné, Thomas (pour sa bonne humeur et son aide informatique) et tous ceux qui venaient au box des étudiants. Un grand merci aux membres du laboratoire ex-AREMS et IMoPA.

Les copines d'amour et de toujours, les confidentes attentives qui m'ont souvent aidée à prendre les bonnes décisions (. euh ou pas !) : Zohra et Karima.

À Nacera et Fethi pour leur bonne humeur communicative : Merci pour les encouragements et l'énorme soutien au quotidien. Je remercie aussi Lila pour sa présence, les longues discussions (au tel) et ses encouragements. Bon courage ;)

À Jacqueline, Melissa, Reine, Lina, Caroline et Mathieu, les J-moins-quelques mois ou fraîchement "docteurs" du deuxième étage qui ont fini (ou finiront) par migrer vers la salle de rédaction pour trouver (un peu) plus de calme et surtout de bonne humeur. Merci pour les fous rire. Bon courage.

Un énorme merci à ma famille dont la présence à mes côtés est essentielle. Merci à MAMA et PAPA, mes sœurs ; Nadia et Noria, mes frères ; Nordine, Kadda et Moustapha. À mes neveux.... Vous êtes pour beaucoup dans ma réussite....MERCI.

Enfin, une pensée émue pour mes grands parentsParticulièrement à Sidi qui nous a quitté, Novembre dernier, et qui nous manque beaucoup (rabbi yarhamkoum).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1-Cys-Srx	: sulfirédoxine à une Cys
2-Cys-Prx	: peroxyrédoxine à 2 Cys typique
2-Cys-Srx	: sulfirédoxine à deux Cys
ϵ	: coefficient d'extinction molaire
<i>A. thaliana</i>	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
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	: dithiothréitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ERA	: espèce réactive de l'azote
ERO	: espèce réactive de l'oxygène
FADH ₂	: flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FPLC	: chromatographie liquide moyenne pression
GR	: glutathion réductase
Grx	: glutarédoxine
GSH	: glutathion réduit
GSSG	: glutathion oxydé
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
HsPrx	: peroxyrédoxine d' <i>Homo sapiens</i>
HsSrx	: sulfirédoxine d' <i>Homo sapiens</i>
IPTG	: isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
k_{ADP}	: constante de vitesse de libération de l'ADP
k_{obs}	: constante de vitesse observée
k_{ss}	: constante de vitesse à l'état stationnaire
k_{ssmax}	: constante de vitesse maximale à l'état stationnaire
k_{Trx}	: constante de vitesse de réduction par la Trx
K_M	: constante de Michaelis
LB	: milieu de culture Luria Bertani
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NADP	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NOX	: NADPH oxydase
NEM	: N-éthylmaléimide
PAGE	: électrophorèse en gel polyacrylamide
pK_{app}	: pK apparent
PM	: poids moléculaire
Prx	: peroxyrédoxine
PrxC _P -SOH	: peroxyrédoxine dont la Cys C _P est oxydée sous forme acide sulfénique
PrxC _P -SO ₂ H	: peroxyrédoxine dont la Cys C _P est oxydée sous forme acide sulfinique
PrxC _P -SO-S-CSrx	: complexe formé entre les protéines sulfirédoxine et Prx, liées par une liaison thiolsulfinate
PrxC _P -S-S-C _R Prx	: Prx oxydée sous forme pont disulfure intermoléculaire
RTK	: récepteur à activité Tyr kinase
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScSrx	: sulfirédoxine de <i>S. cerevisiae</i>

SDS	: sodium dodécyle sulfate
SOD	: superoxyde dismutase
SOH	: acide sulfénique
SO ₂ H	: acide sulfinique
SO ₃ H	: acide sulfonique
<i>S. pombe</i>	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Srx	: sulfirédoxine
TCA	: acide trichloroacétique
Tris	: tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trx	: thiorédoxine
TrxR	: thiorédoxine reductase
Tsa1	: 2-Cys-Prx typique majeure de <i>S. cerevisiae</i>
Tsa1C _P -SOH	: Tsa1 dont la Cys C _P est oxydée sous forme acide sulfénique
Tsa1C _P -SO ₂ H	: Tsa1 dont la Cys C _P est oxydée sous forme acide sulfinique
Tsa1C _P -S-S-C _R Tsa1	: Tsa1 oxydée sous forme pont disulfure intermoléculaire

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 FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Origine et effets biologiques des ERO.	5
Figure 2 : Réduction du dioxygène et les principales ERO.	7
Figure 3 : Formation de l'anion superoxyde par les NADPH oxydases.	11
Figure 4 : p66 ^{Shc} génère des ERO pro-apoptotiques dans les mitochondries.	12
Figure 5 : Les différentes voies de formation de novo des liaisons ponts disulfures.	14
Figure 6 : Représentation schématique des différents degrés d'oxydation du soufre des méthionines.	16
Figure 7 : Modifications redox post-traductionnelles de la Cys.	17
Figure 8 : Formes mésomères du groupement sulfinate.	18
Figure 9 : Schéma comparatif des mécanismes réactionnels des systèmes Trx et GSH/Grx.	20
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la Trx oxydée d'E. coli.	21
Figure 11 : Schéma du mécanisme catalytique de la Trx réductase (TrxR).	22
Figure 12 : Structure chimique du GSH.	23
Figure 13 : Régulation de la concentration de GSSG dans le cytoplasme.	23
Figure 14 : Comparaison des mécanismes réactionnels pour les Grx monothiol vs dithiol.	24
Figure 15 : Modèle d'activation du facteur de transcription OxyR par H ₂ O ₂	26
Figure 16 : Redistribution nucléaire et mécanisme d'activation et du facteur de transcription Yap1 par Gpx3/Orp1.	27
Figure 17 : Les ERO en tant que modulateurs de l'activité des RTK.	29
Figure 18 : Mécanisme chimique de formation de la liaison sulfénylamide de la PTP1B.	29
Figure 19 : Modèle de la régulation redox de NF-κB par LC8 et TRP14.	30
Figure 20 : Représentation schématique de la tétrade catalytique des Gpx.	32
Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des différentes familles de Prx.	35
Figure 22 : Schéma du mécanisme catalytique des Prx.	36
Figure 23 : Structure du site actif d'une 2-Cys-Prx typique réduite et sous forme de pont disulfure.	37
Figure 24 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques.	37
Figure 25 : Comparaison de la structure du site actif de 2-Cys-Prx sensibles et résistantes à la suroxydation.	39
Figure 26 : Structures quaternaires des 2-Cys-Prx typiques.	41
Figure 27 : Les gènes TSA1 et SRX1 affectent le vieillissement répliatif de la levure.	42
Figure 28 : Réversibilité de l'oxydation sous forme acide sulfinique de Prx1 in vivo.	43
Figure 29 : Réduction in vivo de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique par Srx1.	44
Figure 30 : Structure tridimensionnelle de la HsSrx.	45
Figure 31 : Structure de l'interface d'interaction Srx/Prx en présence d'ATP et Mg ²⁺	46

Figure 32 : Structure du complexe quaternaire Prx/ATP/Mg ²⁺ /Srx.....	47
Figure 33 : Réduction in vitro de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique par ScSrx.....	48
Figure 34 : Alignement des séquences de Srx de différents organismes.....	50
Figure 35 : Schéma du mécanisme catalytique des 2-Cys-Srx et 1-Cys-Srx.....	51

OBJECTIFS

Figure 36 : Les cycles enzymatiques interdépendants du système 2-Cys-Prx et Srx et les points de régulation étudiés (1, 2, 3).....	57
Figure 37 : Stratégie d'étude du système 2-Cys-Prx/Srx.....	58

RÉSULTATS & DISCUSSION

PARTIE I :

Figure 38 : Schéma du mécanisme et des constantes de vitesse du cycle catalytique des 2-Cys-Prx typiques... 62	62
Figure 39 : Représentation du site actif d'une 2-Cys-Prx typique au sein de l'unité dimérique.....	64
Figure 40 : Spectres d'émission de fluorescence de la Tsa1C _P -SH et de Tsa1C _P -S-S-C _R Tsa1.....	64
Figure 41 : Cinétiques typiques d'évolution du message de fluorescence de la Tsa1 en absence et en présence de H ₂ O ₂ (10 μM).....	66
Figure 42 : Schéma du système couplé Trx/TrxR/NADPH, utilisé pour suivre l'avancement de la réaction de réduction de H ₂ O ₂ par Tsa1 (état stationnaire).	68
Figure 43 : Cinétiques réactionnelles de réduction de H ₂ O ₂ par Tsa1 en présence du système Trx.....	70
Figure 44 : Script utilisé sous le logiciel Dynafit 4.0.....	71
Figure 45 : Exemples d'analyse de k _{SO2} pour la Prx2 humaine par H ₂ O ₂	73
Figure 46 : Représentation schématique des conformations du site actif lors du cycle réactionnel d'une 2-Cys-Prx typique.....	75

PARTIE II :

Figure 47 : Structure chimique de l'analogue du co-substrat ATP ; le γ-thio-ATP.....	79
Figure 48 : Spectres d'émission de fluorescence de la Tsa1C _P -SO ₂ H et Tsa1C _P -S-S-C _R Tsa1.....	80
Figure 49 : Position et nature des résidus participant au site actif au sein du complexe Prx/ATP/Mg ²⁺ /Srx... 88	88
Figure 50 : Schéma hypothétique de l'état de transition de la réaction de transfert du γ-phosphate de l'ATP sur le groupement sulfinique de la PrxC _P -SO ₂ H.....	89
Figure 51 : La structure géométrique plane du fluorure d'aluminium est proche de celle du groupement γ-phosphate de l'ATP au niveau d'un état de transition de type bipyramide trigonale.....	89
Figure 52 : Structure chimique du mant-ADP (2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosine-5'-diphosphate). 92	92
Figure 53 : Suivi de la formation des complexes binaires ScSrx/mant-ADP vs Tsa1C _P -SO ₂ H/ mant-ADP par anisotropie de fluorescence.....	93

Figure 54 : Étude de la formation du complexe $Tsa1C_P-SO_2H/mant-ADP/ScSrx$ par anisotropie de fluorescence.....	95
Figure 55 : Modèle d'assemblage du complexe de type Michaelien $Tsa1C_P-SO_2H/mant-ADP/ScSrx$	95
Figure 56 : Structure chimique du mant-ATP et mant-AMP-PNP.....	97

CONCLUSION GÉNÉRALE

Figure 57 : Bilan des cycles enzymatiques interdépendants du système 2-Cys-Prx et Srx et les points de régulation étudiés.....	122
--	-----

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 58 : Réaction de dosage des groupements thiols avec le DTNB.....	138
Figure 59 : Schéma représentatif du système couplé $Trx1/TrxR/NADPH$ correspondant à un cycle catalytique de $ScSrx_{WT}$ en présence de son substrat $Tsa1C_P-SO_2H$	141
Figure 60 : Schéma représentatif du système couplé $Trx1/TrxR/NADPH$ correspondant à un cycle catalytique de $ScSrx^{C84}$ en présence de son substrat $Tsa1C_P-SO_2H$	142
Figure 61 : Schéma représentatif du système couplé $GSH/Grx/GR/NADPH$ correspondant à un cycle catalytique de $ScSrx^{C84}$ en présence de son substrat $Tsa1C_P-SO_2H$	143
Figure 62 : Schéma de l'invalidation du gène $SRX1$	149

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote impliquées dans les voies de signalisation redox.....	5
1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	5
a) Le radical anion superoxyde.....	6
b) Le peroxyde d'hydrogène.....	6
c) Les hydroperoxydes.....	7
d) L'oxygène singulet.....	8
e) L'oxyde nitrique.....	8
f) H ₂ O ₂ , source d'autres ERO.....	9
(1) Le radical hydroxyle.....	9
(2) L'acide hypochloreux.....	9
2. Sources cellulaires des ERO.....	9
a) La membrane cellulaire et subcellulaire.....	10
b) La mitochondrie.....	11
c) Les peroxysomes.....	13
d) Le réticulum endoplasmique.....	13
II. Les mécanismes moléculaires d'action du peroxyde d'hydrogène et leur régulation.....	15
1. Cibles protéiques.....	15
a) Oxydation des méthionines.....	15
b) L'oxydation du groupement thiol des Cys.....	16
(1) Le pont disulfure.....	17
(2) L'acide sulfénique.....	17
(3) Acides sulfonique et sulfonique.....	18
(4) Le thiolsulfinate.....	19
2. Contrôle cellulaire de la balance redox des thiols.....	19
a) Le système Trx : caractéristiques et fonctions.....	20
b) Le système GSH/Grx : caractéristiques et fonctions.....	22
3. Exemples de systèmes redox impliqués dans les voies de la signalisation cellulaire.....	25
a) Le facteur de transcription OxyR : un exemple classique de signalisation redox.....	25
b) Le système Gpx3/Orp1-Yap1 dans la levure : une peroxydase à thiol en tant que capteur d'H ₂ O ₂	26
c) Les protéines kinases et phosphatases : relation entre les processus de	

phosphorylation et de signalisation redox	27
d) NF- κ B : le premier facteur de transcription des cellules mammifères sous régulation redox	29
III. La signalisation cellulaire par les peroxydes : Le couple Prx/Srx.....	31
1. Contrôle cellulaire des peroxydes.....	31
a) Les catalases.....	31
b) Les glutathion peroxydases « classiques » à SeCys	32
c) Les peroxydases à thiol	33
(1) Les différentes classes de peroxydases à thiol.....	33
(2) Mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques.....	35
(3) Suroxydation des 2-Cys-Prx typiques	37
d) Les 2-Cys-Prx typiques : des enzymes régulées par l'état redox de leur Cys catalytique	39
2. Les Srx : des enzymes à activité sulfinyl réductase.....	43
a) Structure de la Srx isolée et en interaction avec la 2-Cys-Prx typique suroxydée	44
b) Mécanisme catalytique de la Sulfirédoxine	47
(1) Étape d'activation du substrat : activité phosphotransférase de Srx.....	48
(2) Étape réductase.....	48
(3) Étape de recyclage de ScSrx.....	49
c) Rôle physiologique des Srx au niveau cellulaire	51
(1) Rôle dans la régulation de l'activité des 2-Cys-Prx typiques.	51
(2) Rôle dans la déglutathionylation des protéines.....	52
(3) Activité nucléase	53
d) Les sestrines n'ont pas d'activité sulfinyl reductase.	53
OBJECTIFS.....	55
RÉSULTATS & DISCUSSION	59
I. Étude cinétique du mécanisme de suroxydation d'une 2-Cys-Prx typique ...	61
1. Stratégie expérimentale	62
2. Détermination de la constante de vitesse de formation du pont disulfure.....	63
3. Étude de la constante de vitesse de suroxydation	67
4. Discussion et perspectives	72
II. Étude de la première étape du cycle catalytique de la Srx.....	77
1. Identification du processus limitant de l'étape phosphotransférase.....	78
a) Contexte de l'étude.....	78
b) Résumé des travaux	79
c) Publication n°1.....	81
2. Caractérisation du mécanisme de formation du complexe Michaelien.....	88
a) Recherche de composés analogues de phosphate mimant l'état de transition	89

b) Étude de la formation des complexes Prx/Srx/cosubstrat par anisotropie de fluorescence.....	90
(1) Principe de la méthode	91
(2) Étude des complexes binaires.....	92
(3) Étude du mode d'assemblage du complexe de type Michaelien.....	94
3. Discussion et Perspectives	97
III. Étude du mécanisme de recyclage des Srx	100
1. Présentation de la stratégie expérimentale et principaux résultats.....	100
2. Publication n° 2.....	102
CONCLUSION GÉNÉRALE	119
MATÉRIEL & MÉTHODES.....	125
I. Matériel	127
1. Les souches bactériennes d' <i>E coli</i>	127
2. Les souches de la levure <i>S. cerevisiae</i>	127
3. Plasmides pour transformation des bactéries	128
4. Plasmides pour transformation des levures.....	128
5. Les anticorps.....	129
6. Cultures des bactéries.....	129
7. Cultures de levures.....	129
8. Les tampons et solutions d'usage courant.....	130
II. Méthodes	131
1. Mutagenèse dirigée par PCR.....	131
2. Production et purification des enzymes étudiées	131
a) Production et purification des Tsa1 recombinantes portant une étiquette His.....	131
(1) Culture et extraction	132
(2) Chromatographie d'affinité sur complexe Ni ²⁺ (IMAC).....	132
(3) Concentration et conservation	132
b) Production et purification des Tsa1 recombinantes ne portant pas d'étiquette His.	
.....	133
(1) Culture et extraction	133
(2) Chromatographie d'interactions hydrophobes.....	133
(3) Chromatographie échangeuse d'anions	133
(4) Concentration et conservation	134
c) Production et purification des protéines recombinantes ScSrx.	134
(1) Culture et extraction	134
(2) Précipitation au sulfate d'ammonium	134
(3) Chromatographie échangeuse de cations	134

(4) Chromatographie d'interactions hydrophobes.....	135
(5) Concentration et conservation	135
d) Production et purification de la Trx1 d'E. coli.....	135
(1) Culture et extraction	135
(2) Précipitation au sulfate d'ammonium	136
(3) Filtration sur gel (ACA54).....	136
(4) Chromatographie échangeuse d'anions	136
(5) Concentration et conservation	136
e) Production et purification de la Grx1 d'E. coli.....	136
3. Caractérisation biochimique des protéines	137
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. Caractérisation enzymatique	138
a) Oxydation de la cystéine catalytique d'une 2-Cys Prx sous forme acide sulfinique	138
b) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.....	139
(1) Test d'activité de la ScSrx _{WT} via le système couplé Trx1/TrxR/NADPH.	139
(2) Test d'activité de la ScSrx ^{C84} via le système couplé Trx1/TrxR/NADPH.....	140
(3) Test d'activité de la ScSrx ^{C84} via le système couplé GSH/Grx1/GR/NADPH.....	140
c) Détermination des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire.....	144
(1) Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx _{WT} , en fonction du pH	144
(2) Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx ^{C84} , en présence du GSH... 145	
(3) Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx ^{C84} sur gel SDS-PAGE.....	145
(4) Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx ^{C84} par chromatographie en phase inverse C8.....	145
d) Étude de la stabilité des complexes type Michaelien par anisotropie de fluorescence	146
5. Techniques de manipulation des levures	147
a) Transformation de cellules compétentes de levures.....	147
b) Modification génétique des souches de levure	147
c) Analyse des extraits cellulaires	150
(1) Extraction des protéines par lyse à pH acide.....	150
(2) Analyse des formes oxydées des protéines par western blot redox.....	150

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 152

INTRODUCTION

Préambule

La signalisation cellulaire est un processus caractérisé par une série d'événements qui permettent aux cellules de communiquer ou de répondre à une situation physiologique particulière en recevant et en exécutant des messages. La signalisation redox se réfère à un processus dans lequel une concentration physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA) modifie des cibles cellulaires d'une manière réversible, permettant de déclencher une réponse. La concentration de ces espèces oxydantes est "physiologique" dans le sens où elle doit être inférieure au niveau auquel les biomolécules subissent des dommages (1).

En effet, il est actuellement admis que, à des concentrations suffisamment faibles, certaines ERO peuvent jouer le rôle de molécules qui communiquent aux cellules ou au microenvironnement subcellulaire des modifications de conditions redox afin de transmettre des messages spécifiques (2,3). Le message peut être transmis directement, comme c'est le cas chez les micro-organismes, ou indirectement. Dans les cellules de mammifères, des exemples montrent que des stimuli extérieurs tels que l'insuline (4), l'EGF (epidermal growth factor) (5) ou le TNF- α (tumor necrosis factor) (6,7), sont à l'origine de la production transitoire de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) agissant comme un second messager. L'identification de processus de signalisation qui dépendent des conditions redox locales a conduit à une redéfinition de la notion du stress oxydant, initialement décrit comme "trouble" de la balance pro-oxydant vs antioxydant, vers "une perturbation de la signalisation et de l'homéostasie redox" (8). Au niveau moléculaire, des mécanismes ont ainsi évolué pour détecter les changements locaux des conditions redox et convertir ces informations en événements agissant sur des voies de signalisation spécifiques (stimulation ou inhibition).

Ce type de signalisation implique l'existence d'éléments jouant le rôle de « commutateur/détecteur redox », réversibles, interagissant avec différents types de protéines telles que des récepteurs, facteurs de transcription, kinases ou phosphatases. Une famille de peroxydases à thiol, dite peroxyrédoxine (Prx) joue un rôle central dans la régulation des effets cellulaires du peroxyde d'hydrogène, en tant qu'enzymes de détoxification, qu'effecteurs de signalisation ou protéines chaperon. Elles possèdent en outre une propriété unique de suroxydation de la Cys catalytique en acide sulfinique, qui constitue un mécanisme de régulation de leurs fonctions. Ce mécanisme est régulé par une enzyme ATP-dépendante spécifique, la sulfirédoxine (Srx), possédant une activité sulfinyl réductase unique. La compréhension détaillée de l'enzymologie du système Peroxyrédoxine/Sulfirédoxine (Prx/Srx) et de ses connexions avec les systèmes cellulaires redox majeurs, thiorédoxine (Trx)

et glutathion (GSH) apparaît primordiale pour identifier les points clés de régulation de ce système, permettant ainsi, de comprendre son impact biologique, notamment dans l'adaptation à des conditions pathologiques ou au cours des processus de vieillissement.

L'introduction de mon travail de thèse se divise en trois parties : dans un premier temps, je présenterai les différentes ERO, en mettant l'accent sur le peroxyde d'hydrogène. Je détaillerai également dans cette première partie les différentes sources des ERO en illustrant leurs contributions (ou non) dans la signalisation cellulaire. Dans la deuxième partie, je décrirai les cibles protéiques des ERO, puis quelques exemples de systèmes redox impliqués dans la signalisation cellulaire. Enfin, dans la troisième partie, je présenterai l'état des connaissances actuel sur le système Prx/Srx.

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 trois volets distincts. Nous avons, dans la première partie, déterminé les données cinétiques des différentes étapes d'oxydation et de suroxydation de la Cys catalytique d'une classe majeure de peroxyrédoxine de levure, premier élément de régulation du système Prx/Srx. Dans le second chapitre, nous avons étudié la première étape du mécanisme catalytique de Srx dans le but d'identifier les facteurs moléculaires à l'origine de la faible constante catalytique de la Srx. Dans la troisième partie, nous avons entrepris l'étude du mécanisme de recyclage des Srx par une approche *in vitro* et *in vivo* dont les résultats impliquent le rôle du système GSH/Glutarédoxine (Grx) pour les Srx à une Cys (Srx de mammifères et de plantes), et du système Trx pour les Srx à deux Cys (Srx de levures).

Enfin, une Partie « Matériel & Méthodes » est présentée en fin de ce manuscrit.

I. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote impliquées dans les voies de signalisation redox

Les ERO et ERA sont actuellement considérées non seulement comme des coproduits de la respiration aérobie, potentiellement toxiques, mais également comme des médiateurs essentiels dans la signalisation cellulaire redox.

1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les principales ERO produites par les cellules sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) (Figure 1 page 5). Leur réactivité vis-à-vis des composants cellulaires conduit à la formation d'autres radicaux et d'oxydants, tels que les peroxydes lipidiques, le peroxyde nitrite ($ONOO^{\cdot-}$), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et d'autres biomolécules oxydées impliquant des protéines, acides nucléiques et les glucides.

Dans cette partie, j'ai veillé à illustrer les ERO potentiellement candidats à la signalisation cellulaire redox en se fondant sur leur réactivité, taille, charge et diffusibilité.

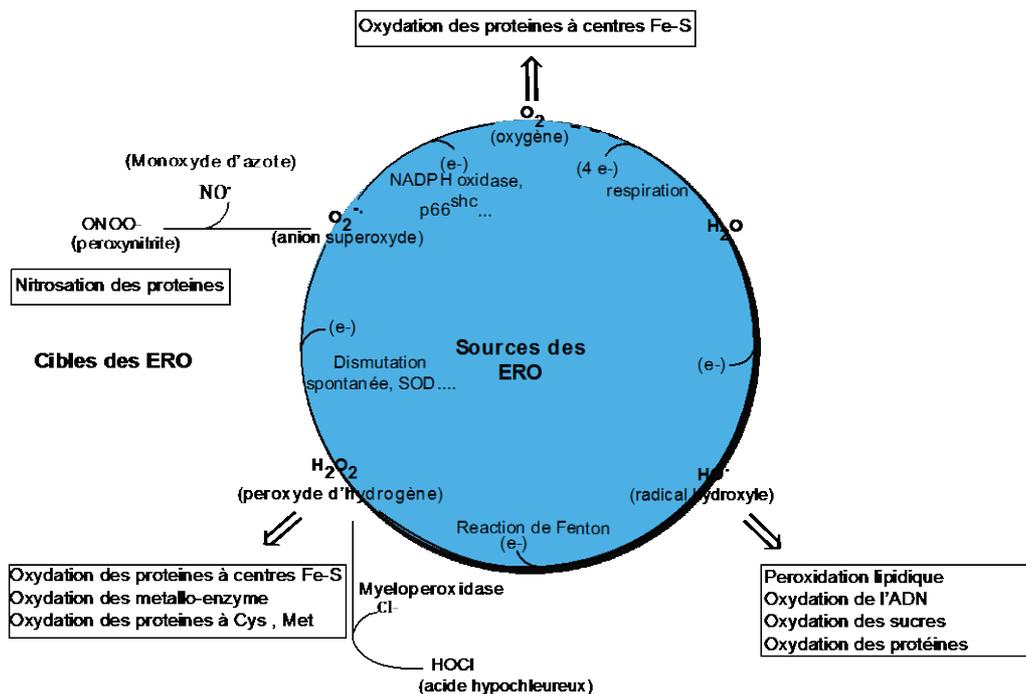


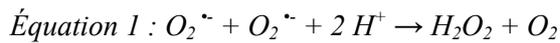
Figure 1 : Origine et effets biologiques des ERO.

H_2O_2 est issu majoritairement de la dismutation de $O_2^{\cdot-}$, qui est lui-même issu d'une réduction mono-électronique de O_2 catalysée par des enzymes telles que ; les NADPH oxydases, $p66^{shc}$ etc. H_2O_2 en présence de Fe^{2+} peut entraîner la formation du radical hydroxyle via la réaction de Fenton. La forte réactivité des ERO renforce leur toxicité tout en diminuant leur potentiel rôle de messenger secondaire dans la signalisation cellulaire, comme c'est cas d' OH^{\cdot} qui est très réactif et réagit de façon non spécifique avec toutes les biomolécules. H_2O_2 réagit modérément avec les centres $[Fe-S]$. En revanche, sa réactivité avec les résidus Cys peut varier de manière significative en fonction de l'environnement protéique. (Adaptée de d'Autréaux et, al., 2007 (9)).

a) *Le radical anion superoxyde*

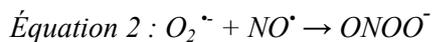
L' $O_2^{\bullet -}$ est le produit de la réduction mono électronique du dioxygène. Cette réaction est catalysée par des enzymes comme par exemple les NADPH oxydases (NOX) ou des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 1 page 5) (cf. § 2 page 9).

Dans la cellule, $O_2^{\bullet -}$ évolue par dismutation en H_2O_2 et O_2 , de façon spontanée ou catalysée par les superoxyde dismutases (SOD) (équation 1), avec dans ce cas une constante de vitesse extrêmement élevée ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), qui est donc limitée par sa vitesse de diffusion (9).



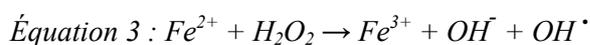
Il est à signaler que $O_2^{\bullet -}$ peut réagir avec les thiols *in vitro*, mais avec des constantes de vitesses faibles ($< 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (11)), ce qui signifie que ces réactions ne peuvent se produire *in vivo*, face à la réactivité des SOD (12). Ainsi, dans les cellules d'*Escherichia coli* (*E. coli*), la concentration de $O_2^{\bullet -}$ à l'état stationnaire est très faible ($\sim 10^{-10} \text{ M}$) (3), probablement en raison de sa forte réactivité avec les protéines à centre [Fe-S]¹ et des réactions de dismutation. Cependant, le radical $O_2^{\bullet -}$ peut réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce qui peut contribuer à la production de OH^{\bullet} toxique *via* la réaction de Fenton (cf. § b) page 6)

Malgré sa charge négative, de récentes études ont montré que $O_2^{\bullet -}$ peut diffuser à travers la membrane *via* des canaux ioniques (13). En particulier, l'anion superoxyde a été montré jouer un rôle de premier plan dans les bactéries comme activateur du facteur de transcription SoxR (protéine à centre [Fe-S]), et par conséquent, être impliqué dans l'induction de plusieurs enzymes antioxydantes (14). De plus, l'action de signalisation de $O_2^{\bullet -}$ peut également être indirecte *via* la réaction avec l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) et de la formation consécutive du peroxynitrite (équation 2).



b) *Le peroxyde d'hydrogène*

H_2O_2 , communément appelé eau oxygénée, est une petite molécule non chargée, dont la production provient principalement de la dismutation de $O_2^{\bullet -}$, spontanée ou catalysée par les SOD. La toxicité de H_2O_2 est essentiellement la conséquence de sa réduction en OH^{\bullet} *via* la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} (Figure 1 page 5, équation 3).



¹ : Les structures les plus courantes sont composés de [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Les centres fer-soufre sont généralement coordonnés par des résidus Cys ou His.

Cependant, H_2O_2 est un oxydant relativement faible (potentiel redox $\sim 0,32$ V). Il réagit modérément avec les protéines à centre [Fe-S] (constantes de vitesse de $\sim 10^2$ à 10^3 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). En revanche, sa réactivité avec les résidus Cys peut varier de manière significative en fonction de l'environnement protéique de la Cys, et atteindre des valeurs de 10 à 10^7 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, notamment dans les Prx (15). Comparé à d'autres ERO, H_2O_2 est relativement stable (temps de demi-vie de quelques ms, concentration cellulaire moyenne de l'ordre de 10^{-7} M). Non chargé, H_2O_2 peut également traverser les membranes *via* des aquaporines, permettant à la molécule de diffuser d'un compartiment à un autre (16,17). H_2O_2 apparaît donc comme le candidat le plus susceptible de jouer un rôle de second messenger dans les processus de signalisation cellulaire, ses effets biologiques pouvant varier en fonction de sa concentration intracellulaire locale, allant de la prolifération cellulaire à l'apoptose (Figure 2 page 5) (18).

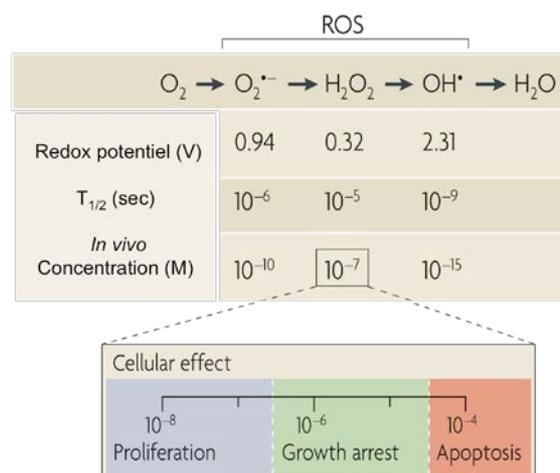


Figure 2 : Réduction du dioxygène et les principales ERO.

L'oxygène existe sous différents états d'oxydation dans la cellule, allant de 0 (O_2) à $-II$ (H_2O). Les ERO ont des propriétés différentes, comme leur potentiel redox, leur temps de demi-vie et leur concentration intracellulaire. Parmi les ERO, H_2O_2 est le moins oxydant et le plus stable. Ses effets biologiques peuvent varier en fonction de sa concentration intracellulaire locale comme illustré dans la partie inférieure de la figure. (D'après M. Giorgio et al., 2007 (18)).

c) Les hydroperoxydes

De même nature que H_2O_2 , les hydroperoxydes lipidiques pourraient jouer un rôle dans la signalisation redox en agissant sur des protéines spécifiques. Les enzymes cyclo-oxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX) jouent un rôle important dans la formation d'hydroperoxydes, qui à leur tour, vont stimuler l'expression de ces enzymes, conduisant à une amplification du processus (1,19). Par exemple, une étude récente conduite sur des

cellules de souris a montré que les hydroperoxydes produits par la LOX-12/15 pouvaient inactiver les protéine tyrosine phosphatases (PTP) par oxydation de la Cys catalytique, avec pour conséquence une augmentation de la signalisation de la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase (20).

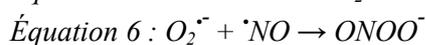
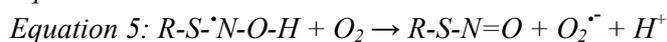
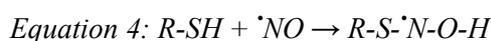
d) L'oxygène singulet

$^1\text{O}_2$ est une forme électroniquement excitée de l'oxygène qui peut réagir et modifier plusieurs résidus acides aminés tels que la Tyr, la Met, l'His, le Trp et la Cys. La forte réactivité de $^1\text{O}_2$ et son temps de demi-vie réduit peuvent cependant, limiter son action comme messenger dans la signalisation cellulaire. Néanmoins, chez les plantes, $^1\text{O}_2$ issu d'un transfert d'énergie entre les formes photo-excitées de la chlorophylle et l'oxygène dans les chloroplastes, constitue une voie de signalisation vers le noyau (21). De plus, les hydroperoxydes lipidiques résultant de l'action de $^1\text{O}_2$ sur des lipides insaturés peuvent également servir de médiateurs dans la signalisation cellulaire dans des cellules de mammifères (22).

e) L'oxyde nitrique

Parmi les espèces réactives de l'azote, l'oxyde nitrique (NO^\bullet) occupe une position centrale. Dans les cellules, NO^\bullet est généré par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). Bien que le mode d'action de NO^\bullet en tant que médiateur le mieux décrit implique l'activation de la guanylate cyclase soluble, qui catalyse la formation du second messenger GMPc (guanosine cyclique-3'-5'-monophosphate), il existe actuellement de plus en plus de preuves que NO^\bullet contribue également à la régulation de la fonction des protéines par nitrosation.

En effet, le NO^\bullet peut réagir directement avec les thiols des résidus Cys pour donner l'intermédiaire radical $\text{R-S}^\bullet\text{-N-O-H}$ (équation 4), qui à son tour réagit avec l'oxygène moléculaire, pour donner $\text{O}_2^{\bullet-}$ et un groupement nitrosothiol (RS-NO) (équation 5). $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut également réagir avec NO^\bullet pour former du peroxyxynitrite (équation 6) (23). En outre, la formation de S-nitrosothiols à partir de NO^\bullet peut également être catalysée en présence de métaux.



En général, de faibles concentrations de NO^{\bullet} favorisent la survie et la prolifération cellulaire, tandis que des niveaux plus élevés favorisent l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose (24).

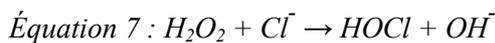
f) H_2O_2 , source d'autres ERO

(1) Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) est le plus réactif des ERO et réagit avec toutes les biomolécules (ADN, protéines, lipides, sucres) de façon non spécifique. Il peut être généré dans la cellule par dissociation du peroxy-nitrite, par coupure homolytique d' H_2O_2 , ou par la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} ou de Cu^+ (équation 3). Cependant, son temps de demi-vie extrêmement faible (10^{-9} s) limite son action aux cibles présentes en son site de production. De fait, ces caractéristiques impliquent que cette molécule ne peut pas jouer le rôle de messenger secondaire dans la signalisation cellulaire redox.

(2) L'acide hypochloreux

L'acide hypochloreux (HOCl) est généré par la myéloperoxydase des cellules polynucléaires neutrophiles, à partir du peroxyde d'hydrogène lors de la réponse inflammatoire, notamment en réponse à une infection (équation 7).



HOCl est un agent oxydant puissant qui peut réagir avec différentes biomolécules, qui sont essentiellement les groupements thiols et Thio éthers (tels que les méthionines) et les protéines à centre $[\text{Fe-S}]$. En particulier, HOCl réagit avec le GSH et l'ascorbate avec des constantes de vitesse supérieures à $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivement (25). Winterbourn *et coll.*, ont montré que de faibles doses de HOCl pouvaient induire des cascades de phosphorylation par la voie des MAP kinases (26), suggérant ainsi un rôle de messenger cellulaire pour cette molécule.

2. Sources cellulaires des ERO

Dans ce paragraphe, sont décrites les sources majeures de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 , dont la contribution à un événement de signalisation a été proposé.

a) *La membrane cellulaire et subcellulaire*

La NADPH oxydase (NOX) a d'abord été identifiée dans des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages, au cours d'un processus qui correspond à une consommation soudaine et considérable de O_2 conduisant à la production d'ERO pour neutraliser les agents pathogènes. Les NOX sont des enzymes membranaires qui 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 $O_2^{\cdot-}$ dans le compartiment externe (27). Après dismutation de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 est produit et peut diffuser à travers la membrane vers l'espace interne (Figure 3 page5). Cependant, la présence de ce type d'enzyme ne se limite pas aux cellules engagées dans la réponse immunitaire innée, puisque des homologues distincts ont été identifiés dans plusieurs tissus (28,29), suggérant le rôle spécifique de cette enzyme dans la signalisation cellulaire redox. En effet, une variété de signaux extracellulaires (EGF, PDGF, Insuline, lipopolysaccharide...etc.) stimulent la production d' H_2O_2 *via* l'activation des NOX et conduisent à une réponse cellulaire spécifique, comme la prolifération, la migration ou la réponse immunitaire.

L'activité des NOX nécessite une sous-unité catalytique, dont il existe sept iso formes humaines connues (NOX1-5, DUOX1 et DUOX2). De plus, la formation d'un complexe actif requiert également l'association avec un ensemble de protéines cytoplasmiques co-activatrices ou de calcium au niveau du domaine intracellulaire (Figure 3 page 11). La classe des DUOX possède en plus des NOX1-5, un domaine extracellulaire possédant une activité peroxydase.

Les complexes NOX sont largement distribués dans plusieurs tissus, et leur emplacement ne se limite pas à la membrane plasmique, puisqu'on en trouve également dans des organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique (ER), le noyau et les mitochondries, suggérant que cette classe d'enzymes est impliquée dans différentes voies de signalisation en fonction du type cellulaire et de leur localisation intracellulaire. La spécificité de la signalisation pourrait aussi être associée à la localisation des NOX dans des régions particulières de la membrane *via* des radeaux lipidiques, permettant la production ciblée d' H_2O_2 dans des micro-domaines cellulaires (1). La formation d'endosomes suite à la stimulation d'un complexe NOX par un facteur de croissance ou une cytokine constituerait un autre mécanisme permettant d'assurer la production ciblée de ROS au sein de « redoxosomes » (30).

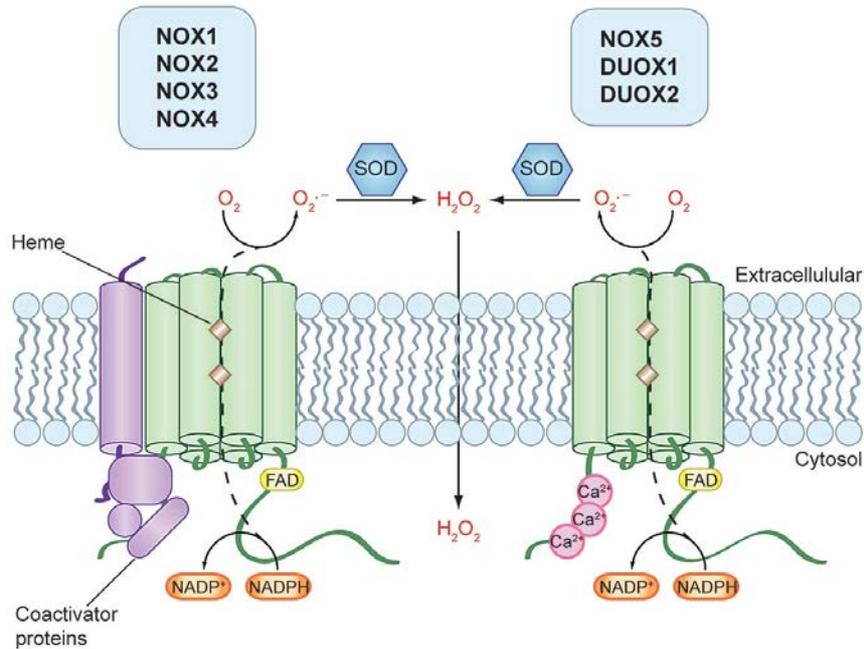


Figure 3 : Formation de l'anion superoxyde par les NADPH oxydases.

La sous-unité catalytique de chacune des deux isoformes des NOXs (NOX 1-4 et NOX5, DUOX1-2) est caractérisée par un domaine transmembranaire constitué de 7 hélices α , qui portent un site de fixation pour deux groupements prosthétiques à hème. La partie C-terminale intracellulaire fixe deux cofacteurs, le FAD et le NADPH. Les électrons issus de l'oxydation du NADPH sont transportés à travers la membrane jusqu'aux groupements pour former $O_2^{\bullet-}$. L'activation de ces enzymes requiert la fixation de co-activateurs protéiques pour NOX 1-4 et Ca^{2+} pour DUOX 1-2 et NOX5. L'ion $O_2^{\bullet-}$ formé se dismute en H_2O_2 qui diffuse à travers la membrane vers le cytosol pour réguler l'activité de protéines cibles impliquées dans la signalisation. (D'après Paulsen et al., 2009 (27)).

b) La mitochondrie

La chaîne mitochondriale de transport des électrons (ETC : electron transport chain) permet le transport des électrons à travers quatre complexes protéiques (I à IV) vers l'oxygène moléculaire, permettant ainsi la création d'un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne. L'énergie de ce gradient est mise à profit pour produire la source primaire d'énergie cellulaire, l'ATP. Cependant, les électrons peuvent s'échapper prématurément de l'ETC en amont du complexe IV, aboutissant à la réduction monovalente de l'oxygène et la production de $O_2^{\bullet-}$.

En outre, d'autres complexes enzymatiques pourraient être impliqués dans la production de l'anion superoxyde dans les mitochondries, comme par exemple les complexes déshydrogénases. En particulier, il a été montré que le complexe α -kétoglutarate déshydrogénase catalyse la production de $O_2^{\bullet-}$ dans les mitochondries (31).

Bien que la production non contrôlée par l'ETC ou par les complexes déshydrogénases soit une source intracellulaire majeure de $O_2^{\cdot-}$ (32), certains des signaux cellulaires peuvent aussi stimuler la production de $O_2^{\cdot-}$ dans les mitochondries. En particulier, l'enzyme $p66^{Shc}$, récemment identifiée dans l'espace intermembranaire des mitochondries, agit comme un régulateur de la mort cellulaire *via* la formation d'ERO. Cette protéine transfère directement les électrons à l'oxygène moléculaire pour donner $O_2^{\cdot-}$, source d' H_2O_2 (Figure 4 page 12) qui agit en tant que molécule de signalisation et induit l'apoptose (33). La protéine $p66^{Shc}$ joue ainsi le rôle de déterminant génétique de la durée de vie chez les mammifères (34).

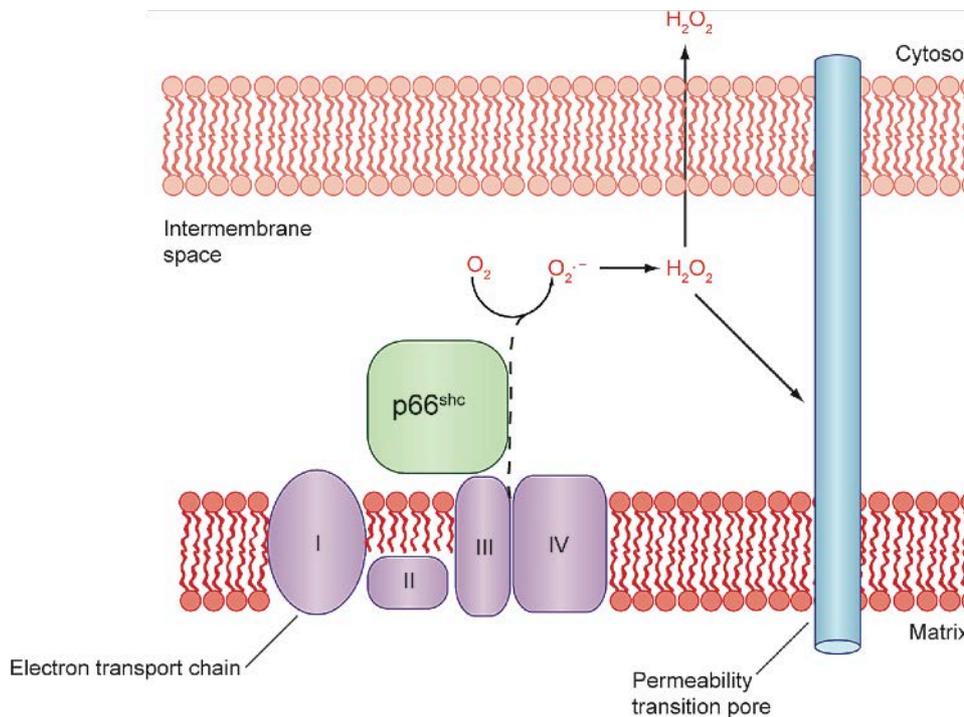


Figure 4 : $p66^{Shc}$ génère des ERO pro-apoptotiques dans les mitochondries. En réponse à un stress oxydatif ou à un rayonnement UV, $p66^{Shc}$ se transloque dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et génère $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Ce dernier, peut diffuser à travers la membrane mitochondriale externe vers le cytosol où il peut moduler l'expression de différentes protéines de l'arsenal antioxydant. H_2O_2 produit par $p66^{Shc}$ stimule également l'ouverture de pores contrôlant la perméabilité de la membrane mitochondriale, provoquant par conséquent l'apoptose. (D'après Paulsen et al., 2009 (27)).

De façon analogue, le modulateur 1 des ERO (Romo1) est une protéine mitochondriale pouvant moduler la production des ERO associée au complexe III de l'ETC (35) et jouer un rôle dans la mort cellulaire par apoptose sur des cellules humaines (36,37).

Il est important de noter que les mitochondries sont à la fois des producteurs et des consommateurs d' H_2O_2 contenant un arsenal d'enzymes antioxydantes, incluant des Prx et

des glutathion peroxydases (Gpx) (1). La concentration résultante d' H_2O_2 libérée par les mitochondries est donc étroitement régulée par la balance production vs élimination.

c) Les peroxysomes

Chez les mammifères, les peroxysomes sont des organites impliqués non seulement dans le catabolisme cellulaire (38), mais aussi dans des voies de biosynthèse. Outre leurs rôles essentiels notamment dans la β - et α -oxydation des acides gras ou le métabolisme des acides aminés, ces organites ont également un rôle important dans la production des ERO, en particulier H_2O_2 . En effet, plusieurs enzymes des voies métaboliques peroxysomales génèrent des ERO comme sous-produits, comme les oxydases telles que l'acyl-CoA oxydase, la D-amino-acide oxydase, la L- α -hydroxy-acide oxydase et la xanthine oxydase. En particulier, la xanthine oxydoréductase (XOR) convertit l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, avec production concomitante d' H_2O_2 , ou $\text{O}_2^{\cdot-}$.

D'autre part, les peroxysomes contiennent des enzymes antioxydantes telles que les catalases, la superoxyde dismutase à centre cuivre-zinc (SOD1), la glutathion S-transférase microsomale (GST) et une classe de Prx (Prx 5), de sorte que, comme dans les mitochondries, il existe un équilibre entre la production et l'élimination des ERO. Néanmoins, il a été montré que 20 à 60 % d' H_2O_2 produit diffuse dans le cytosol, indiquant que ces organites sont potentiellement des sources importantes de ROS cellulaire. Le lien entre cette source d'ERO et la signalisation redox a été établi pour la voie du facteur de transcription NF- κ B dans des cellules cos-1 (39).

d) Le réticulum endoplasmique

Au sein de ce compartiment, la formation des ponts disulfures dans les protéines nouvellement synthétisées est catalysée par une réaction d'échange de ponts disulfures, par les enzymes de la famille des protéine-disulfure isomérases (Figure 5 page 14). A l'issue de ce processus, ces enzymes doivent être ré-oxydées. Plusieurs mécanismes de recyclage ont été identifiés, impliquant notamment la sulfhydryle oxydase ou thiol oxydase (SOX) ERO1, une flavoprotéine qui utilise l'oxygène moléculaire en tant qu'accepteur final d'électrons, conduisant à la production d' H_2O_2 (40). Une autre famille de SOX, les Quiescin-sulfhydryl oxydase (QSOX) peut catalyser directement l'oxydation des thiols en disulfures avec production concomitante d' H_2O_2 (Figure 5 page 14).

De façon intéressante, il a été montré récemment qu'une classe de Prx localisée dans

le RE (Prx4), pouvait également catalyser la ré-oxydation de la PDI, en présence d' H_2O_2 .

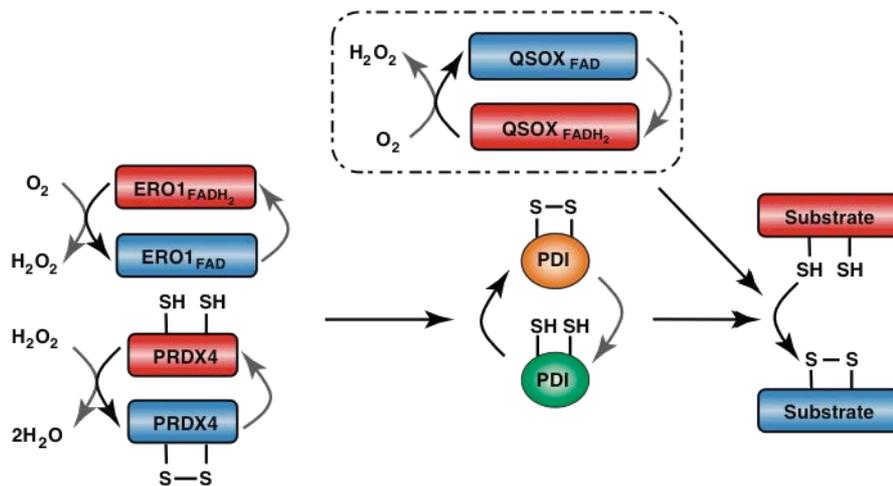


Figure 5 : Les différentes voies de formation de novo des liaisons ponts disulfures. *QSOX* contrairement à *Ero1* et *Prx4* (*PRDX4*), n'oxyde pas la *PDI* mais oxyde directement leurs substrats. *ERO1* et *QSOX* sont des sulfhydryles oxydases qui utilisent la réduction de l'oxygène dans la formation de liaisons disulfures via un mécanisme d'oxydation du groupement FADH_2 . La forme réduite des molécules est indiquée en rouge et la forme oxydée en bleu, à l'exception de la famille *PDI* (vert ; réduite, orange, oxydé). Les flèches noires indiquent le flux d'équivalents oxydants, et les flèches grises le flux de réduction (c.-à-d. des électrons). (Adaptée de Neil et al., 2011 (41)).

II. Les mécanismes moléculaires d'action du peroxyde d'hydrogène et leur régulation

1. Cibles protéiques

La plupart des classes de biomolécules sont sensibles à l'oxydation. Cependant, aux concentrations compatibles avec un processus de signalisation, les acides aminés soufrés des protéines, en particulier la Cys, constituent les cibles cellulaires majeures d' H_2O_2 . L'atome de soufre, comme l'atome d'oxygène, est dans la classification périodique des éléments un chalcogène, avec la configuration électronique suivante à l'état fondamental : $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p^4$. La disponibilité de l'orbitale $3d$ permet une expansion des états d'oxydation du soufre (42). Au niveau des protéines, le soufre est retrouvé sous forme de thiol dans les Cys et sous forme de sulfure dans les Met. La polarisabilité de l'atome de soufre confère à ces deux acides aminés un pouvoir nucléophile. De plus, le soufre joue un rôle crucial dans les métalloprotéines, pour les résidus Cys, en tant que ligand d'ions métalliques et au niveau des clusters [Fe-S]. La versatilité de la chimie du soufre est ainsi impliquée dans de nombreux processus biologiques, incluant la catalyse enzymatique et la transduction du signal.

a) Oxydation des méthionines.

La méthionine peut subir deux degrés d'oxydation (Figure 6 page 16). Le premier état d'oxydation, forme majoritaire *in vivo*, est la méthionine sulfoxyde (MetSO, état d'oxydation 0 du soufre) qui est réduite enzymatiquement. Le second état d'oxydation est la méthionine sulfone (état d'oxydation +II du soufre) qui n'est pas réduite enzymatiquement d'après les connaissances actuelles.



thionine
(-II)

Méthionine sulfoxyde
(0)

Méthionine sulfone
(+II)

Figure 6 : Représentation schématique des différents degrés d'oxydation du soufre des méthionines.

Les résidus Met accessibles au solvant sont oxydés beaucoup plus facilement que ceux enfouis au sein d'une protéine. L'oxydation des Met en surface ne semble pas avoir un effet marqué sur la conformation d'une protéine (43), sauf si ce résidu est situé dans un site actif ou dans une poche de liaison (c'est le cas par exemple de l' α 1-antiprotéinase (44)). Par contre, l'oxydation des Met enfouies au sein de régions hydrophobes des protéines peut engendrer des changements conformationnels locaux marqués, pouvant aller dans certains cas jusqu'à la perte de la fonction. Ainsi, l'oxydation de résidus Met est décrite comme étant impliquée dans l'étape de reconnaissance des protéines non fonctionnelles à dégrader par le protéasome (45), dans des mécanismes de modulation de la fonction de certaines protéines comme par exemple la calmoduline, et comme un mécanisme de détoxication qui piègerait les ERO en protégeant d'autres résidus situés à l'intérieur de la structure tridimensionnelle (43,46). L'oxydation de résidus Met pourrait également jouer un rôle dans certaines voies de signalisation en réponse à un excès d'oxydants dans la cellule (47).

Il existe des systèmes de réparation des méthionines sulfoxydes, les méthionine sulfoxyde réductases (Msr) qui sont impliquées dans la résistance au stress oxydant, dans la réparation des protéines oxydées notamment au cours du vieillissement (48,49).

b) L'oxydation du groupement thiol des Cys

Le groupement thiol des Cys, dans lequel l'atome de soufre est réduit à son état d'oxydation le plus faible (-II), est facilement oxydable et peut exister sous de nombreuses formes d'oxydation (Figure 7 page 17). Ainsi, ces modifications oxydatives, lorsqu'elles sont réversibles, peuvent constituer un commutateur modulant la fonction de la protéine, un processus qui s'apparente à la phosphorylation des protéines. En outre, il est à signaler que le groupement thiol est réactif sous forme thiolate.

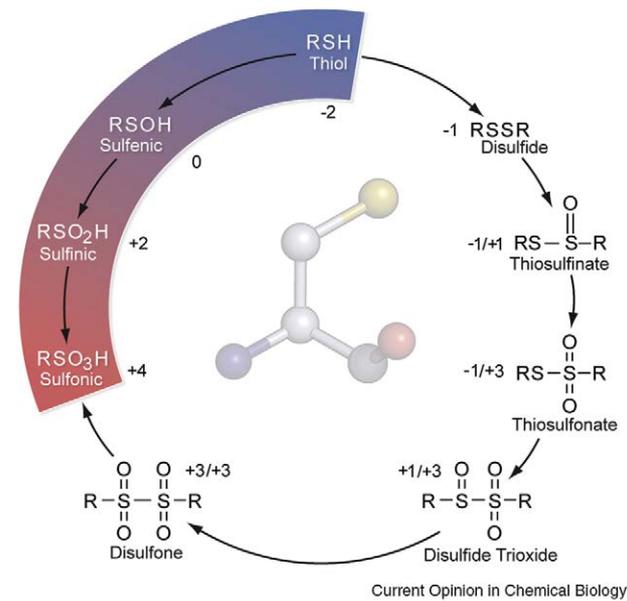
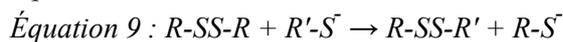


Figure 7 : Modifications redox post-traductionnelles de la Cys.

Le nombre d'oxydation de l'atome du soufre dans chacune de ces formes de Cys est indiqué en chiffre arabe. (D'après S. Carroll et al., 2008 (42))

(1) Le pont disulfure

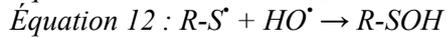
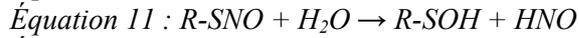
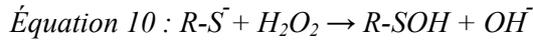
La forme d'oxydation du groupement thiol la plus commune est le pont disulfure. Les liaisons disulfures sont relativement stables et sont souvent impliquées dans le maintien de la structure de nombreuses protéines. On peut citer par exemple, les ponts disulfure formés entre les chaînes lourdes et légères des anticorps (42). Les ponts disulfure sont issus de la réaction d'un thiolate avec un thiol oxydé sous forme acide sulfénique (équation 8). De plus, le processus d'échange thiol/disulfure, réversible (équation 9), est impliqué dans la catalyse enzymatique, notamment dans le repliement oxydatif des protéines au niveau du RE, mentionné dans le § I.I.2.d) page 13 et dans de nombreuses réactions associées à la signalisation cellulaire redox (cf. § 3 page 25).



(2) L'acide sulfénique

La forme acide sulfénique est considérée comme un intermédiaire vers d'autres états d'oxydation car cette forme est instable et très réactive, en raison de ses propriétés nucléophiles et électrophiles. Les acides sulféniques sont formés par la réaction d'un anion thiolate avec le peroxyde d'hydrogène (équation 10) ou d'autres oxydants biologiques tels que

le peroxydinitrite ou l'acide hypochloreux (50) (équation 13). Les acides sulféniques peuvent également résulter de l'hydrolyse de S-nitrosothiols (équation 11) ou de la condensation d'un radical thiyle et du radical hydroxyle (équation 12).



La constante de vitesse d'oxydation de la Cys en acide sulfénique dans les protéines par le peroxyde d'hydrogène peut aller de 10 à $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en fonction de l'environnement moléculaire du groupement thiol (3). Ceci peut conférer une sélectivité d'oxydation de certaines protéines qui est mise à profit dans les mécanismes de signalisation redox, comme nous le verrons dans le § 3 page 25.

(3) Acides sulfinique et sulfonique

En plus de son rôle en tant qu'intermédiaire clé dans la formation de ponts disulfures, un acide sulfénique peut subir des oxydations supplémentaires sous forme d'acide sulfinique ($R-SO_2H$) et d'acide sulfonique ($R-SO_3H$), dans lesquels le soufre se trouve à l'état d'oxydation +II et +IV, respectivement (Figure 7 page 17). Les études cinétiques montrent que le pK_a de l'acide sulfénique a été estimé entre 6 et 10, et pourrait donc également être modulé en fonction de l'environnement protéique (50).

A pH physiologique, l'acide sulfinique est déprotoné ($pK_a \approx 2$) et peut être représenté sous deux formes mésomères (Figure 8 page 18). La charge partielle positive portée par le soufre est supérieure dans cette forme (Figure 8 page 18, (b)) par rapport à celle de l'acide sulfénique (42). De ce fait, les acides sulfiniques et sulfoniques, à la différence des acides sulféniques, sont des dérivés d'oxydation plus stables et ne peuvent être réduits directement par les thiols. A l'exception d'une classe de Prx, l'oxydation des protéines en acide sulfinique est considérée comme irréversible dans la cellule, comme c'est le cas dans quelques protéines telles que la diamine oxydase (DAO), la protéine de la maladie de Parkinson DJ-1 et la SOD1 (42).

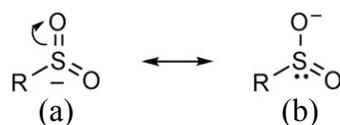
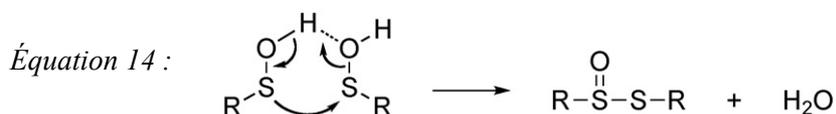


Figure 8 : Formes mésomères du groupement sulfinique.

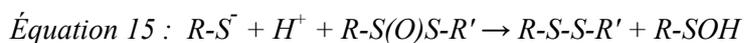
Dans le cas particulier d'une classe de Prx appelée 2-Cys-Prx typique, la forme acide sulfonique est réduite par la Srx, et représente un mécanisme de régulation redox des Prx. La description du système Prx/Srx qui fait l'objet de ce travail, sera détaillée dans la section III page 31. Par contre, la forme acide sulfonique n'est pas réduite enzymatiquement d'après les connaissances actuelles.

(4) Le thiolsulfinate

Le thiolsulfinate correspond à une espèce disulfure S-monoxyde, qui peut résulter de la condensation de deux acides sulféniques (équation 14). Le nombre d'oxydation formel des atomes de soufre formant cette liaison est de +I pour le soufre portant l'oxygène (ou soufre sulfinyl) et de -I pour le second soufre (ou soufre sulfényl).



Les thiolsulfates sont réactifs vis-à-vis des nucléophiles, en particulier les thiols (50,51). *In vitro*, sur des modèles chimiques, l'attaque d'un thiolate se fait de façon préférentielle sur le soufre sulfényl de la liaison thiolsulfinate et aboutit à la libération d'un acide sulfénique et d'une espèce disulfure mixte (51,52) (équation 15).



Par contre, lors de l'hydrolyse du thiolsulfinate, l'attaque de OH^- ne se fait pas au niveau du soufre sulfényl, comme le thiolate, mais au niveau du soufre sulfinyl; ceci conduit à la libération d'un thiol et d'une espèce acide sulfonique (50).

La formation d'un thiolsulfinate en tant qu'intermédiaire enzymatique, suite à la réaction entre un thiolate et un acide sulfonique activé a été démontrée dans le mécanisme catalytique de la Srx (53,54) (cf. § 2 page 43).

2. Contrôle cellulaire de la balance redox des thiols

L'équilibre cellulaire de la balance redox des thiols est contrôlé par deux systèmes d'oxydo-réduction majeurs, le système GSH/Glutarédoxine (Grx) et le système Trx (Figure 9 page 20). Ces deux voies utilisent les électrons issus du NADPH (potentiel redox : -315 mV) pour réduire des protéines cibles.

Des approches génétiques sur des cellules procaryotes (*E. coli*) (55) et eucaryotes (*S.*

cerevisiae) (56) ont montré une redondance fonctionnelle des deux systèmes. En effet, une étude *in vivo* réalisée par l'équipe de J. Beckwith (55), montre que *E. coli* nécessite soit une Trx fonctionnelle ou le système GSH/Grx pour réduire les ponts disulfures qui se forment au cours de chaque cycle catalytique pour une enzyme essentielle à la survie : la ribonucléotide réductase. Toute fois, il est à signaler que dans les cellules eucaryotes, le GSH joue également un rôle critique dans le métabolisme du fer, un processus essentiel à la survie de la cellule eucaryote, mais qui n'est pas décrit pour les cellules procaryotes. Dans les cellules de *S. cerevisiae*, et à très faible concentration en GSH, le système Trx ne compense pas le système GSH/Grx (57).

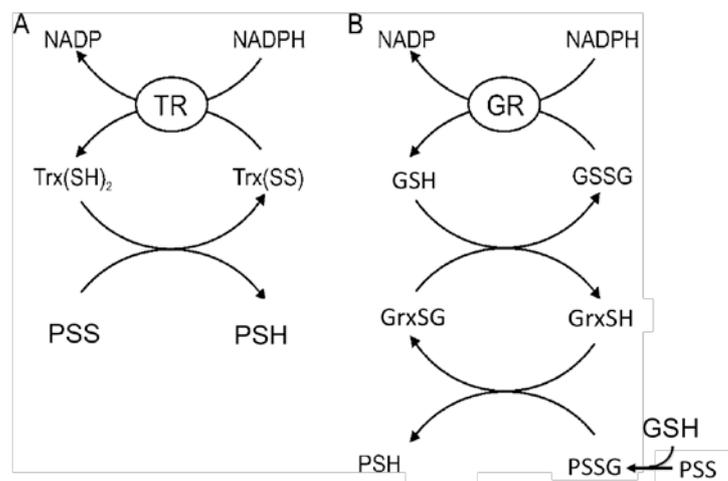


Figure 9 : Schéma comparatif des mécanismes réactionnels des systèmes Trx et GSH/Grx. (A) La Trx oxydée (TrxSS) est réduite par la TR en utilisant le NADPH comme source d'équivalents réducteurs. (B) La GrxSG est réduite par le GSH. Le GSSG est réduit par GR en utilisant le NADPH comme source d'équivalents réducteurs. PSS : protéine oxydée sous forme pont disulfure, PSH : protéine réduite (D'après Pillay et al., 2009 (58)).

a) Le système Trx : caractéristiques et fonctions.

L'activité thiol-transférase des Trx dépend de la présence de deux Cys vicinales au sein du motif CXXC localisé entre un brin β et le début d'une hélice α du repliement typique des Trx (Figure 10 page 21). La réaction consiste en une substitution nucléophile au cours de laquelle la Cys N-terminale de ce motif attaque un atome de soufre du pont disulfure cible pour former un intermédiaire disulfure mixte. Dans une seconde étape, la Cys C-terminale du motif réduit cet intermédiaire par une attaque nucléophile sur la Cys N-terminale, libérant la cible réduite et la Trx sous forme oxydée. Le potentiel d'oxydoréduction de la Trx est de l'ordre de -270 mV à pH 7 (59), ce qui lui permet de réduire efficacement les liaisons

disulfure d'une grande variété de protéines oxydées sous forme ponts disulfures (55). La Trx est donc considérée comme une protéine oxydoréductase à large spectre. Dans le système Trx, les électrons sont transférés à partir du NADPH à la Trx réductase (TR) vers la Trx qui catalyse la réduction de protéines cibles oxydées sous forme pont disulfure. Parmi les nombreuses enzymes utilisant comme réducteur la Trx figurent : la ribonucléotide réductase, les Msr, et les Prx.

La TR est une flavoprotéine homodimérique dont la structure est organisée « tête-bêche ». Elle possède un motif CVNVGC situé à l'extrémité N-terminale, qui interagit avec un motif sélénoCys/Cys à l'extrémité C-terminale de la seconde sous-unité (Figure 11 page 22) (60). *S. cerevisiae* possède deux isoformes de TR localisées dans le cytosol (TR1) et dans les mitochondries (TR2). De même, les Trx, substrats de TR, se retrouvent à la fois dans le cytosol (Trx1, Trx2) et les mitochondries (Trx2). Les TR de mammifères, en plus de leur substrat naturel, peuvent aussi réduire d'autres cibles protéiques possédant un repliement de type Trx (61).

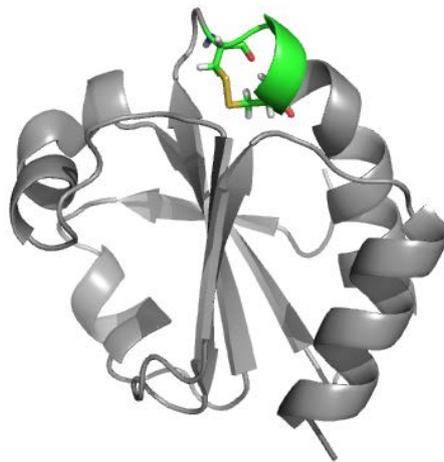


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la Trx oxydée d'*E. coli*. Les atomes de soufre formant un pont disulfure du motif CGPC sont indiqués en jaune. (PDB : 1xoq). (D'après Jeng et al., 1994 (62)).

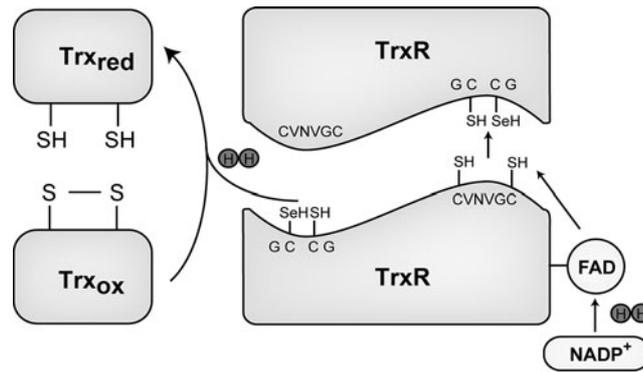


Figure 11 : Schéma du mécanisme catalytique de la Trx réductase (TrxR).

Le NADPH réduit le FAD lié à l'une des deux sous-unités de l'enzyme. Les équivalents réducteurs sont transférés au motif dithiol -CVNVGC- dans le site actif de la même sous-unité. Ce motif dithiol réduit le motif sulfure-sélénenyl C-terminal de l'autre sous-unité de l'homodimère. Le sélénothiols réduit le pont disulfure de la Trx oxydée. (D'après Lee et al., 2011 (63).

De façon plus générale, au-delà de leur rôle dans le recyclage d'enzymes redox, les Trx interagissent avec des molécules de signalisation régulées par oxydation, comme par exemple les facteurs de transcription Yap1 chez la levure, ou NF- κ B chez les mammifères, ou encore des protéines clés de voies de signalisation à activité kinase ou phosphatase (63) (cf. § 3 page 25). Le système Trx constitue donc un élément central de régulation et de communication redox dans la cellule.

b) Le système GSH/Grx : caractéristiques et fonctions

Le système GSH/Grx est constitué du NADPH, de la glutathion réductase (GR), la Grx et de GSH (Figure 9 page 20). Contrairement à la Trx qui est réduite directement par la TrxR, la Grx quant à elle est réduite par le GSH qui est à son tour réduit par la GR.

Le GSH est un tri-peptide (γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine) (Figure 12 page 23), sa biosynthèse chez *S. cerevisiae* se déroule en deux étapes ATP-dépendantes. La première réaction est catalysée par l'enzyme γ -glutamylCys synthétase (*GSH1*), qui constitue l'étape limitante de la biosynthèse, et la seconde nécessite la glutathion synthétase (*GSH2*) (57). Le GSH existe majoritairement sous forme réduite dans le cytoplasme et intervient dans le maintien du potentiel redox cellulaire et l'assemblage des centres [Fe-S].

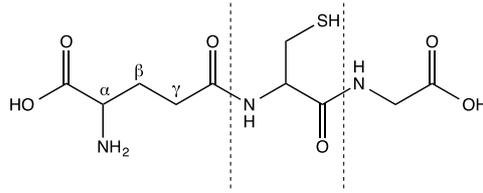


Figure 12 : Structure chimique du GSH

En effet, Morgan *et al.*, (64) ont montré que dans des cellules de *S. cerevisiae* le GSH oxydé (GSSG) est sélectivement stocké dans des vacuoles. Le rapport élevé en GSH réduit / GSSG dans le cytoplasme même dans des conditions de stress oxydatif est maintenu non seulement par l'action de la GR, mais également par des transporteurs membres de la famille des ABC ATP-dépendants codées par le gène *ycf1*, qui sont impliqués dans la séquestration du GSSG dans ces vacuoles (Figure 13 page 23).

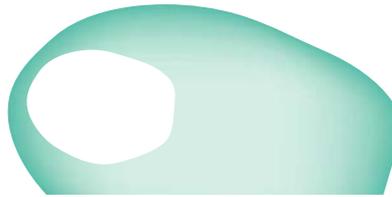


Figure 13 : Régulation de la concentration de GSSG dans le cytoplasme. Dans le cytosol, un rapport élevé GSH réduit/GSSG est maintenu à la fois par la GR (*Glr1*) et le transporteur membranaire *YCF1* qui joue un rôle important dans la séquestration vacuolaire du GSSG. (D'après Winther *et al.*, 2013 (65)).

Dans la levure, le système GSH/Grx contient une GR (*Glr1*) et deux classes de Grx qui sont des petites protéines à thiol apparentées aux Trx. La Grx1 et Grx2 caractérisées par le motif dithiol -CPYC- (66), et Grx3, Grx4 et Grx 5 possédant un motif -CGFS- (57). Il existe en fait, deux mécanismes majeurs de réduction par le système GSH/Grx dits « monothiol » et « dithiol », qui se différencient par la nature du premier attaquant sur la protéine cible oxydée (GSH vs Grx Figure 14 page 24). Dans le mécanisme monothiol, qui prévaut, la cible protéique oxydée est réduite par le GSH, ce qui conduit à un intermédiaire glutathionylé, dont la réduction est catalysée par la Grx.

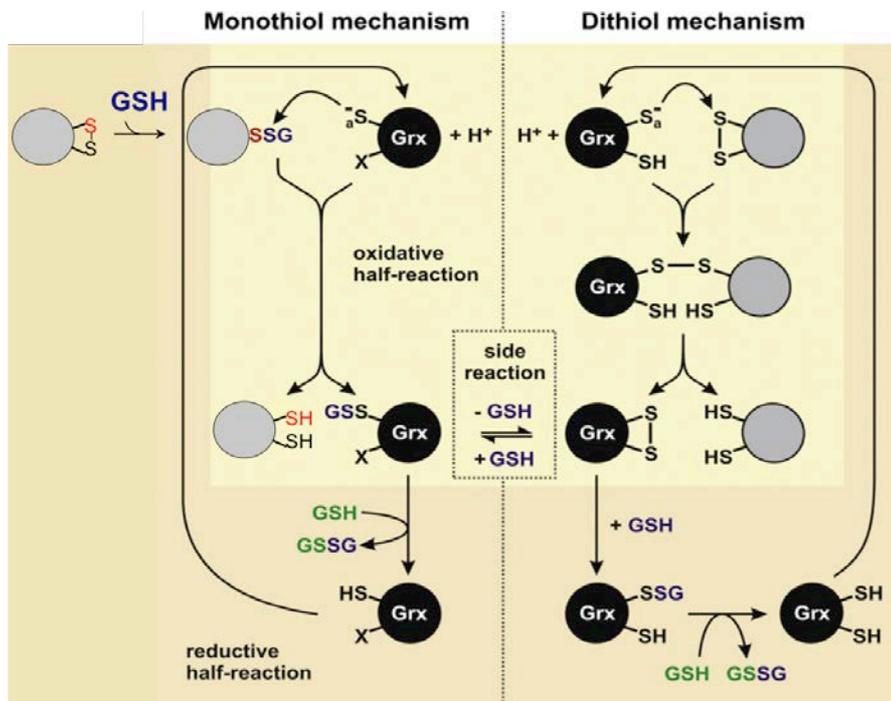


Figure 14 : Comparaison des mécanismes réactionnels pour les Grx monothiol vs dithiol. Le mécanisme monothiol se caractérise par un substrat glutathionylé et le mécanisme de dithiol par un substrat sous forme pont disulfure (côté gauche et droit, respectivement). Une seule Cys est impliquée dans le mécanisme de monothiol. (D'après Deponte 2013 (67)).

Dans le mécanisme dithiol, les Grx catalysent la réduction de ponts disulfure et sont probablement capables de remplacer la Trx pour la réduction de certaines cibles comme la ribonucléotide réductase (RNR), mais leurs substrats spécifique *in vivo* sont encore peu étudiés (57). Cependant, les Grx sont généralement des réducteurs moins efficaces pour les ponts disulfures que les Trx (68), ce qui est probablement lié à leur potentiel redox (Grx1 : -233 mV ; Grx3 : -198 mV dans *E. coli*) (55) plus élevés que celui des Trx.

En plus de son rôle important dans la réduction des ponts disulfure (67), le système GSH/Grx apparaît jouer un rôle vital dans la survie de la cellule eucaryote, en raison de son implication dans le métabolisme du Fer. De façon surprenante, Kumar *et al.*, (69) ont montré que les souches de levure invalidées en *GSH1* et cultivées en absence de GSH, ne sont pas viables à la fois en conditions aérobie et anaérobie, contrairement à *E. coli* (69). Cette fonction essentielle exercée par le GSH, non compensée par la voie de la Trx, n'est pas associée au stress oxydant ou à la synthèse de l'ADN (69,70), mais à un défaut d'assemblage des protéines à centre [Fe-S].

3. Exemples de systèmes redox impliqués dans les voies de la signalisation cellulaire

Les exemples décrits dans ce paragraphe illustrent qu'en fonction de la complexité des voies de signalisation, les ERO, et en particulier H_2O_2 , peuvent induire ou moduler la réponse cellulaire par des effets directs ou indirects sur un facteur de transcription ou un élément d'une cascade de transduction. La régulation redox peut donc passer par une activation, une inhibition, ou encore une régulation de la synthèse ou de la dégradation d'un de ces facteurs protéiques.

a) *Le facteur de transcription OxyR : un exemple classique de signalisation redox*

OxyR représente l'archétype de la détection d' H_2O_2 par une protéine spécifique. OxyR est un facteur de transcription bactérien activé par oxydation en réponse à H_2O_2 . OxyR contrôle ainsi directement l'expression de gènes codant plusieurs enzymes antioxydantes (l'alkylhydroperoxyde réductase (ahpCF), la GR (GorA) et la Grx1 (grxA)), mais également des protéines impliquées dans le métabolisme du fer (68–70).

Le mécanisme d'activation d'OxyR passe par l'oxydation de la Cys199 sous forme acide sulfénique après réaction avec des concentrations submicromolaires d' H_2O_2 , avec une constante de vitesse extrêmement élevée (supérieure à $10^5 M^{-1} s^{-1}$ (71)) comparable aux peroxydases à thiol, ce qui est compatible avec un événement de signalisation. L'attaque d'une deuxième Cys (Cys208) conduit à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire induisant un changement conformationnel au sein du tétramère d'OxyR, avec modification de son affinité et de sa spécificité pour la région promotrice des gènes cibles et de ses contacts avec l'ARN polymérase (Figure 15 page 26). Le processus est réversible, la liaison disulfure étant réduite par le couple GSH/GrxA, qui inhibe l'activité d'OxyR (72). La cinétique de recyclage d'OxyR étant lente par rapport à son activation, ceci permet l'activation transitoire de la réponse transcriptionnelle. OxyR pourrait également être activé par un mécanisme impliquant la modification de la Cys199 seule, par nitrosylation ou glutathionylation.

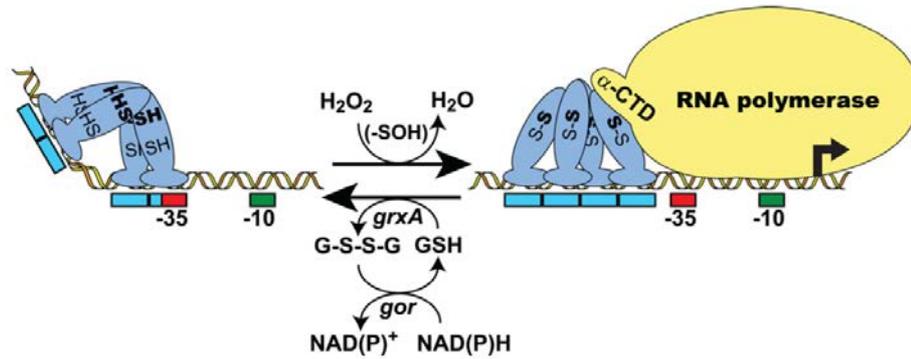


Figure 15 : Modèle d'activation du facteur de transcription OxyR par H_2O_2 . OxyR, représenté en bleu, se fixe sur l'ADN sous forme de tétramère. H_2O_2 oxyde OxyR formant un pont disulfure intramoléculeire et entraînant un changement de conformation de OxyR. Ceci modifie la spécificité de liaison d'OxyR à l'ADN pour permettre la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. OxyR est ensuite réduit par la grxA. (D'après Dubs et al., 2012 (73)).

b) Le système Gpx3/Orp1-Yap1 dans la levure : une peroxydase à thiol en tant que capteur d' H_2O_2

Chez *S. cerevisiae*, le facteur de transcription Yap1 joue un rôle majeur dans l'expression des gènes de la réponse antioxydante, et est activé par oxydation en réponse à une augmentation de la concentration en H_2O_2 (74). Cependant, à la différence d'OxyR, il n'agit pas comme capteur direct de peroxyde. En effet, une peroxydase à thiol, Gpx3, également appelée Orp1 (oxidant receptor protein), réagit avec H_2O_2 pour former un acide sulfénique qui génère une liaison disulfure intermoléculeire avec le facteur de transcription Yap1 (Figure 16 page 27). Orp1 appartient à la classe des 2-Cys-Prx atypiques (cf. § (1) page 33) et possède un repliement apparenté aux Gpx. En comparaison avec les Gpx « classiques », Orp1 ne possède pas les éléments structuraux spécifiques de la reconnaissance du GSH.

Le pont disulfure intermoléculeire formé entre Orp1 et Yap1 est ensuite échangé en un pont intramoléculeire Yap1 C598-C303, libérant Orp1 sous forme réduite. Cette forme activée de Yap1 est capable de pénétrer dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription. En effet, l'activité de Yap1 dépend de sa localisation cellulaire, qui est liée à son état d'oxydation. Dans des conditions normales, Yap1 est séquestré dans le cytoplasme en raison de son export permanent hors du noyau par l'exportine Crm1. Cependant, en présence d' H_2O_2 , l'activation de Yap1 sous forme oxydée induit un changement de conformation qui déstabilise son interaction avec Crm1 en masquant son domaine d'export nucléaire. Ce mécanisme d'activation requiert également un troisième partenaire, la protéine Ybp1. De plus, deux autres ponts disulfures peuvent se former après la liaison C598-C303, et seraient

impliqués dans le contrôle du niveau et de la durée d'activation de Yap1. Le système Trx est capable de réduire Yap1 oxydée et de mettre fin au signal (74) (Figure 16 page 27).

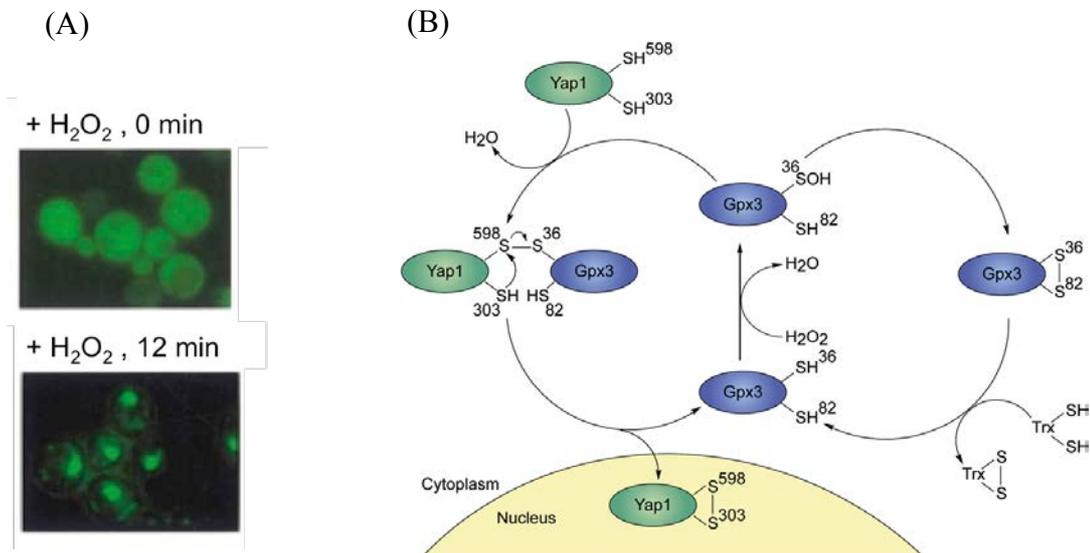


Figure 16 : Redistribution nucléaire et mécanisme d'activation et du facteur de transcription Yap1 par Gpx3/Orp1.

(A) Une souche $\Delta yap1$ exprimant la GFP-yap1 a été traitée par 300 μM d' H_2O_2 pendant le temps indiqué visualisée par coloration de la GFP. (D'après Delaunay et al., (75))

(B) Suite à l'oxydation de sa Cys catalytique (Cys36) sous forme acide sulféniques, Gpx3 peut interagir avec Yap1 pour former un pont disulfure intermoléculaire Yap1-Gpx3. Par conséquent, un échange de pont disulfure se produit suite à l'attaque de la Cys303 de Yap1 générant la forme pont disulfure intramoléculaire Cys303-Cys598 de Yap1 qui constitue la première étape vers la forme active de Yap1. L'accumulation nucléaire de cette forme dans le noyau induit l'expression de gènes codant des enzymes anti-oxydantes. (D'après Paulsen et al., 2009 (76)).

c) Les protéines kinases et phosphatases : relation entre les processus de phosphorylation et de signalisation redox

Dans les cellules de mammifères, de nombreux processus biologiques dépendent de voies de signalisation activées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Parmi les protéines kinases et phosphatases, qui sont les enzymes contrôlant le commutateur « phosphorylation », certaines possèdent des résidus Cys capables de détecter H_2O_2 et sont donc sous contrôle redox (77,78). De façon générale, il a été décrit que les oxydants agissent en activant les kinases, ou en inhibant les phosphatases (77,79). Par exemple, c-Ret qui est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (RTK) associé à plusieurs types de tumeurs, est activé par dimérisation suite à la production d'ERO induite par irradiation de la cellule aux rayons ultraviolets (80). Le mécanisme de dimérisation passe par la formation d'une liaison pont disulfure entre deux résidus Cys de chaque monomère. Les récepteurs sous forme de

dimère sont activés par autophosphorylation (81).

L'activation peut également passer par un mécanisme indirect, comme c'est le cas pour ASK1 (apoptosis signal-regulated kinase 1), une kinase impliquée dans les voies de signalisation MAPK. Dans ce cas, l'activation d'ASK1 par la Trx constitue un élément de régulation majeur de l'apoptose. Sous forme réduite, la Trx peut se lier à ASK1 et inhiber son activité en favorisant son ubiquitination et sa dégradation. Par contre, sous forme oxydée (pont disulfure), la Trx se dissocie de ASK1, permettant ainsi sa dimérisation et son activation par autophosphorylation. De plus la Prx1 est également capable d'interagir avec ASK1 avec des effets similaires (63).

Parallèlement à l'activation des kinases, une attention particulière a été portée aux protéines phosphatases qui, à la différence des kinases, sont facilement inactivées par les ERO (79). En effet, dans le cas des protéines tyrosine phosphatases (PTP), le groupement thiol de la Cys catalytique est caractérisé par une faible valeur de pKa (78) comme par exemple, le pKa de la Cys catalytique de la PTP1B de cellule de mammifères, d'environ 5,4 (82), et existe donc sous forme thiolate à pH physiologique ce qui augmente sa réactivité vis-à-vis de l'oxydation. En présence d'H₂O₂, l'acide sulfénique formé peut réagir avec un groupement amide ou thiol pour donner respectivement, un sulfénylamide cyclique ou un pont disulfure, inhibant l'activité phosphatase (83,84) (Figure 17 page 29). En particulier, des études cristallographiques sur la PTP1B ont révélé la formation d'une liaison de type sulfénylamide cyclique formée par attaque nucléophile de l'azote de la chaîne principale de la Ser216 sur le thiolate de la Cys215 préalablement oxydé en d'acide sulfénique (85) (Figure 18 page 29). Cependant, la réactivité *in vitro* du groupement thiolate au niveau du site actif de PTP1B avec H₂O₂ présente une vitesse relativement faible, allant de 9,1 à 42,8 M⁻¹s⁻¹, ce qui met en doute la signification biologique de ces mécanismes *in vivo*. Brigelius-Flohe et Flohé (77) ont proposé un mécanisme par lequel le peroxyde serait d'abord détecté par une peroxydases à thiol, avec la formation consécutive d'un pont disulfure avec la Cys catalytique de la phosphatase. Dans l'étape suivante, le GSH cliverait la liaison disulfure, générant une espèce PTP S-glutathionylée. Le mécanisme serait achevé par la réduction du disulfure mixte par la Grx.



Figure 17 : Les ERO en tant que modulateurs de l'activité des RTK.

L'activation des RTK par le ligand entraîne l'activation des NOX par Rac, qui, à son tour, induit la production des ERO. Parmi les cibles intracellulaires des ERO sont les PTP, qui sont inactivés par oxydation leur Cys catalytique. Par conséquent, la phosphorylation des RTK est alors soutenue. Cette activation est requise pour l'induction de la prolifération cellulaire. La diminution de la concentration intracellulaire des ERO est accompagnée par l'activation des PTP, ce qui conduit à la déphosphorylation des RTK et ainsi la fin du signal. (D'après Chianrugi et al., 2003 (79)).

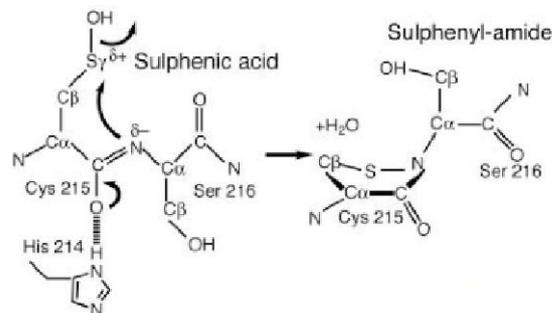


Figure 18 : Mécanisme chimique de formation de la liaison sulfénylamide de la PTP1B. (D'après Salmeen et al., 2003 (85)).

d) NF- κ B : le premier facteur de transcription des cellules mammifères sous régulation redox

NF- κ B, est un facteur de transcription stimulé par une variété de médiateurs, jouant un rôle important dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Les ERO, et en particulier H₂O₂, sont considérés comme des modulateurs de l'activation de NF- κ B induite par d'autres stimuli comme les cytokines. H₂O₂ exerce son rôle essentiellement au niveau de la voie classique

impliquant le complexe IKK, dont dépend la phosphorylation de la protéine inhibitrice I κ B qui stimule sa dégradation par le protéasome, et ainsi favorise la migration de NF- κ B du cytosol vers le noyau (Figure 19 page 30). Cependant les mécanismes redox mis en jeu sont complexes et restent encore à établir.

De plus, une protéine similaire à la Trx, la protéine 14 apparentée à la Trx (TRP14), peut moduler la voie de signalisation associée à NF- κ B. La cible directe de TRP14 a été identifiée comme étant la chaîne légère de la dynéine 8 (LC8), qui est maintenue sous forme réduite par TRP14. Sous cette forme, la LC8 se lie à I κ B, empêchant sa phosphorylation et ainsi sa dégradation. Cependant, la formation d'un pont disulfure intermoléculaire dans la LC8 (qui peut agir comme un capteur de la signalisation redox), conduit à sa dissociation du complexe formé avec I κ B, qui peut ensuite subir une phosphorylation par le complexe IKK et conduire à l'activation de NF- κ B (86).

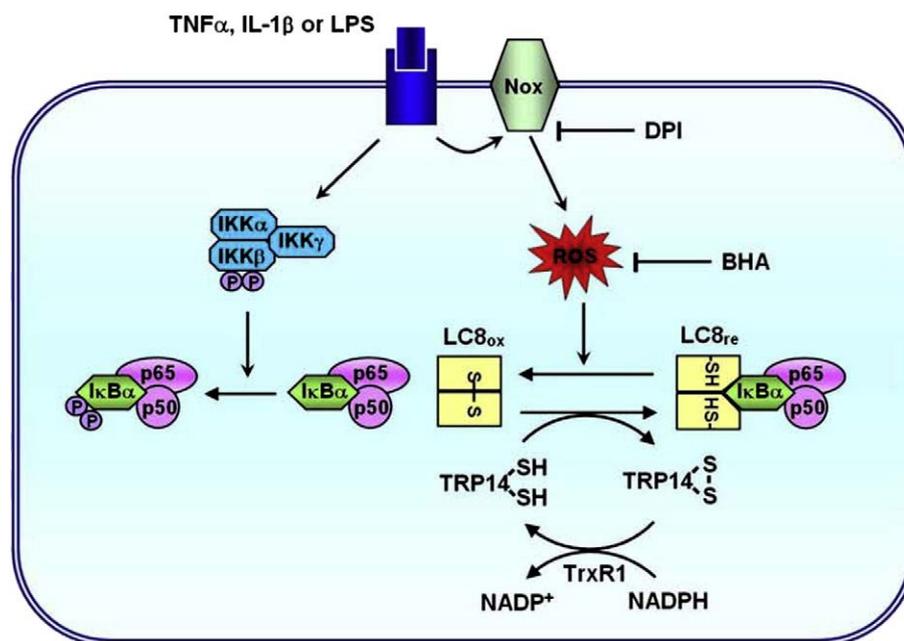


Figure 19 : Modèle de la régulation redox de NF- κ B par LC8 et TRP14.

Dans les cellules non stimulées, LC8 se lie et inhibe I κ B α . L'exposition des cellules à des stimuli ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ et LPS) induit une activation du complexe IKK et la production d'ERO par l'activation des NOX. Les ERO oxydent LC8 pour donner la forme pont disulfure intermoléculaire entre les résidus Cys de chaque sous-unité, ce qui entraîne la dissociation de LC8 de I κ B α . I κ B α libéré est ensuite phosphorylé par le complexe IKK et dégradé par le protéasome. TRP14 contribue à l'inhibition de NF- κ B (hétérodimère p50/p65) qui est médiée par LC8. BHA (un antioxydant chimique) ou DPI (inhibiteur des NOX) inhibent la phosphorylation I κ B α par induction de la réduction des ERO, ou en inhibant la production des ERO, respectivement. (D'après Jeong et al., 2009 (86)).

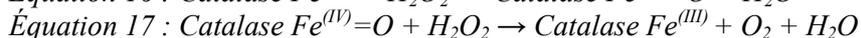
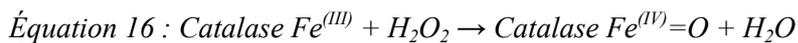
III. La signalisation cellulaire par les peroxydes : Le couple Prx/Srx

1. Contrôle cellulaire des peroxydes

Il existe différentes familles de peroxydases dont les principales sont les catalases, les Gpx et les Trx peroxydases appelées également les Prx. Les catalases sont caractérisées par la présence d'un groupement hème, alors que les Gpx et Prx possèdent un résidu catalytique Cys ou SeCys.

a) Les catalases

Les catalases sont des métalloenzymes à centre hémique, presque exclusivement localisées dans les peroxysomes des cellules eucaryotes (87). La plupart des catalases existe sous forme de tétramères de 60 ou 75 kDa, chaque sous-unité contenant un site actif (hème) enfoui au sein de la structure mais accessible *via* des canaux hydrophobes (88). Ces enzymes catalysent la dismutation de deux molécules d' H_2O_2 , en deux étapes (équations 16, 17). Dans la première étape, l'enzyme réduit une molécule d' H_2O_2 par transfert de deux électrons de l'hème vers H_2O_2 aboutissant à la formation d'une espèce oxydée de l'hème et d'une molécule d'eau. Dans la seconde étape, une deuxième molécule d' H_2O_2 est utilisée comme réducteur pour régénérer l'enzyme, produisant ainsi de l'eau et du dioxygène. Ce dernier est formé par oxydation à deux électrons de la deuxième molécule d' H_2O_2 sans rupture de la liaison O-O (89).

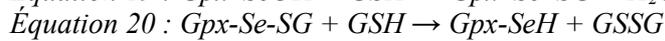
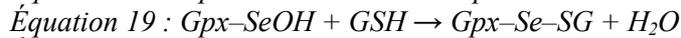


La réaction, dont l'efficacité catalytique est de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, est un processus extrêmement efficace. Les catalases exercent une double fonction, selon la concentration en H_2O_2 . Si la concentration en H_2O_2 est faible (inférieure à $1 \mu\text{M}$), les catalases réalisent une réaction de peroxydation où différents substrats, comme l'éthanol ou l'acide ascorbique, peuvent être oxydés au niveau de la deuxième étape (activité catalase peroxydase). Si la concentration en H_2O_2 devient trop élevée (en situation de stress oxydant), l'enzyme joue alors son rôle de détoxication, où H_2O_2 est donc à la fois donneur et accepteur des électrons (90). Les catalases peuvent être utilisées en compétition avec les Prx pour mesurer les constantes de vitesse (très élevées) des Prx pour réduire H_2O_2 , comme par exemple la HRP (horseradish peroxidase) qui a été utilisée pour étudier les paramètres cinétiques des deux 2-

Cys-Prx typiques de levure Tsa1 et Tsa2 (91).

b) Les glutathion peroxydases « classiques » à SeCys

Les glutathion-peroxydases « classiques » (Gpx) ont été décrites initialement chez les vertébrés, comme des sélénoenzymes, catalysant la réduction des peroxydes (92). Leur activité catalytique repose sur l'oxydation d'une sélénocys catalytique en acide sélénénique ($k \approx 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (93) (équation 18), qui est ensuite réduit par deux molécules de GSH avec une constante de vitesse d'environ $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (93) (équations 19-20).



La famille des Gpx classiques est caractérisée par un site actif comprenant une tétrade catalytique formée par la SeCys, une Asn, une Gln et un Trp (Figure 20 (A) page 32). Les acides aminés Asn, Gln et Trp créent un réseau de liaisons hydrogène qui favorise la polarisation nucléophile du résidu SeCys (ionisé à pH physiologique), et la polarisation de la liaison peroxyde, permettant ainsi l'attaque de l'atome d'oxygène appauvri en électrons du peroxyde substrat (Figure 20 (B) page 32) (74).

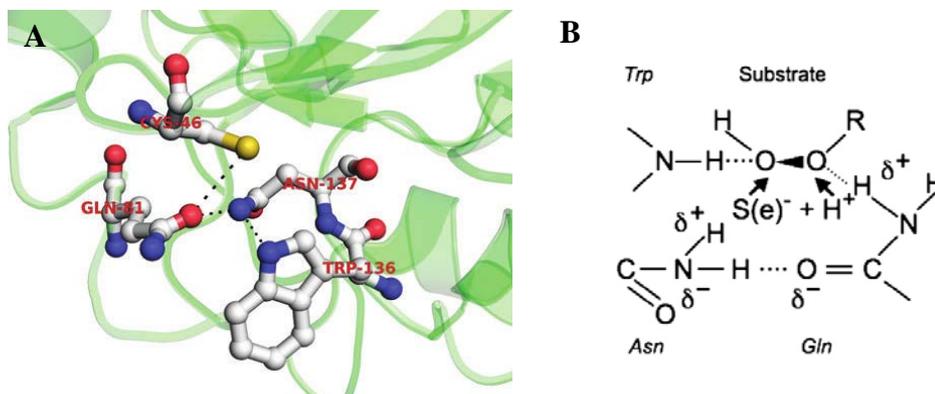


Figure 20 : Représentation schématique de la tétrade catalytique des Gpx

(A) Les interactions entre les résidus (hautement conservés) de la tétrade et le soufre (ou sélénium) sont mis en évidence (lignes en pointillés). La numérotation des résidus correspond la Gpx4 humaine (D'après Flohé et al., 2011 (94) pdb: 2OBI). (B) Par souci de clarté, la SeCys est représentée par $\text{S(e)}^- + \text{H}^+$. Les flèches représentent les liaisons qui vont se former. La (Se)Cys s'oxyde en un acide (sélénique)sulfénique, et ROH est ainsi libéré. (D'après Toppo et, al., 2009 (95)).

Parmi les Gpx « classiques » retrouvées chez les mammifères, la Gpx1, une enzyme tétramérique, joue un rôle majeur dans la défense contre le stress induit par H_2O_2 , alors que la

Gpx4 monomérique est spécifique des hydroperoxydes lipidiques et est impliquée dans des voies de signalisation redox contrôlant, notamment l'apoptose (95).

c) Les peroxydases à thiol

Les peroxydases à thiol ou à Cys appartiennent à deux familles d'enzymes phylogénétiquement éloignées, les Gpx à Cys (CysGpx) et les Prx. Ce sont des peroxydases non hémiques à Cys catalytique, d'environ 20 kDa, présentes dans tous les règnes du vivant, qui ont été initialement impliquées dans la protection des cellules contre le stress oxydant (96,97). Les Prx ont la particularité de réduire à la fois le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes organiques et les peroxy-nitrites par un mécanisme à deux étapes : une première étape commune à toutes les peroxydases à thiol est l'oxydation de leur Cys catalytique C_P conduisant à un intermédiaire acide sulfénique analogue à l'acide sélénénique des Gpx classiques; cette étape est suivie d'une étape de régénération, impliquant généralement des protéines de type Trx (Figure 21 page 35).

Du point de vue structural, les peroxydases à thiol adoptent un repliement de type Trx, caractérisé par un feuillet β à 4 brins et 3 hélices α (Figure 10 page 21). La Cys catalytique ou peroxydatique (C_P) occupe une position analogue à la Cys N-terminale ou la Cys C-terminale du motif CXXC classique des Trx pour, respectivement, les Cys-Gpx et les Prx. Généralement, les Cys-Gpx sont des enzymes monomériques, et utilisent un mécanisme similaire à celui d'une des classes de Prx (cf. § (1) page 33). Par conséquent, outre leur rôle de peroxydase, leur sélectivité d'action vis-à-vis d'H₂O₂ ($>10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) leur permet de jouer le rôle de protéines senseur d'H₂O₂, capables de détecter de faibles concentrations de cette espèce et de la convertir en signal d'activation de facteurs de transcription, comme c'est le cas du senseur redox Gpx3/Orp1 de levure mentionnée dans le § b) page 26. En comparaison avec les Gpx classiques à SeCys, les Cys-Gpx, ne possèdent pas les éléments structuraux spécifiques responsables de l'oligomérisation et de la reconnaissance du GSH, et sont réduites par la Trx (98,99).

(1) Les différentes classes de peroxydases à thiol.

La famille des Prx est divisée en trois classes distinctes en fonction de leur mécanisme de recyclage. Ces trois classes sont les Prx à deux Cys typiques (2-Cys-Prx typiques) auxquelles je m'intéresse plus particulièrement dans ce manuscrit et qui constituent le substrat des Srx, les Prx à deux Cys atypiques (2-Cys-Prx atypiques), à laquelle appartiennent les Cys-

Gpx, et les Prx à une Cys (1-Cys-Prx) (Figure 21 page 35). Après réaction avec le substrat peroxyde, l'intermédiaire acide sulfénique $\text{PrxC}_P\text{-SOH}$ formé réagit avec une seconde Cys dite de recyclage (C_R) pour former un pont disulfure intermoléculaire (2-Cys-Prx typiques) ou intramoléculaire (2-Cys-Prx atypiques), qui est ensuite réduit par la Trx. Dans le cas des 1-Cys-Prx, l'intermédiaire acide sulfénique est réduit par un réducteur à thiol « externe » (Trx, GSH ou acide lipoïque).

Les 2-Cys-Prx typiques, dont les propriétés sont décrites dans la suite de ce chapitre, représentent la classe majoritaire de Prx dans les cellules eucaryotes. Elles sont présentes dans le cytoplasme et dans les différents compartiments cellulaires, incluant les mitochondries, le noyau et le réticulum endoplasmique. Ces enzymes sont organisées en homodimères structurés « tête-bêche », où la Cys C_P d'un monomère fait face à la Cys de recyclage C_R de la sous-unité symétrique.

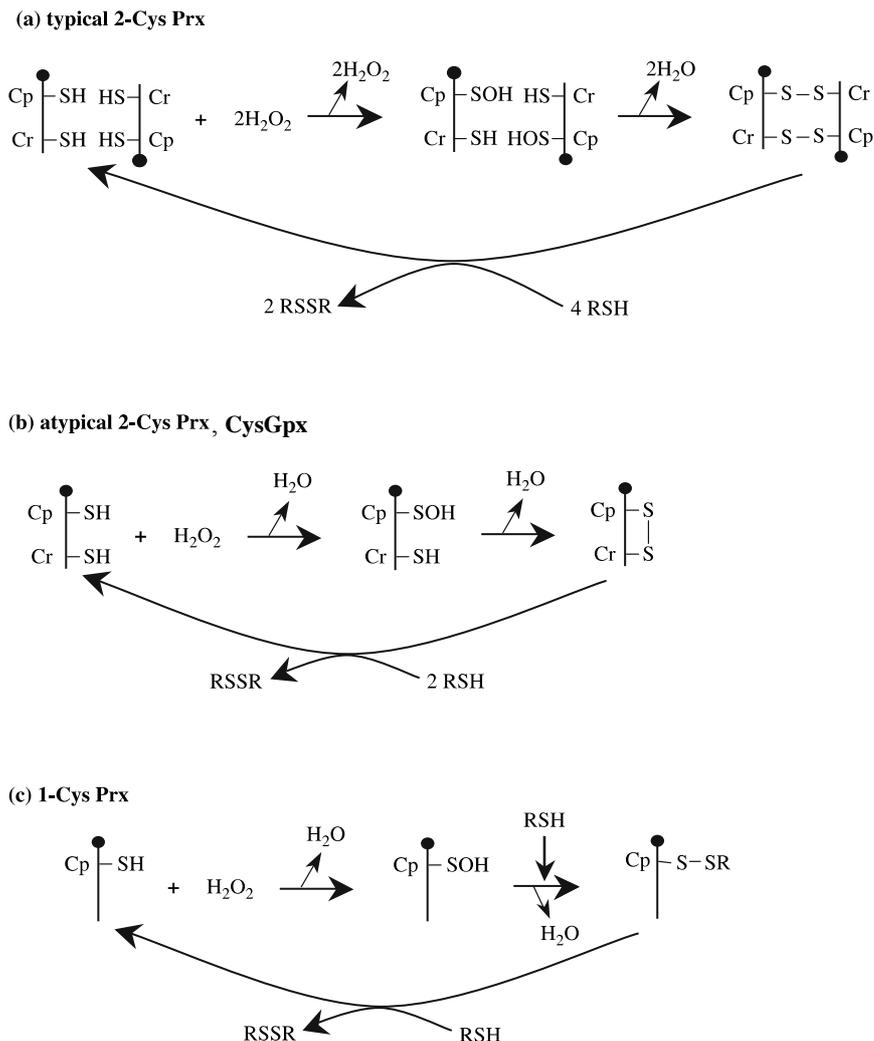


Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des différentes familles de Prx. (a) 2-Cys-Prx typiques; (b) 2-Cys-Prx atypiques et CysGpx et (c) 1-Cys-Prx. Le peroxyde d'hydrogène ou les hydroperoxydes organiques (ROOH) sont réduits par la Cys Cp, qui est oxydée en acide sulfénique (Cp-SOH). Les cercles pleins correspondent à l'extrémité N-terminale de chaque protéine. (D'après Knoops et al., 2007 (100)).

(2) Mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques

La première étape du mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques (et des Prx en général) (Figure 21 page 35) implique la réduction d' H_2O_2 (ou ROOH) en H_2O (ou ROH) via l'attaque de la Cys Cp, conduisant à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique PrxCp-SOH (101). Selon Hall, *et al.*, (102,103) la constante de vitesse extrêmement élevée (10^5 - $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) des Prx est liée non seulement à l'activation de la forme thiolate de la Cys Cp par abaissement de son pK_{app} , mais surtout à la stabilisation de l'état de transition pour cette réaction. Sur la base de structures cristallographiques de Prx obtenues en complexe avec un

substrat ou analogue de substrat, Hall *et. al.*, (103) proposent que la réaction se fasse en une seule étape ou S_N2 , ce qui implique l'alignement des atomes "S_p" et "O" de respectivement, le groupement attaquant (R-S⁻) et le groupement partant (R-O⁻) (103) (Figure 22 page 36). Le site actif des Prx est composé de 3 acides aminés conservés en plus de la Cys C_P : Pro, Thr (ou Ser dans 3% des séquences des Prx) et Arg. Les hypothèses actuelles (102,103) impliqueraient les chaînes latérales Arg et Pro à l'origine de l'activation et du positionnement de la forme thiolate de la Cys. La Thr et l'Arg participeraient au positionnement et à la polarisation de la liaison peroxyde dans le site actif. Enfin, dans ce mécanisme catalytique une molécule d'eau (B:H) pourrait jouer le rôle de donneur de proton pour faciliter le départ du groupement partant (103).

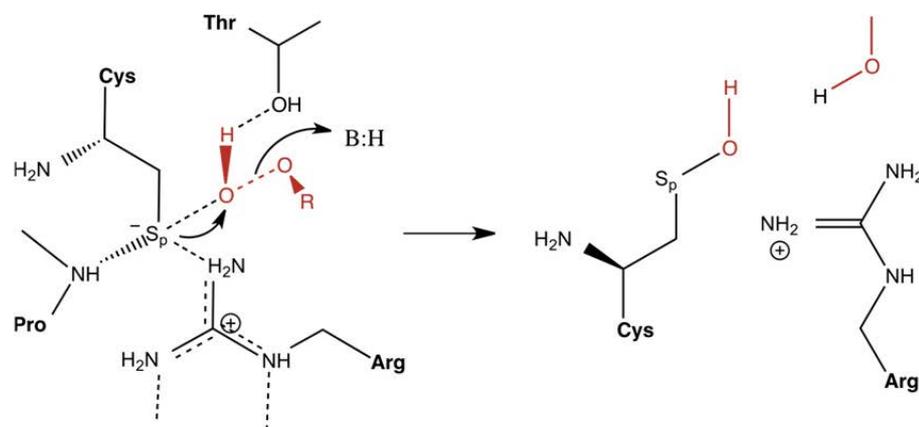


Figure 22 : Schéma du mécanisme catalytique des Prx

Dans les Prx, la première étape de réduction des peroxydes implique une attaque nucléophile par la C_P (S_P⁻) et la formation de l'acide sulfénique (S_P-OH). Les acides aminés conservés dans le site actif (Pro, Thr et Arg) activent et maintiennent la C_P pour attaquer l'atome d'oxygène du substrat. Le réseau de liaisons hydrogène place le substrat dans une position optimale pour une attaque nucléophile. Le mécanisme catalytique se fait en une seule étape S_N2 (102). (D'après Roos 2001 (104)).

L'intermédiaire acide sulfénique ainsi formé (PrxC_P-SOH), est ensuite réduit par attaque de la Cys de régénération (C_R) situé sur le monomère symétrique au sein du dimère de Prx. Cette réaction est favorisée grâce à l'organisation « tête-bêche » du dimère permettant le rapprochement de ces deux Cys pour donner un intermédiaire pont disulfure intermoléculaire. Or, dans la forme réduite des 2-Cys-Prx typiques, les deux Cys C_P et C_R se trouvent à une distance d'environ 14 Å, ce qui implique un dépliement partiel de l'hélice α portant la Cys C_P ainsi que des mouvements de l'extrémité C-terminale portant la Cys C_R pour permettre la formation du pont disulfure et assurer son accessibilité pour la réduction par la Trx (105) (Figure 23 page 37) (105). Dans le cas de 2-Cys-Prx typiques eucaryotes et chez certaines

cyanobactéries, l'intermédiaire $\text{PrxC}_P\text{-SOH}$ peut également subir une suroxydation par une seconde molécule d' H_2O_2 , un mécanisme qui est décrit en détails dans le paragraphe suivant.

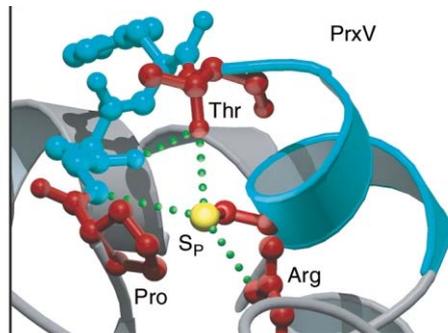


Figure 23 : Structure du site actif d'une 2-Cys-Prx typique réduite et sous forme de pont disulfure. La boucle et le premier tour d'hélice du motif structural boucle-hélice sont représentés en turquoise, le reste de la structure de ce monomère étant en gris. La structure de l'autre monomère est représentée en vert. L'Arg, la C_P et la C_R sont représentées selon le modèle boule-bâton, avec les atomes de soufre colorés en jaune, les carbones en noirs et les azotes en bleus. (D'après Wood et al., 2003 (105)).

(3) Suroxydation des 2-Cys-Prx typiques

Des études *in vivo* ont montré que l'activité peroxydase des 2-Cys-Prx typiques peut être inhibée par suroxydation de la Cys C_P sous forme acide sulfonique ($\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H}$) (Figure 24 page 37) en réponse à une exposition à H_2O_2 exogène ou induit par traitement au $\text{TNF-}\alpha$ sur des cellules de mammifères (106). La formation d'une espèce acide sulfonique $\text{PrxC}_P\text{-SO}_3\text{H}$ a également été décrite sur des cellules de levure, bien que les concentrations de peroxyde nécessaires soient très élevées par rapport à une situation biologique (107).

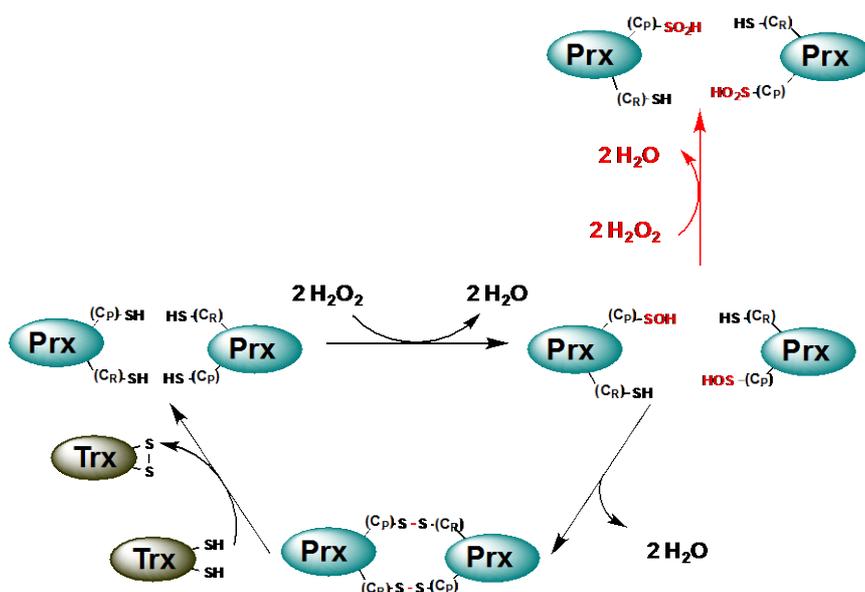


Figure 24 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques.

Ce phénomène de suroxydation sous forme acide sulfinique est spécifique aux 2-Cys-Prx typiques d'eucaryotes et de certaines cyanobactéries (108), à l'opposé des enzymes bactériennes qui sont résistantes puisqu'elles nécessitent des concentrations en H_2O_2 cent fois supérieures pour être suroxydées (105). La susceptibilité vis-à-vis de la suroxydation de la C_P est expliquée par la présence de deux éléments structuraux existant spécifiquement dans les enzymes eucaryotes et de cyanobactéries. Le premier élément est un térapeptide GGLG situé dans l'environnement de la C_P , le deuxième élément est une hélice supplémentaire, contenant une Tyr et une Phe conservées, située à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette hélice est positionnée également dans l'environnement de la C_P . La présence de ces deux éléments structuraux stabilise l'hélice α_2 portant la Cys C_P , ce qui limiterait la vitesse du réarrangement conformationnel requis pour la formation du pont disulfure, et augmenterait la susceptibilité de la C_P -SOH à l'oxydation par une seconde molécule d' H_2O_2 , par compétition avec l'étape de formation du pont disulfure C_P - C_R (105) (Figure 25 page 39). Ce modèle proposé en 2003 par Wood *et al.*, a été confirmé par la résistance à la suroxydation de 2-Cys-Prx typiques de levure dans lesquelles ont été mutés ou tronqués ces deux éléments (109). Cependant, aucune mesure directe des différentes étapes de ce mécanisme, en particulier de la réaction de suroxydation, du changement conformationnel et de la formation du pont disulfure n'était publiée lorsque j'ai débuté ma thèse. Cette partie fait l'objet d'un de mes volets de travaux de recherche (cf. Résultats & Discussion § I page 61).

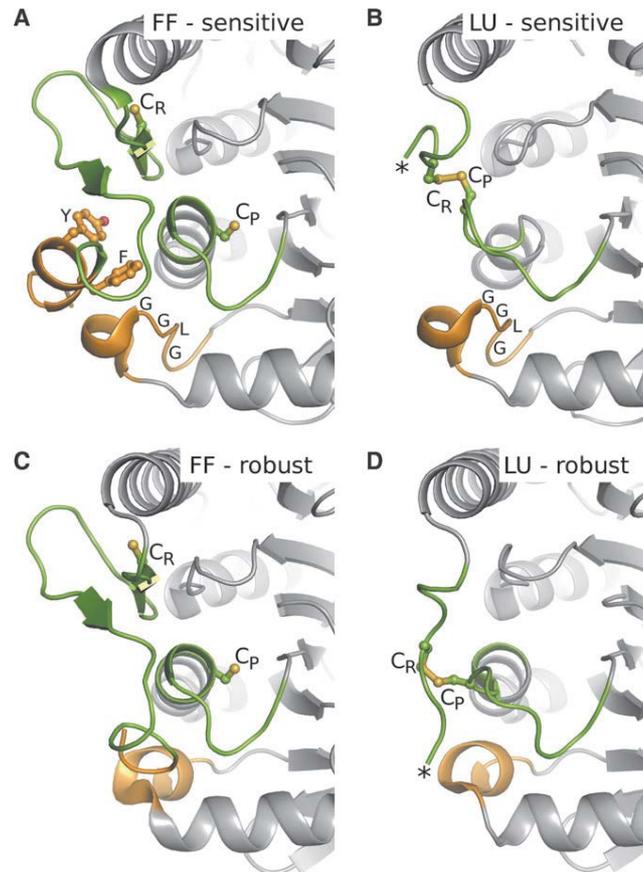


Figure 25 : Comparaison de la structure du site actif de 2-Cys-Prx sensibles et résistantes à la suroxydation.

(A, B) 2-Cys-Prx sensibles et (C, D) 2-Cys-Prx résistantes à la suroxydation dans les formes réduites (parties à gauche) et localement dépliées (parties à droite). Les 2-Cys-Prx sensibles, contrairement aux non sensibles à la suroxydation, contiennent une hélice α C-terminale contenant un motif de deux résidus conservés, Tyr et Phe, qui stabilisent la conformation réduite, et ralentiraient la réaction de recyclage, favorisant la suroxydation par réaction avec une seconde molécule de peroxyde. (A) PrxII humaine (PDB:1QMV), (B) PrxI humaine (pdb: 1QQ2), (C) AhpC C46S de *Salmonella typhimurium* (StAhpC) et (D) StAhpC_{ox} (pdb : 1KYG) (D'après Wood et al., 2003 (97)).

d) Les 2-Cys-Prx typiques : des enzymes régulées par l'état redox de leur Cys catalytique

L'existence d'un tel mécanisme de suroxydation chez une classe spécifique de Prx et la découverte de la Srx capable de réguler (110) a conduit à soulever la question du rôle physiologique de ce phénomène dans la régulation cellulaire redox et à proposer l'hypothèse selon laquelle les 2-Cys-Prx typiques pourraient posséder plusieurs types d'activités en fonction de leur état redox.

En parallèle, une corrélation a été établie entre l'activité peroxydase des 2-Cys-Prx typiques et leur état d'oligomérisation (Figure 26 page 41). En effet, sous forme réduite les

dimères de 2-Cys-Prx typiques s'associent majoritairement sous forme de décamères², en équilibre avec une faible proportion de dimères. Au cours du cycle catalytique, la formation du pont disulfure C_P-C_R déplace l'équilibre vers la forme dimérique (111). Ce déplacement est dû à la déstabilisation des interfaces dimère-dimère au sein du décamère, induite par la réorganisation conformationnelle associée à la formation du pont disulfure.

En outre, des études suggèrent que ces enzymes pourraient acquérir la fonction de protéines chaperons (112). En effet, à des concentrations élevées en H₂O₂, la suroxydation de la Cys C_P conduirait à un changement de fonction résultant de la perte de l'activité peroxydase et d'un gain de l'activité de type chaperon, associé à la stabilisation de la forme décamerique, et à un déplacement de l'équilibre vers la formation d'empilements de décamères formant des espèces de haut poids moléculaire HMW (high-molecular-weight) (103,107,113). *In vitro*, cette activité de chaperon a été démontrée en tant que holdase, *i.e.* une activité permettant de protéger de l'agrégation des protéines modèles dénaturées par la chaleur ou des agents chimiques. *In vivo*, le mécanisme d'action des 2-Cys-Prx typiques en tant que chaperon reste à établir.

La suroxydation des 2-Cys-Prx typiques est donc une modification post-traductionnelle qui permettrait le basculement entre différentes activités, mais pourrait également contrôler la transmission du signal redox porté par H₂O₂ en inactivant la fonction peroxydase des 2-Cys-Prx typiques. En effet, Wood, *et al.*, (97) ont proposé une théorie originale dite du « floodgate », selon laquelle les 2-Cys-Prx typiques agiraient en tant que « vannes » : en conditions basales, la concentration en H₂O₂ est maintenue à de faibles niveaux, notamment grâce à leur activité peroxydase. Suite à un stress aux peroxydes ou à la stimulation des NOX, l'inactivation des 2-Cys-Prx typiques par suroxydation permettrait à H₂O₂ de s'accumuler localement, d'atteindre ses cibles et de jouer ainsi son rôle de messenger redox dans la transduction du signal (114).

² Décamères : constitués de cinq dimères disposés dans une structure en forme d'anneau avec une symétrie d'ordre cinq.

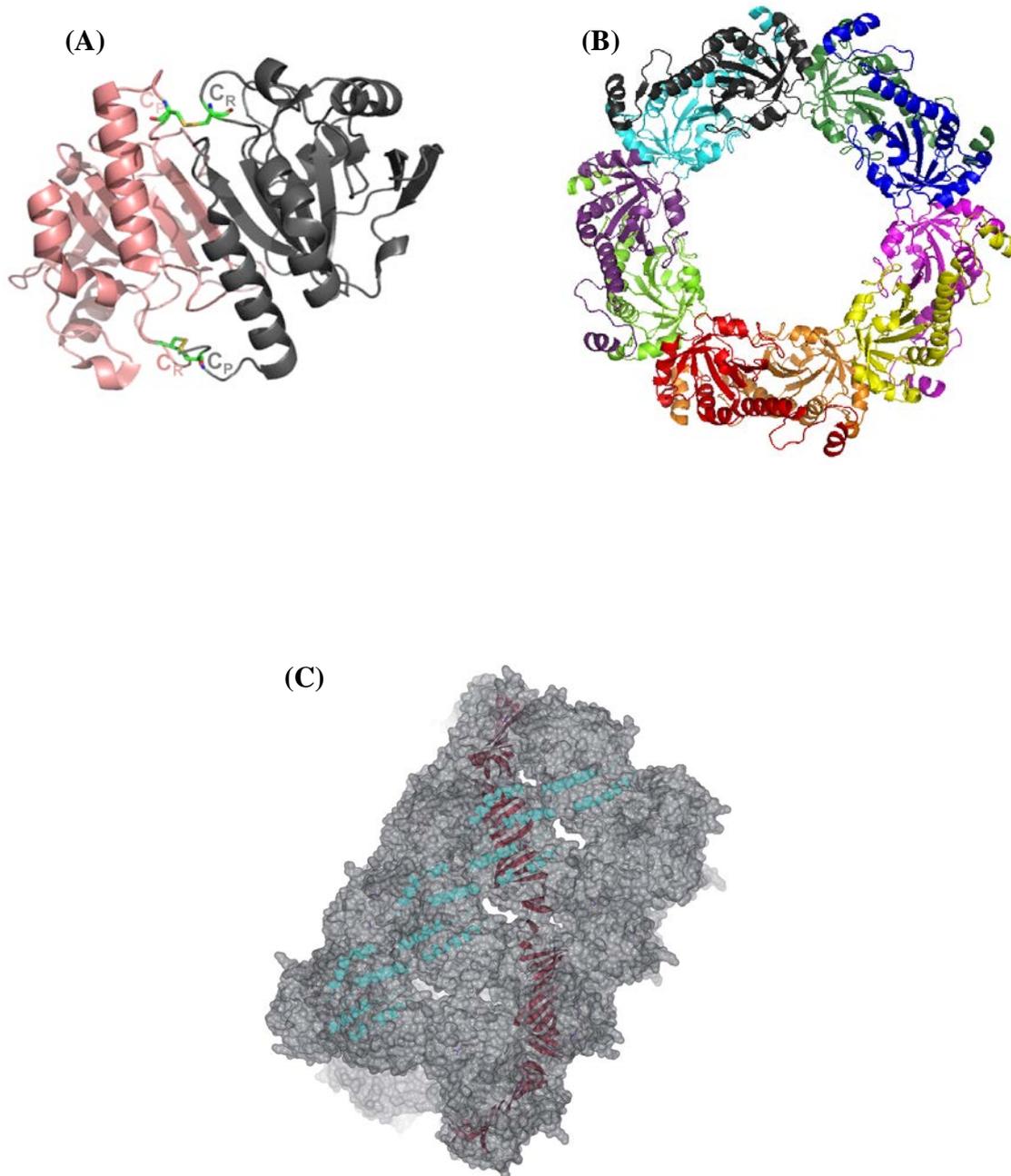


Figure 26 : Structures quaternaires des 2-Cys-Prx typiques.

(A) Structure d'un dimère oxydé sous forme pont disulfure d'une 2-Cys-Prx typique humaine HBP23 (pdb : 1QQ2). Les Cys C_P et C_R de chaque sous-unité sont indiquées. (B) décimère de 2-Cys-Prx typiques humaine (PDB : 1QMV). (C) Modélisation de l'empilement de décimères en structure d'ordre supérieur (115). Ce décimère a un diamètre intérieur de $\sim 60 \text{ \AA}$. Les hélices α de différents décimères sont indiquées en cyan, et les feuillets β en brin, décrivant une organisation hélicoïdale.

De plus, de récentes études (116) ont montré que le cycle redox des Prx pourrait être associé au maintien des rythmes circadiens. Ces rythmes sont omniprésents dans tous les règnes du vivant, et sont à l'origine de la coordination de nombreux aspects du comportement, de la physiologie et du métabolisme, comme par exemple les cycles veille/sommeil chez les mammifères, ou la croissance et la photosynthèse dans les végétaux. Dans ces études, l'oscillation des 2-Cys-Prx typiques entre les états suroxydé et réduit/disulfure a été observée comme biomarqueur rythmique circadien, de façon indépendante de la transcription. Cette découverte pourrait avoir d'importantes conséquences pour la compréhension de pathologies dans lesquelles le rythme circadien est perturbé, comme le cancer, le diabète ou les maladies neurodégénératives (117).

Enfin, les 2-Cys-Prx typiques sont également associées au vieillissement répliatif chez la levure. Récemment, Molin *et al.*, (118) ont montré que la forme suroxydée de Tsa1 (2-Cys-Prx typique majeure de *S. cerevisiae*) s'accumulait au cours du vieillissement de la levure. De plus, ils ont montré que les gènes *TSA1* et *SRX1* étaient nécessaires pour l'allongement de vie répliatif induit par la restriction calorique, et qu'une copie supplémentaire du gène *SRX1* prolongeait la durée de vie répliatif d'une manière Tsa1 dépendante (Figure 27 page 42). A priori, cette fonction portée par le gène *TSA1* pourrait être associée soit aux propriétés de la Prx en tant qu'antioxydant, soit à ses propriétés de chaperon. En effet, McMurray et Gottschling (2004) (119) avaient proposé que l'accumulation de protéines oxydées, endommagées ou agrégées dans les cellules vieillissantes pourrait conduire à la perte de fonction de produits de gènes nécessaires pour le maintien de l'intégrité du génome.

Figure 27 : Les gènes TSA1 et SRX1 affectent le vieillissement répliatif de la levure.

(A) La durée de vie des souches BY4742 (type sauvage) et Δ tsa1 dans un milieu riche YPD. La durée de vie moyenne pour chaque souche est indiquée entre parenthèses. (B) effet d'une copie supplémentaire génomique intégrée du gène SRX1 sur la durée de vie des cellules. (C) Effet d'une copie supplémentaire génomique intégrée du gène SRX1 sur la durée de vie des cellules dépourvues de tsa1.

2. Les Srx : des enzymes à activité sulfinyl réductase

Comme nous l'avons vu précédemment, la Cys catalytique des 2-Cys-Prx typiques peut être sélectivement oxydée sous forme d'acide sulfinique. Jusqu'en 2003, cet état d'oxydation était considéré comme irréversible *in vivo*. Des études de marquage métabolique au ^{35}S sur des cellules de mammifères ont montré que lors d'un stress induit par H_2O_2 , la Prx1 (2-Cys-Prx typique) était suroxydée sous forme d'acide sulfinique, et qu'au cours du temps, il y avait régénération de Prx1 par réduction de l'acide sulfinique et non par synthèse *de novo* de nouvelles Prx1 (Figure 28 page 43) (120).

Des études complémentaires sur plusieurs Prx ont montré que la réduction de l'acide sulfinique était plus rapide sur les 2-Cys-Prx typiques cytoplasmiques que sur leur homologue mitochondriale, alors que pour les 1-Cys-Prx il n'y avait pas de réduction de cette forme d'oxydation (121,122).

Figure 28 : Réversibilité de l'oxydation sous forme acide sulfinique de Prx1 in vivo. Les cellules de mammifères, dont les protéines sont marquées au ^{35}S au niveau des Met, sont soumises à un stress par H_2O_2 (100 μM) pendant 10 minutes, puis incubées de 0 à 8 heures dans un milieu salin (DMEM) supplémenté par le cycloheximide (inhibiteur de la traduction des protéines). Les protéines cellulaires sont ensuite séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) puis analysées par autoradiographie (A) ou par Western Blot (B) avec des anticorps anti-Prx1. Sur la figure est représentée la région du gel où est localisée la Prx1 sous forme réduite (Re) et oxydée (Ox). (D'après Woo et al., 2003 (120)).

L'activité sulfinyl réductase des Srx a été par la suite mise en évidence par l'équipe du Dr. Toledano (110) chez *S. cerevisiae*. Son expression, induite par H_2O_2 et la sensibilité des levures vis-à-vis d' H_2O_2 lorsque le gène *SRX1* est invalidé ont permis d'associer Srx au métabolisme cellulaire d' H_2O_2 (88). L'analyse d'extraits cellulaires a montré qu'une fraction de la population de Srx serait liée covalamment avec d'autres protéines. Ces partenaires ont été identifiés après copurification avec Srx, et se sont avérés être les deux 2-Cys-Prx typiques les plus abondantes de la levure, Tsa1 et Ahp1, ce qui suggérait que ces enzymes avaient des fonctions associées. Des études *in vivo* ont montré que les levures sauvages pouvaient réduire

les 2-Cys-Prx typiques suroxydées après exposition des cellules à H₂O₂, alors que des levures n'exprimant plus Srx ($\Delta srx1$) ne permettaient plus la réduction des PrxC_P-SO₂H (Figure 29 A page 44). De plus, la complémentation par l'expression de Srx recombinante dans des levures $\Delta srx1$ traitées par H₂O₂ montre une restauration de la réduction de l'acide sulfinique par Srx, suggérant une activité sulfinyl réductase (Figure 29 B page 44).

Chez les mammifères, Srx est exprimée dans le cerveau, le colon, le foie, la rate et la moelle épinière (123) alors que chez les végétaux Srx, comme les 2-Cys-Prx typiques, est essentiellement localisée dans les chloroplastes (124).

Figure 29 : Réduction in vivo de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique par Srx1
Analyse par électrophorèse 2D-PAGE des formes réduites (SH) et oxydées (SO₂) de Tsa1, marquée au ³⁵S au niveau des Met ; dans (A) des levures sauvages ou $\Delta srx1$ exposées à H₂O₂ durant les périodes mentionnées, ou dans (B) des levures $\Delta srx1$ exprimant un vecteur contrôle, Srx sauvage ou SrxC84S après exposition des cellules à H₂O₂ durant 30 minutes à 30 °C. (D'après Biteau et al., 2003 (110)).

a) Structure de la Srx isolée et en interaction avec la 2-Cys-Prx typique suroxydée

La détermination de la structure de Srx de mammifères par cristallographie aux rayons X (125) et par RMN (126) a permis de montrer que Srx possède un nouveau type de repliement protéique. Srx est structurée en un feuillet β composé de cinq brins β antiparallèles, et de trois hélices α (Figure 30 page 45). L'hélice $\alpha 2$ et la séquence qui la précède contiennent la signature des Srx, F(81/96)-G/S- G-C-H-R(86/101) (selon la numérotation de *S. cerevisiae/H. sapiens*), qui contient la Cys(84/99) catalytique. Cette Cys est située à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 2$ et est proche de l'Arg(20/51) (~ 3,5 Å) qui est située dans la boucle reliant le brin $\beta 2$ à l'hélice $\alpha 1$. Ces observations suggèrent que le pK_{app} de la Cys catalytique pourrait être abaissé grâce au dipôle induit par l'hélice α et par les

interactions stabilisatrices entre la Cys et l'Arg. Ceci est en accord avec la valeur de pK_{app} de 7,3 mesurée pour la Srx humaine (*HsSrx*) (123), et également la Srx *S. cerevisiae* (*ScSrx*) (88).

Srx est une enzyme ATP-dépendante (110), dont le mécanisme catalytique passe par la phosphorylation de l'acide sulfinique de la Prx, grâce au transfert du phosphate γ de l'ATP. Ceci implique une reconnaissance de l'ATP par la Srx ou au niveau du complexe protéique Prx/Srx.

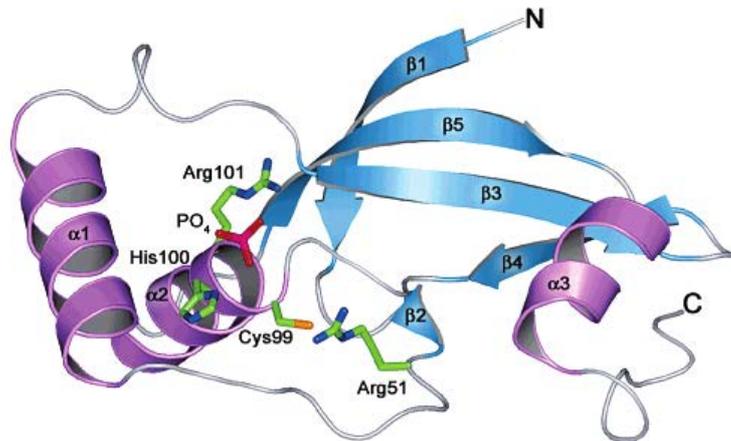


Figure 30 : Structure tridimensionnelle de la *HsSrx*

Les hélices α sont colorées en violet, les régions non structurées en gris et les brins β en bleu. La figure présente la structure de Srx humaine (*HsSrx*) en complexe avec un groupement phosphate. L'Arg51, la Cys99, l'His100, l'Arg101 et une molécule de phosphate (PO_4) sont présentés sous forme de bâtonnets. Les couleurs des atomes sont les suivants; vert : carbone, bleu : azote, rouge : oxygène, orange : soufre et magenta : phosphate. (D'après Jonsson et al., 2005 (125)).

La structure cristalline *HsSrx*/ATP/ Mg^{2+} /*HsPrx1* a été obtenue avec les variants *HsSrxC99A* et *HsPrxIC52Asp* (suivant la numérotation chez *Homo sapiens*) dans le but de mimer le groupement sulfinate de la 2-Cys-Prx typique suroxydée (127) (Figure 31 page 46). En outre, pour renforcer la stabilisation de l'interaction Srx/Prx deux mutations ont été également introduites (Asn43 de la Srx et la Lys185 de la PrxI) pour générer une liaison pont disulfure au niveau de l'interaction C-ter de Prx avec la Srx. Dans cette étude, pour stabiliser la forme dimérique de Prx, les auteurs ont également introduit une charge négative (C83E) au niveau de l'interaction entre deux dimères de Prx. Cette structure montre qu'un des deux oxygènes de l'Asp52 de Prx est situé à proximité du groupement phosphate γ de l'ATP, contrairement à la Cys catalytique de Srx (ici Ala99), compte tenu de sa distance de 4 Å et de son orientation par rapport au groupement phosphate γ . Ceci suggère que la fonction acide sulfinique pourrait attaquer directement le groupement phosphate γ de l'ATP. Dans le

deuxième chapitre des résultats et discussion nous apportons des preuves cinétiques détaillant ce mécanisme catalytique.

En outre, la structure cristalline obtenue par l'équipe de Lowther (127) (Figure 32 page 47) montre, que, en plus de l'interface de reconnaissance au niveau des sites actifs, qu'il existe une interface « arrière », impliquant l'extrémité N-ter de la seconde sous-unité de la Prx qui se rabat sur la Srx pour probablement stabiliser ce complexe. Ainsi, plusieurs résidus de Srx et Prx issus de ces deux interfaces pourraient être impliqués dans le mécanisme enzymatique. L'étude de la formation du complexe Prx/Srx et de son interaction avec l'ATP fait l'objet d'un volet de mon travail de recherche.

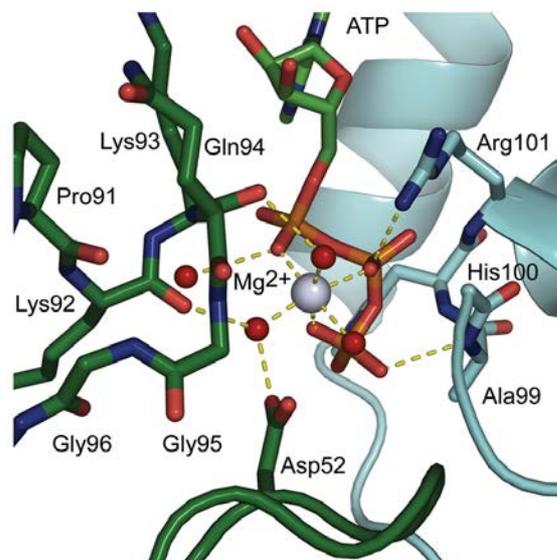


Figure 31 : Structure de l'interface d'interaction Srx/Prx en présence d'ATP et Mg^{2+} . La numérotation des acides aminés suit celle de la Srx de humaine (cyan), et Prx humaine (vert). La Cys catalytique (Cys99) de la Srx est remplacée par une Ala. La Cys C_P (Cys52) de la Prx est remplacée par l'Asp. Les molécules d'eau sont indiquées en boules rouges, Mg^{2+} en gris, l'ATP est présenté sous forme de bâtons. Les liaisons hydrogènes sont indiquées en pointillés. (D'après Jönsson et al., 2009 (127)).

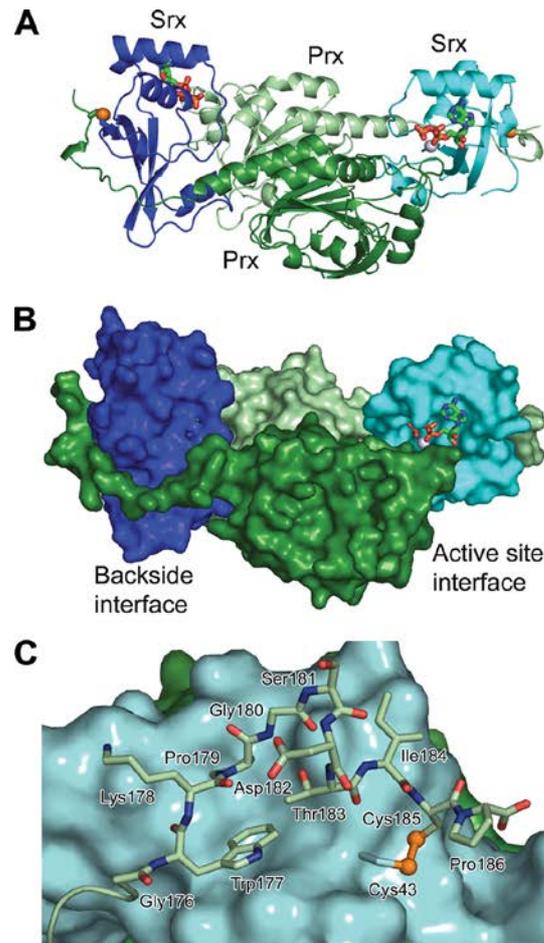


Figure 32 : Structure du complexe quaternaire Prx/ATP/Mg²⁺/Srx
 (A), (B) deux représentations de la structure globale du complexe Prx/ATP/Mg²⁺/Srx. Les deux monomères du dimère PrxI sont représentés en vert foncé et clair, et les deux monomères de Srx en cyan et bleu. Une molécule d'ATP et un ion Mg²⁺ dans chaque site actif sont également représentés.
 (C) Structure de l'interface « arrière » Prx/Srx montrant les résidus conservés de la Prx (modèle stick) interagissant avec la Srx (surface cyan). (D'après Jönsson et al., 2009 (127)).

b) Mécanisme catalytique de la Sulfirédoxine

Des études *in vitro* de la réduction de Tsa1C_P-SO₂ de levure par ScSrx ont montré que la réaction nécessite la présence d'ATP, de Mg²⁺ (ou Mn²⁺), ainsi qu'un système de réduction à thiol comme le DTT ou le système Trx (Figure 33 page 48) (110,128). La Srx contient une Cys invariante dans différents organismes eucaryotes, comme le montre l'alignement de séquences (Figure 34 page 50), située en position 84 chez *S. cerevisiae*. Son remplacement par une Ala abolit l'activité sulfinyl réductase, alors que la substitution des autres Cys non conservées par une Ser (C106S) (C48S) n'abolit pas la réduction des 2-Cys-Prx typiques oxydées, *in vivo*. Le fait que ScSrxC84S ne présente pas d'activité sulfinyl réductase *in vitro*, suggérerait une fonction essentielle de ce résidu dans la catalyse.

Le mécanisme catalytique de la réduction des PrxC_P-SO₂H par Srx est ATP et Mg²⁺-

dépendant, et comprend trois étapes (Figure 35 page 51).

Figure 33 : Réduction in vitro de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique par ScSrx
Analyse par Western Blot avec des anticorps anti-Tsa1 de la réaction contenant : la ScSrx purifiée, Tsa1 suroxydée, 1 mM d'ATP, 1 mM de Mg²⁺ et 0,5 mM de DTT, incubée 15 min à 30°C. Les formes réduites et oxydées de Tsa1 sont séparées par alkylation différentielle des thiols libres avec l'acide 4-acétamido-4'-maléimidylstilbène-2,2'-disulfonique (AMS) induisant une augmentation de la masse de 500 Da par Cys alkylée. (D'après Biteau et al., 2003 (110)).

(1) *Étape d'activation du substrat : activité phosphotransférase de Srx*

La réduction de la fonction acide sulfinique nécessite une activation chimique préalable à l'étape réductase. Dans le cas de la PrxC_P-SO₂H, notre équipe a montré que le sulfinate est activé par transfert direct (129) du groupement γ -phosphate de l'ATP, conduisant à la formation d'un intermédiaire anhydride phosphoryle sulfinique. Cette étude (129) a également permis de montrer que la vitesse globale de réduction du substrat PrxC_P-SO₂H est limitée par la première étape du mécanisme, c'est-à-dire l'étape de transfert de phosphate, avec une constante de vitesse de formation de l'ADP k_{ADP} de l'ordre de 1-2 min⁻¹ égale à la constante catalytique de la réaction à l'état stationnaire (Figure 35 page 51). Cette constante de vitesse est faible comparée à celle mesurée pour d'autres enzymes ATP-dépendantes qui sont généralement supérieures à 10 s⁻¹ (130). Ce qui soulève la question i) de la nature du processus limitant au sein de cette étape, et ii) des facteurs moléculaires qui contrôlent sa vitesse (cf. Résultats & Discussion § b) page 79).

(2) *Étape réductase*

L'activité réductase de la Srx a été caractérisée pour la ScSrx (53) dans notre laboratoire par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase inverse, combinée à l'étude cinétique de la formation des intermédiaires réactionnels. Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un intermédiaire catalytique covalent (postulée par Biteau *et al.*, (110) et mise en doute par Jeong *et al.*, (131)), de type thiolsulfinate Prx-C_P-

SO–S–C₈₄-Srx résultant de l'attaque de la Cys84 de ScSrx sur la fonction acide sulfinique activée. Ce mécanisme a été également confirmé sur l'enzyme humaine (54).

(3) *Étape de recyclage de ScSrx*

La formation d'un intermédiaire covalent Prx/Srx implique le recyclage de l'enzyme sous forme réduite. Dans le cas de la ScSrx, une étude menée au laboratoire a permis de montrer que la ScSrx possède une Cys de recyclage (la Cys48), qui après attaque sur le soufre sulfénique de l'intermédiaire thiolsulfinate, est responsable de la libération du produit de la réaction, la Prx sous forme acide sulfénique PrxC_P-SOH, et de la ScSrx oxydée sous forme pont disulfure intramoléculaire (Figure 35 page 51). L'activité sulfinyl réductase de la ScSrx est ensuite régénérée par un échange de ponts disulfure très efficace avec la Trx ($\sim 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), où la Cys catalytique de la Trx attaquerait la Cys48 de la ScSrx (128). Par analogie aux 2-Cys-Prx typiques, la ScSrx a été qualifiée de Srx à 2 Cys (2-Cys-Srx).

Cependant, le mécanisme de recyclage des Srx à une Cys, comme par exemple celles de mammifères et de plantes, doit être nécessairement différent de celui décrit ci-dessus, puisque la Cys48 n'est pas conservée dans ces organismes (Figure 34 page 50). En particulier, ceci implique l'intervention d'un réducteur cellulaire « externe ». L'étude de la nature de ce réducteur et du mécanisme de recyclage des Srx à une Cys a fait l'objet d'un volet de mes travaux de recherche.

Figure 34 : Alignement des séquences de Srx de différents organismes

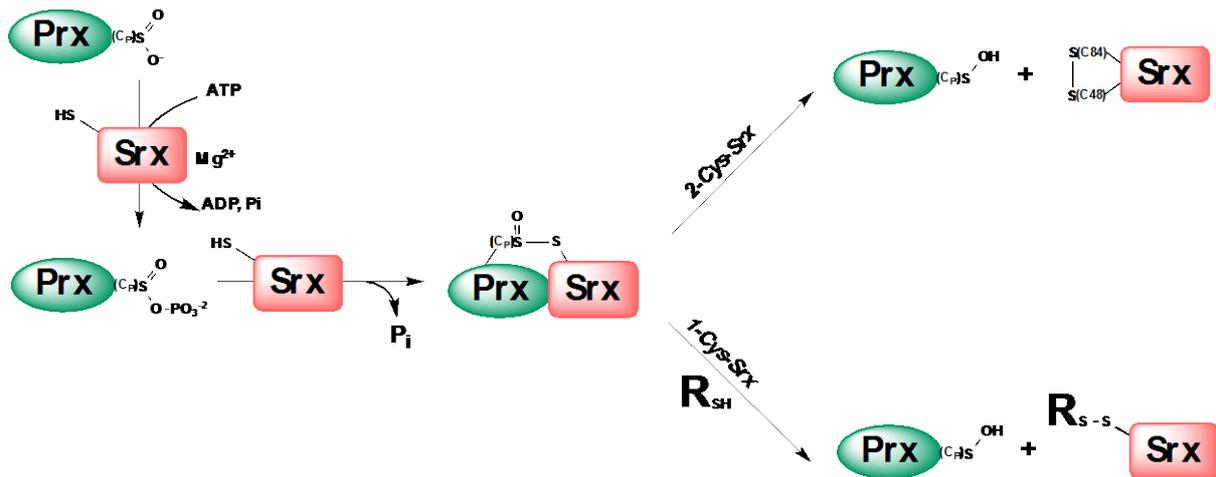


Figure 35 : Schéma du mécanisme catalytique des 2-Cys-Srx et 1-Cys-Srx
R_{SH} : Cys48 dans ScSrx.

c) Rôle physiologique des Srx au niveau cellulaire

(1) Rôle dans la régulation de l'activité des 2-Cys-Prx typiques.

Le premier rôle identifié de Srx est son activité enzymatique de réduction des 2-Cys-Prx typiques suroxydées sous forme acide sulfinique. Nous avons vu que les 2-Cys-Prx typiques peuvent jouer plusieurs rôles au sein des cellules (cf. § d) page 39), comme peroxydase, comme détecteur d'H₂O₂ et protéines chaperons. Ces différentes fonctions sont modulées selon l'état d'oxydation de la Cys C_p. Par son activité sulfinyl réductase, Srx est donc potentiellement impliquée dans la régulation de ces différentes fonctions, avec un impact potentiel dans le vieillissement, le maintien du rythme circadien et les maladies associées. Par exemple le système Prx/Srx a été impliqué dans le développement du cancer du poumon (132).

A l'appui de cette hypothèse, une recherche de séquences protéiques homologues à celle de ScSrx, dans des banques de données (Figure 34 page 50), révèle la présence de Srx uniquement chez certains organismes eucaryotes, ainsi que chez quelques cyanobactéries, avec une identité de séquence d'environ 30 %. Il est intéressant de signaler qu'il existe une coévolution entre la présence de Srx et les 2-Cys-Prx typiques qui sont sensibles à la suroxydation (108).

(2) *Rôle dans la déglutathionylation des protéines*

Au cours d'un stress causé par les ERO, de nombreuses protéines sont modifiées au niveau de leur Cys par la formation d'un pont disulfure mixte avec le GSH. Ce phénomène est qualifié de S-glutathionylation. Ces modifications post-traductionnelles pourraient jouer un rôle protecteur ou régulateur de la fonction protéique dans des mécanismes de signalisation redox (133). Ces modifications sont réversibles, la déglutathionylation de ces protéines étant catalysée principalement par la Grx (cf. § b) page 22).

Des études récentes ont montré que Srx peut aussi jouer un rôle dans la déglutathionylation des protéines (134). En effet, lors d'un stress oxydant causé par l'oxyde nitrique, le taux de protéines glutathionylées dans des cellules humaines de rein (HEK293) exprimant Srx est fortement diminué par rapport aux cellules ne l'exprimant pas. Cette observation n'est vraie que dans le cas où la Cys essentielle de Srx n'est pas substituée. L'actine et la phosphatase PTP-1B sont des protéines glutathionylées lors de ce stress. Ces études *in vitro* montrent que Srx, possédant sa Cys essentielle, est capable de déglutathionyer ces deux protéines, restaurant l'activité phosphatase aux PTP-1B et la capacité de polymérisation de l'actine (134). L'incubation de Srx avec ces deux protéines pendant le traitement de glutathionylation montre une faible modification des protéines par rapport au traitement sans Srx. Srx protégerait donc les protéines de la glutathionylation au cours d'un stress oxydant, permettant aux protéines de rester actives (134).

En outre, Park *et al.*, (135) ont déterminé *in vitro* le rôle de Srx dans la déglutathionylation d'une 2-Cys-Prx (PrxI). Pour évaluer la pertinence biologique de ces observations, les auteurs ont montré que PrxI est glutathionylée dans des cellules HeLa A549 à faible concentration d' H_2O_2 . En outre, le taux de PrxI glutathionylée a été sensiblement élevé dans des cellules transfectées par des ARN interférents ciblant les ARN messagers de Srx. À l'inverse, dans les cellules surexprimant Srx, le taux de PrxI glutathionylée a été diminué. Cependant, le taux de glutathionylation de la PrxV n'a pas été affecté par la variation du niveau d'expression Srx qui est vraisemblablement lié à spécificité de Srx pour la PrxI contrairement à la PrxV.

De plus, Bowers *et al.*, (136) ont déterminé une forte affinité de la Srx pour la protéine S100A4 (S100 binding protein A4) glutathionylée ($K_D \sim 5$ nM). De ce fait, Srx forme un complexe avec S100A4 glutathionylée et affecte son interaction avec NMIIA (non-muscle

myosin IIA)³, modulant ainsi, la migration et l'adhésion cellulaire.

(3) *Activité nucléase*

Récemment, Yong hun *et al.*, (137) ont proposé que Srx pourrait posséder une activité nucléase. Sur la base d'une forte homologie de séquence entre Srx et ParB qui est une nucléase, la Srx de *Arabidopsis thaliana* (*AtSrx*) a été testée pour une éventuelle activité nucléase. Dans cette étude, les auteurs ont constaté que *AtSrx* tout comme une nucléase, peut utiliser un substrat simple brin et double brin (ADN). L'activité nucléase est activée par des cations divalents. Cependant, la mutation de la Cys catalytique dans le site actif (*AtSrx-C72S*), n'a pas de conséquence sur l'activité réductase de *AtSrx*, ce qui suggère que la Cys catalytique n'est pas impliquée dans le mécanisme catalytique de la fonction nucléase.

d) *Les sestrines n'ont pas d'activité sulfinyl reductase.*

L'activité sulfinyl réductase des sestrines a été proposée en 2004 par Budanov *et al.*, (138) chez l'homme, après une étude *in vitro* de l'activité de la protéine, en présence de 2-Cys-Prx typiques suroxydées, de MgCl₂, d'ATP et de DTT. Les sestrines produites par le gène Hi95, sont impliquées dans la défense des cellules humaines contre les ERO, et possèdent un domaine apparenté aux protéines bactériennes AhpC responsables de la réduction des 2-Cys-Prx typiques. Sur la base de ces expériences, Budanov *et al.*, ont proposé que la sestrine Hi95 permettrait la réduction de la forme acide sulfinique régénérant Prx1 sous forme réduite. Cependant, cette activité a été ensuite remise en cause. En effet, l'étude menée par Woo *et al.* (139) montre que la surexpression de Hi95, dans des cellules HeLa ou A549, ne permet pas la réduction de Prx suroxydées. Ces résultats sont en accord avec des études menées au laboratoire par le Dr. Xavier Roussel sur la sestrine humaine. L'activité observée par Budanov *et al.*, pourrait provenir d'une contamination de la protéine Hi95 par copurification avec Srx.

³ NMIIA : élément central dans les mécanismes de la régulation de l'adhésion cellulaire, la migration et l'architecture des microfilaments.

OBJECTIFS

Mon projet de thèse avait pour objet l'étude des mécanismes moléculaires de

régulation du système 2-Cys-Prx/Srx, et s'inscrit dans la problématique plus générale de la signalisation cellulaire redox thiol-dépendante. *In vivo*, cette régulation implique plusieurs cycles catalytiques interdépendants (Figure 36 page 57) : le cycle peroxydatique de la Prx, le cycle de suroxydation de la Prx, le cycle de la Srx et leurs connexions avec les systèmes redox Trx/glutathion. La compréhension de la coordination de ces cycles requiert donc une connaissance précise des cinétiques réactionnelles de ces deux enzymes.

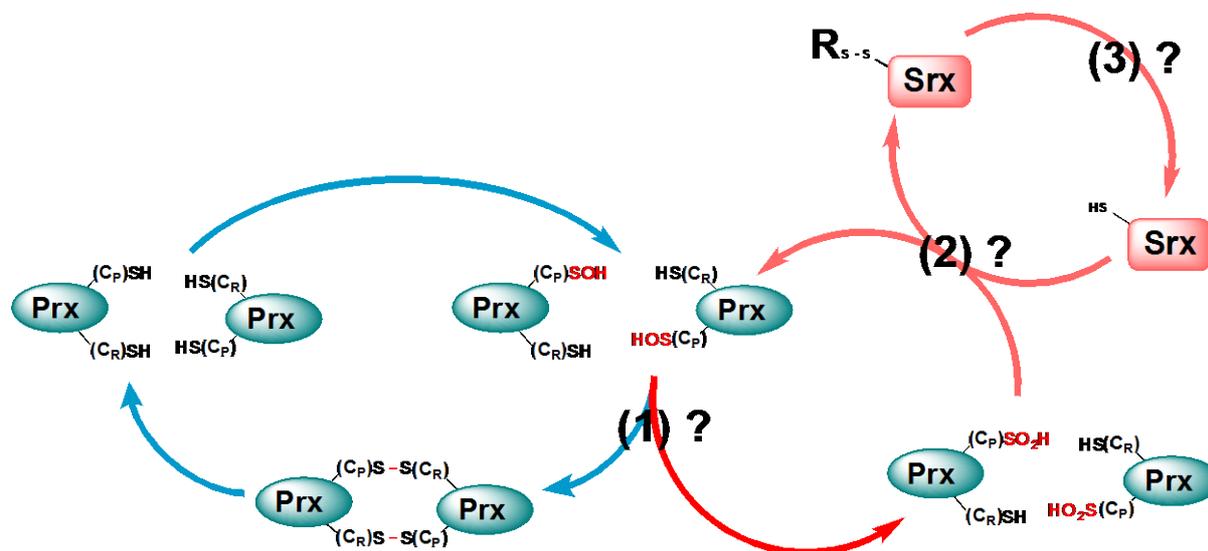


Figure 36 : Les cycles enzymatiques interdépendants du système 2-Cys-Prx et Srx et les points de régulation étudiés (1, 2, 3).

Mon travail de thèse s'est articulé autour de trois axes :

- (1) L'étude du mécanisme moléculaire de suroxydation d'une 2-Cys-Prx, qui constitue le premier point de régulation du système Prx/Srx : à mon arrivée au laboratoire, aucune donnée cinétique détaillée du cycle enzymatique des 2-Cys-Prx n'était disponible. L'objectif était de caractériser les deux étapes du cycle catalytique de la 2-Cys-Prx typique majeure de *S. cerevisiae* dont la compétition contrôle la sensibilité à la suroxydation, par une stratégie combinant cinétiques rapides, système enzymatique couplé et modélisation cinétique.
- (2) L'analyse des facteurs moléculaires responsables de la faible constante catalytique de la Srx au niveau de la première étape de son mécanisme enzymatique, ce qui doit être corrélé à son rôle biologique et constitue un second élément de régulation. Dans un premier temps, la question de la nature du processus limitant la vitesse de cette première étape a été abordée, puis le mécanisme de formation du complexe Michaelien Prx/Srx/ATP/Mg²⁺ a été caractérisé par une technique d'anisotropie de fluorescence.
- (3) L'étude de la nature du réducteur et du mécanisme de recyclage des 1-Cys-Srx, qui

diffère de celui des 2-Cys-Srx de levure qui sont réduites par la Trx. Compte tenu des concentrations cellulaires élevées de glutathion, l'objectif était d'évaluer le rôle de ce dernier en tant que réducteur physiologique des 1-Cys-Srx, par une stratégie combinant études *in vivo* et cinétiques enzymatiques *in vitro*. Cet aspect constitue un point de connexion du couple Prx/Srx avec les systèmes cellulaires redox majeurs, Trx et glutathion.

Pour aborder ces différentes questions, j'ai utilisé différentes approches de cinétiques classiques et rapides, de modélisation cinétique, mais également d'anisotropie de fluorescence, de génétique de la levure, et de techniques spécifiques en biochimie redox des protéines, résumées dans la Figure 37 page 58.

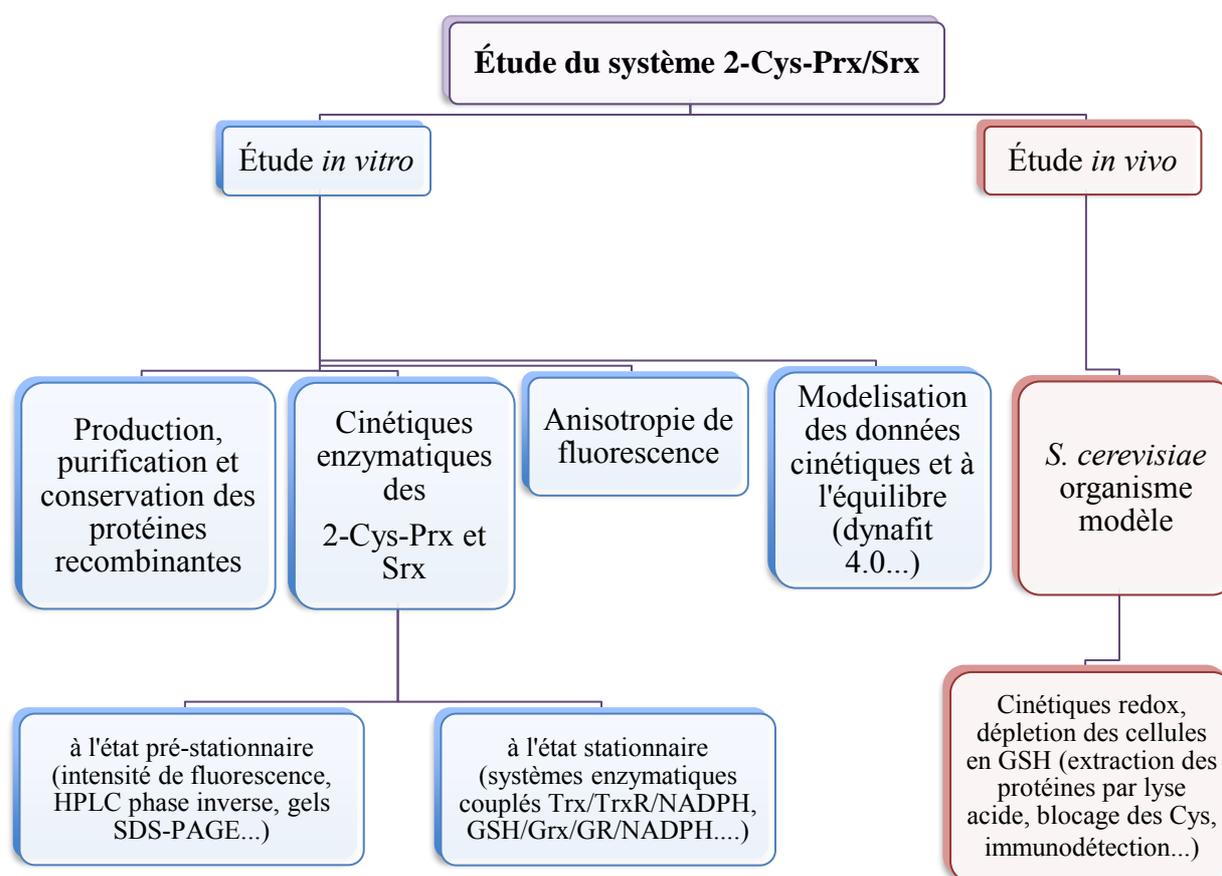


Figure 37 : Stratégie d'étude du système 2-Cys-Prx/Srx

RÉSULTATS & DISCUSSION

I. Étude cinétique du mécanisme de suroxydation d'une 2-Cys-Prx typique

Comme nous l'avons abordé en détails dans le chapitre "Introduction", les 2-Cys-Prx typiques présentent la particularité d'être régulées selon l'état d'oxydation de leur Cys catalytique, en particulier par un surprenant mécanisme de suroxydation par leur propre substrat H_2O_2 (cf. § (3) page 37). Ce phénomène constitue donc le premier élément de régulation du système 2-Cys-Prx/Srx.

Le mécanisme catalytique des 2-Cys-Prx typiques (Figure 38 page 62) implique, i) la réduction de H_2O_2 en H_2O *via* l'attaque de la Cys C_P , conduisant à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique $PrxC_P-SOH$ (101), du point de vue cinétique, cette étape est caractérisée par une constante de vitesse de second ordre⁴ k_{SOH} ; ii) l'intermédiaire $PrxC_P-SOH$ est attaqué par la Cys C_R de la seconde sous unité du dimère, pour donner un intermédiaire pont disulfure intermoléculaire $PrxC_P-S-S-C_RPrx$; cette étape est caractérisée par une constante de vitesse de premier ordre k_{SS} ; iii) cette forme oxydée est ensuite réduite par la Trx, avec une constante de vitesse k_{Trx} (de premier ordre lorsqu'elle est mesurée en concentrations saturantes en Trx). Cependant, la forme $PrxC_P-SOH$ peut également réagir une seconde fois avec une molécule de H_2O_2 pour donner une forme acide sulfinique $PrxC_P-SO_2H$, avec une constante de vitesse de second ordre définie par k_{SO_2} .

⁴ L'ordre d'une réaction chimique indique l'influence d'un réactif dans la cinétique de la réaction. Ainsi, i) une réaction est de premier ordre pour un réactif (A), si la vitesse globale est proportionnelle à la valeur de la concentration de ce réactif (A), ($v = k [A]^1$), ii) une réaction de second ordre pour deux réactifs (A, B), traduit que la vitesse globale dépend des concentrations de (A) et (B) ($v = k [A]^1 [B]^1$).

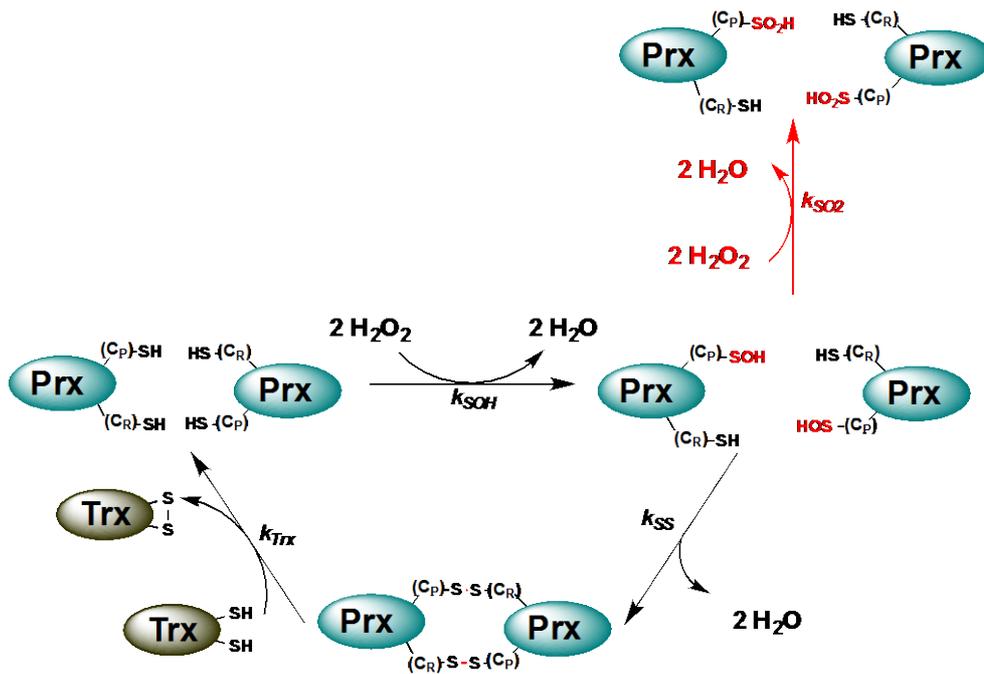


Figure 38 : Schéma du mécanisme et des constantes de vitesse du cycle catalytique des 2-Cys-Prx typiques

Selon l'hypothèse proposée par l'équipe de L. Poole (105), c'est au niveau de l'intermédiaire $\text{Prx}_{\text{Cp-SOH}}$ que se joue la compétition entre les étapes de réduction sous forme disulfure ou d'oxydation sous forme acide sulfinique, qui détermine globalement la cinétique de suroxydation des 2-Cys-Prx typiques.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, aucune donnée cinétique concernant les deux étapes en compétition n'était disponible. Afin de mieux comprendre le mécanisme de régulation des 2-Cys-Prx typiques par suroxydation, nous avons entrepris une étude visant à caractériser les paramètres cinétiques correspondant à ces deux étapes au cours du cycle catalytique de ces enzymes, en utilisant pour modèle la 2-Cys-Prx typique majeure de *S. cerevisiae* (Tsa1) que j'ai produite et purifiée au laboratoire (cf. Matériel & Méthodes § 2 page 131).

1. Stratégie expérimentale

Selon le modèle cinétique présenté ci-dessus, quatre étapes contribuent au cycle catalytique des 2-Cys-Prx typiques. Parmi ces étapes, seule la valeur de k_{SOH} avait été déterminée pour Tsa1 par une méthode par compétition avec la peroxydase de raifort HRP (91). Afin de pouvoir observer ces différentes étapes, nous avons utilisé une approche combinant :

TM L'étude cinétique de la réaction en conditions de cycle unique, *i.e.* en absence de réducteur Trx. Ceci permet de bloquer la réaction à l'étape de formation de l'intermédiaire $\text{PrxC}_P\text{-S-S-C}_R\text{Prx}$. Étant donné que plusieurs groupes avaient reporté que le phénomène de suroxydation n'était observable qu'en conditions de cycle multiple (105,123) (en présence de réducteur), nous avons donc formulé l'hypothèse que l'étape de suroxydation n'était pas significative dans les conditions de cycle unique. Par conséquent, dans cette expérience, seules les étapes correspondant à k_{SOH} et k_{SS} contribueront au message observé qui est basé sur le signal de fluorescence intrinsèque de la protéine. Cette étude permettra de déterminer k_{SS} .

TM L'étude cinétique de la réaction en conditions de cycles multiples, *i.e.* en présence de son réducteur Trx et de son système de recyclage, la TrxR couplée au NADPH. Ce dernier fournit un message spectroscopique permettant de suivre la cinétique réactionnelle. Dans ces conditions, toutes les étapes du cycle catalytique participent potentiellement à la réaction, en particulier le processus de suroxydation. Afin de prendre en compte la contribution individuelle de chacune de ces étapes, les cinétiques seront analysées selon le modèle présenté dans la Figure 38 (page 62), en utilisant un programme d'analyse globale prenant en compte chacune des constantes de vitesse individuelles, afin de déterminer k_{SO2} .

2. Détermination de la constante de vitesse de formation du pont disulfure

La cinétique des deux étapes conduisant à la formation de l'intermédiaire $\text{PrxC}_P\text{-S-S-C}_R\text{Prx}$ de la Tsa1 (ou $\text{Tsa1C}_P\text{-S-S-C}_R\text{Tsa1}$) a été analysée en utilisant une technique de cinétique rapide fondée sur l'extinction de l'intensité de fluorescence intrinsèque de la protéine. En effet, Tsa1 contient trois résidus Trp, dont le signal de fluorescence est affecté selon l'état d'oxydation de la Cys C_P dans le site actif (Figure 39 page 64). Spécifiquement, la $\text{Tsa1C}_P\text{-S-S-C}_R\text{Tsa1}$ émet un message de fluorescence environ 50 % plus faible que la forme $\text{Tsa1C}_P\text{-SH}$ (Figure 40 page 64).

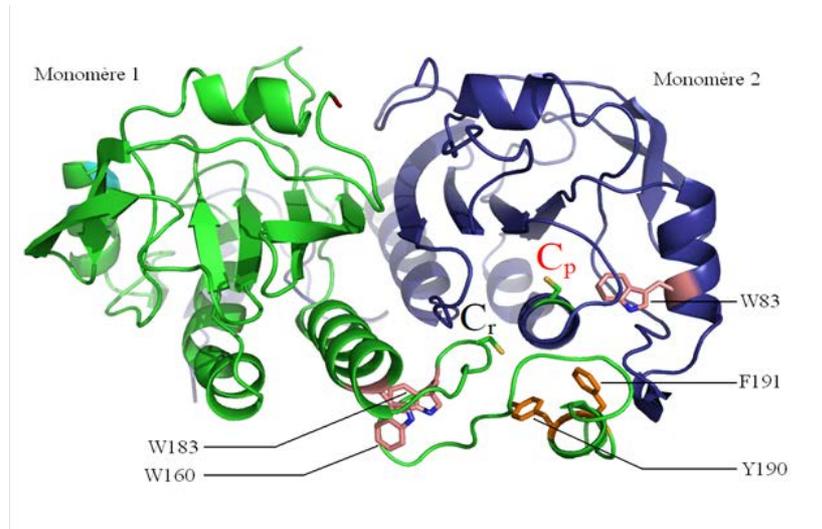


Figure 39 : Représentation du site actif d'une 2-Cys-Prx typique au sein de l'unité dimérique. Les deux sous-unités sont représentées en vert et violet. Les résidus Cys sont identifiés par l'atome de soufre en jaune. Les résidus Trp sont symbolisés en rose pour le squelette carboné et en bleu pour l'azote.

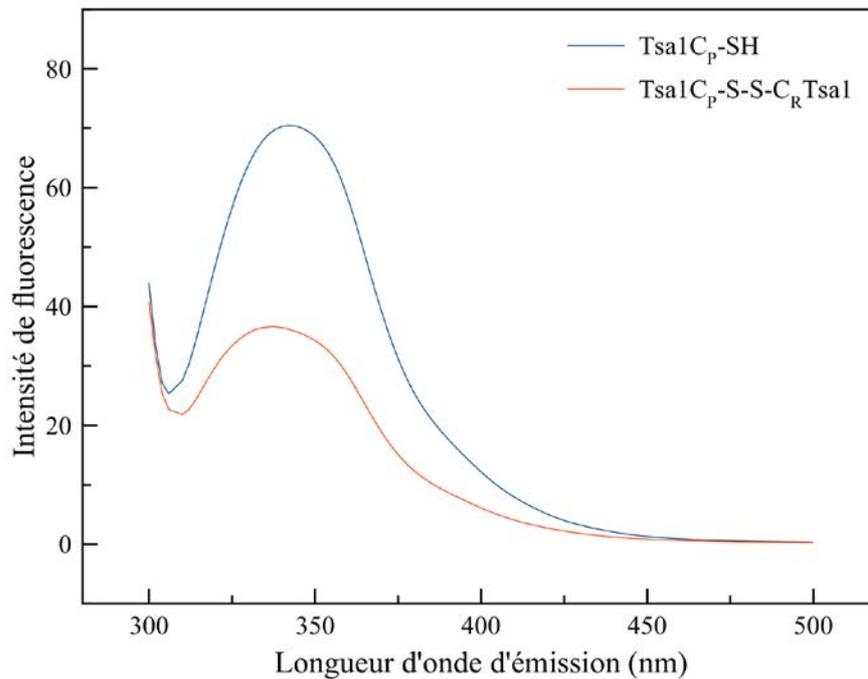


Figure 40 : Spectres d'émission de fluorescence de la Tsa1C_P-SH et de Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1. Les mesures sont effectuées sur un fluorimètre Flx (SAFAS®) dans du tampon TK à une concentration en Tsa1C_P-SH ou Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1 de 2 μM en monomère. La longueur d'onde d'excitation est de 295 nm afin d'exciter sélectivement les résidus Trp et le photomultiplicateur est réglé à 650 V.

L'avancement de la réaction de réduction de H_2O_2 par la Tsa1 en l'absence de réducteur a été suivie à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied photophysics type SX18MV-R (Leatherhead®, UK) (stopped flow). Cet appareil permet de mélanger rapidement volume à volume deux solutions initialement contenues dans deux seringues, et de suivre l'émission de fluorescence du mélange en fonction du temps avec un temps mort très faible de l'ordre de 1 ms. Dans cette expérience, la première seringue contient H_2O_2 (de 0 à 200 μM) dans du tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, pH 7 (tampon TK), la deuxième seringue contient Tsa1 (10 ou 20 μM), dans le même tampon. La température est maintenue à 30°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm afin d'exciter sélectivement les résidus Trp et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'ondes supérieures à 320 nm, correspondant au spectre d'émission de la protéine. Ces mesures ont été effectuées en conditions de cycle unique (ou état pré-stationnaire), en l'absence du réducteur Trx.

Dans ces conditions, les cinétiques observées sont décroissantes, ce qui reflète l'oxydation de la protéine sous forme disulfure, comme attendu. Après déduction du tracé obtenu en l'absence de H_2O_2 (Figure 41 page 66), les cinétiques résultantes sont caractérisées par une phase rapide décrite par un signal monoexponentiel décroissant, et analysées selon la formule (1), avec A correspondant à l'amplitude du signal, k_{obs} à la constante de vitesse de la phase exponentielle et C à une constante.

$$Formule 1 : y = A \left(1 - e^{-k_{obs} t} \right) + C$$

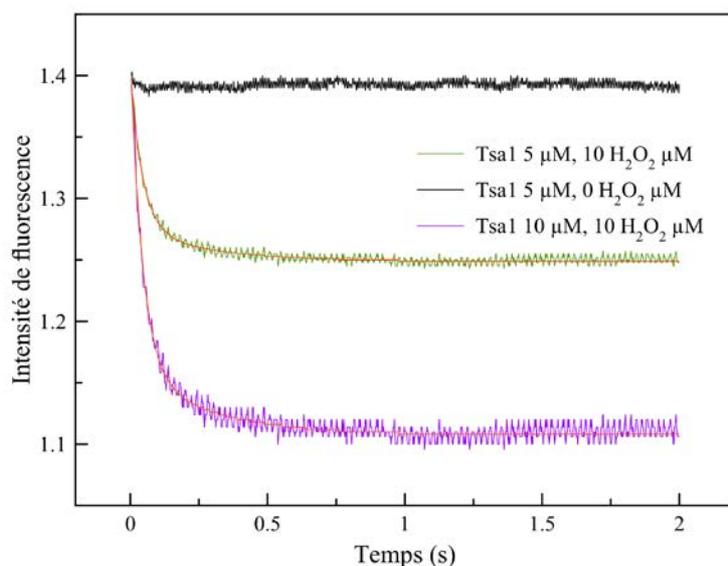


Figure 41 : Cinétiques typiques d'évolution du message de fluorescence de la Tsa1 en absence et en présence de H_2O_2 ($10 \mu M$)

Le suivi de l'avancement de la réaction est réalisé à $30^\circ C$ dans du tampon TK. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm , et l'émission de fluorescence est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 320 nm à $PM = 380 \text{ Volts}$. Le mélange réactionnel est composé de Tsa1 (5 ou $10 \mu M$ finale) et H_2O_2 (0 et $10 \mu M$).

Afin de pouvoir attribuer le signal observé à l'étape de réduction de H_2O_2 (k_{SOH}) ou à l'étape de formation du pont disulfure (k_{SS}), j'ai évalué l'effet de la concentration en enzyme et en substrat sur la cinétique réactionnelle. La variation de la concentration Tsa1 induit une variation proportionnelle de l'amplitude des cinétiques, alors que la valeur de k_{obs} ne varie pas significativement ($\sim 15 \text{ s}^{-1}$) (Figure 41 page 66). Ceci indique un mécanisme de premier ordre par rapport à l'enzyme. D'autre part, les vitesses mesurées pour différentes concentrations de H_2O_2 sont rassemblées dans le tableau 1 page 67.

$[Tsa1]_{\text{finale}}$	$[H_2O_2]_{\text{finale}}$	Amplitude (unités arbitraires)	k_{obs}
5 μM	10 μM	0,13	13 s^{-1}
	20 μM	0,14	13 s^{-1}
	25 μM	0,14	14 s^{-1}
	50 μM	0,12	14 s^{-1}
	75 μM	0,14	16 s^{-1}
	100 μM	0,14	15 s^{-1}

Tableau 1 : Étude cinétique de la réaction catalysée par la Tsa1 en conditions de cycle catalytique unique.

La valeur de l'amplitude de la cinétique est indépendante de la concentration en H_2O_2 , en accord avec une cinétique de premier ordre par rapport à Tsa1. En outre, la constante de vitesse mesurée est également indépendante de la concentration en H_2O_2 , indiquant que le substrat n'intervient pas directement dans le signal observé. Par conséquent, la phase exponentielle enregistrée peut être attribuée à l'étape de formation du pont disulfure et la constante k_{obs} à k_{SS} , égale à $14 \pm 1 s^{-1}$ dans ces conditions.

3. Étude de la constante de vitesse de suroxydation

Dans le but d'accéder à l'étape de suroxydation et à sa constante de vitesse, la cinétique de la réaction a été étudiée en conditions de cycles multiples, à l'état stationnaire, c'est à dire en présence du réducteur Trx. En effet, l'impact de l'étape de suroxydation est plus sensible lorsque l'enzyme effectue un grand nombre de cycles catalytiques, ce qui augmente la fréquence de passage de l'enzyme sous la forme $PrxC_P-SOH$ et la probabilité de l'événement de suroxydation (Figure 38 page 62).

Or, dans ces conditions, en présence de Tsa1 et Trx, les deux protéines contribuent au signal de fluorescence, ce qui rend difficile l'utilisation de ce signal pour le suivi de la réaction. Nous nous sommes donc tournés vers le système couplé Trx/TrxR/NADPH, qui permet de suivre l'avancement de la réaction en suivant la consommation du NADPH par spectrophotométrie d'absorption à 340 nm (Figure 42 page 68). De plus ce système couplé permet de maintenir constante la concentration en Trx réduite.

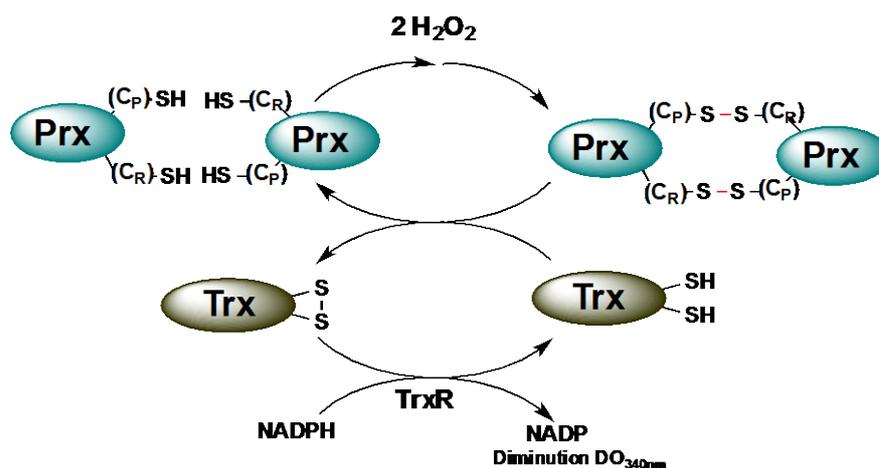


Figure 42 : Schéma du système couplé Trx/TrxR/NADPH, utilisé pour suivre l'avancement de la réaction de réduction de H_2O_2 par Tsa1 (état stationnaire).

Dans ces expériences, les conditions expérimentales ont été choisies de telle sorte que l'étape de réduction de $Tsa1C_P-S-S-C_R Tsa1$ ne soit pas limitante : d'une part la concentration en Trx est maintenue à une valeur saturante de $50 \mu M$, d'autre part la concentration en TrxR a été optimisée afin que le système couplé TrxR/NADPH ne soit jamais limitant par rapport à l'étape de réduction de $Tsa1C_P-S-S-C_R Tsa1$.

Dans ces conditions pour la Tsa1, la valeur de la constante de vitesse de la réaction à l'état stationnaire est de $2 s^{-1}$. Sachant que la constante de vitesse k_{SOH} de formation de l'espèce $Tsa1C_P-SOH$ est de l'ordre de $2.2 \cdot 10^7 M^{-1}s^{-1}$ (91), nous pouvons estimer que k_{Trx} sera toujours inférieure à la constante de vitesse de l'étape peroxydatique (par exemple, à $100 \mu M$ en H_2O_2 , $k_{SOH} \times [H_2O_2] = 2.2 \cdot 10^3 s^{-1}$) et à l'étape de formation du pont disulfure menant à $Tsa1C_P-S-S-C_R Tsa1$ (k_{SS} de $14 s^{-1}$). Avec une constante de vitesse k_{Trx} de $2 s^{-1}$, l'étape de réduction par la Trx représente donc l'étape limitante du mécanisme catalytique global de la Tsa1.

"Comment alors avoir accès à la constante de vitesse de suroxydation k_{SO_2} ? ". Les cinétiques réactionnelles présentées Figure 43 page 70 montrent que pour des concentrations en H_2O_2 supérieures à $100 \mu M$, l'allure de la courbe d'évolution de la concentration en NADP produit n'est plus linéaire, ce qui indique une diminution de la vitesse de la réaction, et traduit une diminution de l'activité de l'enzyme. Cet effet résulte de la suroxydation d'une fraction de Tsa1 dont l'activité peroxydase est alors nulle.

En vue d'extraire la constante de vitesse de suroxydation k_{SO_2} à partir de ces cinétiques, nous avons analysé ces données expérimentales à l'état stationnaire avec le logiciel DynaFit 4.0 (140). Le principal avantage de ce logiciel est qu'il permet d'ajuster directement les données

expérimentales selon un modèle biochimique décrit par des équations symboliques qui sont caractérisées par des constantes cinétiques individuelles (par exemple : $E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{\quad} E + P$) au lieu d'un modèle mathématique (par exemple : $v = \frac{k_{cat}[E]_0 \times [S]_0}{([S]_0 + K_M)}$ ou $y = A \left(1 - e^{-k_{obs} t} \right) + C$). En effet, pour déterminer des constantes microscopiques (constantes de vitesse) ou macroscopiques (constantes d'affinité), l'évolution de la concentration des différentes espèces est calculée par intégration numérique simultanée des équations différentielles correspondant aux étapes du mécanisme et des équations de conservation de la masse. Il n'est donc pas nécessaire de dériver les équations mathématiques complexes qui décrivent un mécanisme enzymatique à plusieurs étapes. L'intérêt supplémentaire de Dynafit est la possibilité d'ajuster simultanément plusieurs jeux de données enregistrés à différentes concentrations en substrat, ce qui permet de déterminer globalement plusieurs paramètres de façon robuste.

Du point de vue pratique, il suffit de spécifier dans un fichier texte « script » (Figure 44 page 71) : i) le mécanisme catalytique (“mechanism”), qui comprend dans notre étude 4 étapes : l'étape peroxydatique caractérisée par la constante de vitesse k_{SOH} ($k1$), l'étape de suroxydation de l'intermédiaire PrxC_P-SOH par H₂O₂ caractérisée par une constante de vitesse k_{SO2} ($k2$), l'étape de formation de PrxC_P-S-S-C_RPrx caractérisée par la constante de vitesse k_{SS} ($k3$) et l'étape de réduction de l'espèce PrxC_P-S-S-C_RPrx par la Trx ($k4$). Les paramètres de ce modèle ($k1=2.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (91), $k3=14 \text{ s}^{-1}$ -ce travail-, $k4=2 \text{ s}^{-1}$ -ce travail-) et le coefficient d'extinction molaire du NADPH qui détermine l'amplitude du signal d'absorbance (“response”) sont des valeurs connues et fixes. Le paramètre k_2 (k_{SO2}) est ajusté aux données expérimentales, comme l'indique le « ? » situé à droite du paramètre inconnu (Figure 44 page 71). De plus, le logiciel permet de prendre en compte les erreurs expérimentales de concentration en ajustant la concentration en enzyme et en H₂O₂, dans la limite spécifiée entre parenthèses, ce qui est important dans le cas de l'ajustement simultané de cinétiques mesurées indépendamment.

Dans ces conditions, l'ajustement des données expérimentales représenté Figure 43 page 70 montre que malgré de légères déviations, les tracés théoriques révèlent un bon degré de cohérence avec les courbes expérimentales, ce qui indique que le modèle proposé permet de décrire la cinétique enzymatique de façon assez fidèle. Cette analyse a permis de déterminer une constante de vitesse $k_{SO2} = 270 \pm 70 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la Tsa1 lorsque les paramètres k_{SS} et k_{Trx} sont fixées à 14 s^{-1} et 2 s^{-1} , respectivement.

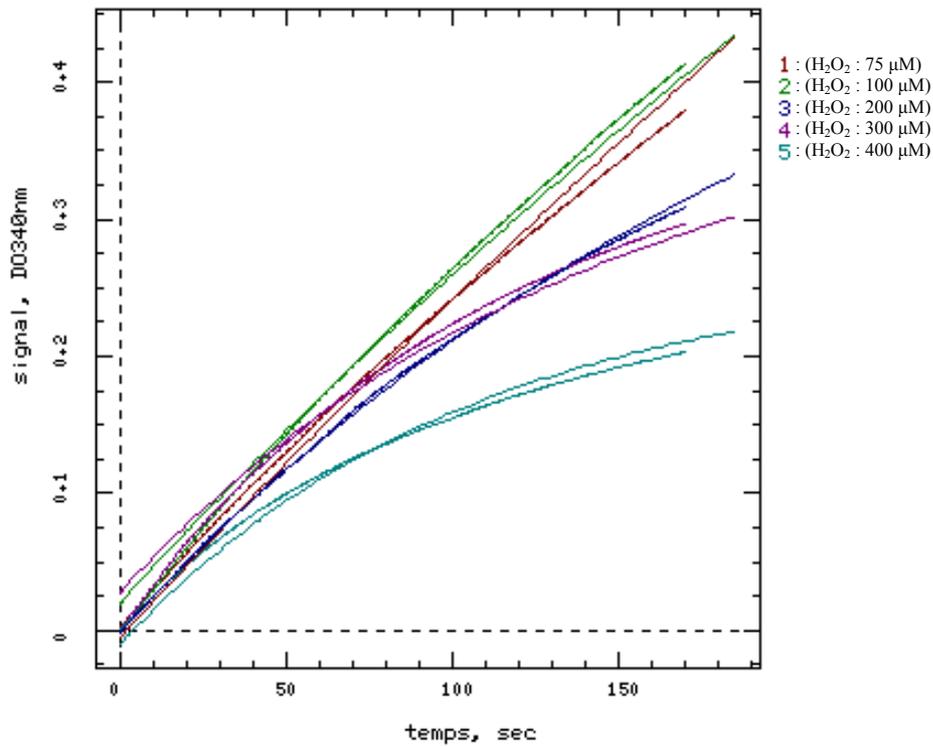


Figure 43 : Cinétiques réactionnelles de réduction de H_2O_2 par Tsa1 en présence du système Trx. La réaction est suivie par la consommation du NADPH couplé au système Trx/TrxR mesurée par spectrophotométrie à 340 nm. Les mesures sont réalisées à 25°C dans du tampon TK. L'ajout de Tsa1 (0.3 μM) déclenche la réaction. Les concentrations sont fixes pour la Trx (50 μM), la TrxR (0,5 μM), le NADPH (200 μM), la concentration de H_2O_2 variant de 75 μM à 400 μM . Les cinétiques expérimentales ainsi que leurs courbes de régression non linéaire obtenues après ajustement par le logiciel DynaFit 4.0 sont de même couleur. Pour des raisons de présentation et d'analyse, la production de NADP est représentée au lieu de la disparition de NADPH. Les mesures sont effectuées sur un fluorimètre Flx (SAFAS®).

```

;-----
[task]
data = progress
task = fit

[mechanism]
Prx + H2O2 ----> PrxSOH : k1
PrxSOH + H2O2 ----> PrxSO2H : k2
PrxSOH ----> PrxCp-S-S-CRPrx : k3
PrxCp-S-S-CRPrx ----> Prx + NADP : k4

[constants]
k1 = 22 ; μM-1.s-1
k2 = 0.0003 ??
k3 = 14
k4 = 2

[responses]
NADP = 0.0062 ; μM-1.cm-1

[concentrations]
Prx = 0.3 ?

[data]
directory ./SuroxydationTsa/data
extension txt

file i075 | concentration H2O2 = 75 | offset auto ?
file i0100 | concentration H2O2 = 100 | offset auto ?
file i0200 | concentration H2O2 = 200 | offset auto ?
file i0300 | concentration H2O2 = 300 | offset auto ?
file i0400 | concentration H2O2 = 400 | offset auto ?

[output]
directory ./SuroxydationTsa/output

[settings]
{Output}
BlackBackground = n
XAxisLabel = temps, sec
YAxisLabel = signal, D0340nm

[end]

```

Définition du mécanisme catalytique et des constantes de vitesse

Valeurs des constantes de vitesse des différentes étapes du mécanisme (en s⁻¹)

Coefficient d'extinction molaire du NADPH d'absorbance mesuré

Prise en compte des erreurs expérimentales mesurées

Localisation et définition des fichiers données

Localisation et définition des fichiers résultats

Conditions de présentation des résultats

Figure 44 : Script utilisé sous le logiciel Dynafit 4.0
 Les données expérimentales obtenues à l'état stationnaire ont été analysées par le logiciel Dynafit 4.0 pour estimer la vitesse de suroxydation k_{SO_2} de la Tsa1.

4. Discussion et perspectives

Le travail décrit dans ce chapitre constitue une première étape dans la mise au point d'une méthode permettant l'étude mécanistique du processus de suroxydation, fondée sur une approche cinétique. En combinant deux types d'expériences permettant de suivre la réaction en conditions de cycles catalytiques multiples (à l'état stationnaire) ou de cycle unique (à l'état pré-stationnaire), nous avons pu déterminer la constante de vitesse des deux étapes du mécanisme catalytique en compétition, qui déterminent la sensibilité de la Tsa1 à la suroxydation. Ainsi, à une concentration en H_2O_2 de $100 \mu\text{M}$ (très élevée par rapport aux conditions physiologiques), la constante de vitesse de l'étape de suroxydation sera de $300 \times 100 \cdot 10^{-6} = 0.03 \text{ s}^{-1}$, ce qui est faible par rapport à la constante de vitesse de formation de l'espèce $\text{Tsa1C}_P\text{-S-S-C}_R\text{Tsa1}$ de 14 s^{-1} . Ceci justifie l'hypothèse formulée ci-dessus (§ 1. page 60), postulant que l'étape de suroxydation n'est pas significative en conditions de cycle unique, et explique pourquoi l'accumulation de $\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H}$ n'est en général observée qu'en condition de cycles multiples, en présence de réducteur. Malgré ce contraste des constantes de vitesse k_{SS} et k_{SO_2} , k_{SS} est suffisamment faible pour rendre la Tsa1 sensible à la suroxydation en conditions de cycles catalytiques multiples.

Cette même méthode a été appliquée au laboratoire par Antoine Bersweiler à la CysGpx, Gpx3/Orp1 (une 2-Cys-Prx atypique). Dans ce cas la constante de vitesse de la première étape de réduction de H_2O_2 (k_{SOH}), s'est avérée être 70 fois plus lente que l'étape correspondante de Tsa1, et devenir ainsi limitante par rapport à l'étape de formation du pont disulfure qui suit, quelle que soit la concentration en H_2O_2 . Par conséquent, en conditions de cycle unique, seule peut être observée la première étape de la réaction. Dans ce cas, la valeur de k_{SS} a pu être néanmoins estimée à au moins 400 s^{-1} , soit une valeur nettement supérieure à celle de Tsa1. Ce résultat est cohérent avec le fait que cette 2-Cys-Prx atypique ne soit pas sensible à la suroxydation, excepté en présence de concentrations très élevées en H_2O_2 (supérieures à $500 \mu\text{M}$) et permet de valider notre stratégie d'étude du mécanisme de suroxydation des Prx par cette approche cinétique. Cette différence avec Tsa1 trouve probablement son origine au niveau structural en raison de la forte mobilité de la région de Gpx3 qui porte la Cys C_R (résidus 69 à 86) (141). En effet cette région n'est pas résolue dans la structure obtenue par cristallographie aux rayons X, alors que la flexibilité de la région correspondante dans Tsa1 est restreinte (cf. Introduction § (3) page 37) (105). Cette observation soulève la question des processus physico-chimiques que recouvre la constante de vitesse k_{SS} : en effet, cette étape pourrait impliquer au moins deux événements, avec une étape de changement conformationnel responsable du

rapprochement les Cys C_P et C_R, ce que suggère la comparaison Tsa1/Gpx3, et une étape chimique de formation du pont disulfure (voir ci-dessous).

En parallèle, une étude du processus de suroxydation des 2-Cys-Prx humaines (Prx2 et Prx3) a été récemment publiée par l'équipe de Winterbourn (142) par une approche différente : les proportions relatives des espèces PrxC_P-SO₂H et PrxC_P-S-S-C_RPrx formées après incubation avec une concentration variable de H₂O₂ ont été analysées par spectrométrie de masse en absence de réducteur puis en compétition avec la catalase à une concentration de H₂O₂ fixe (Figure 45 page 73). De façon indirecte, en modélisant les résultats expérimentaux avec le même modèle que celui que nous avons utilisé (Figure 38 page 62), cette étude a permis d'estimer une constante de vitesse de suroxydation k_{SO_2} d'environ 12 000 M⁻¹ s⁻¹ similaire pour Prx2 et Prx3 et une constante de vitesse k_{SS} de l'ordre de 2 s⁻¹ pour la Prx2 et 20 s⁻¹ pour la Prx3. La Prx3 étant plus résistante à la suroxydation que la Prx2, ceci est en cohérence avec l'hypothèse que la sensibilité à la suroxydation dépend de la valeur de k_{SS} . Toutefois, cette méthode ne permet pas de mesurer directement des constantes de vitesse. De plus elle ne peut s'appliquer qu'à des Prx suffisamment sensibles pour se suroxyder partiellement en l'absence de réducteur, ce qui n'est pas le cas de la Tsa1. D'autre part, dans une étude similaire, l'équipe de T. Lowther (143) a reporté une constante de vitesse de suroxydation de Prx2 différente de l'ordre de 1000 M⁻¹ s⁻¹.

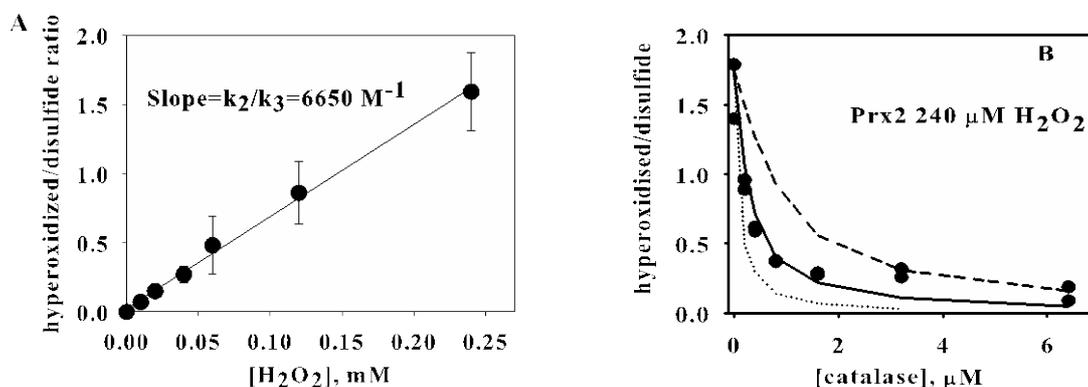


Figure 45 : Exemples d'analyse de k_{SO_2} pour la Prx2 humaine par H₂O₂.

(A) incubation de Prx2 humaine en présence de concentrations variables en H₂O₂ et (B) par compétition avec la catalase. La Prx2 humaine réduite (5 μM) a été traitée avec la concentration indiquée de H₂O₂, puis les protéines ont été réduites par le DTT et alkylées avec du NEM avant analyse par LC-MS. Le ratio de PrxC_P-SO₂H/ PrxC_P-S-S-C_RPrx est représenté en fonction de la concentration en H₂O₂ ou de catalase. En (B), les lignes pleines représentent le meilleur ajustement des données expérimentales, ce qui correspond à $k_2 = 14\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 2 \text{ s}^{-1}$; les lignes pointillées ou sous forme de tirets représentent les ajustements calculés avec des valeurs de k_2 et k_3 respectivement, deux fois supérieures ou inférieures (142).

Nos résultats, confrontés à ceux obtenus sur d'autres Prx, soulèvent les questions suivantes :

- Dans le modèle cinétique que nous avons utilisé, ainsi que d'autres auteurs (Figure 38 page 62), quel(s) processus représente(nt) la constante k_{SS} ? Si le signal de fluorescence que nous avons observé (Figure 41 page 66) inclut nécessairement la formation de la liaison disulfure $\text{Tsa1C}_P\text{-S-S-C}_R\text{Tsa1}$, il est probable que, suite à la réorganisation conformationnelle requise pour rapprocher les deux Cys, des modifications dans l'environnement des résidus Trp contribuent à la variation de fluorescence observée (Figure 41 page 66). Le mécanisme catalytique pourrait ainsi inclure une étape supplémentaire, comme l'avait déjà proposé Wood *et al.*, (144). La constante de vitesse k_{SS} pourrait donc correspondre à l'un et/ou l'autre de ces processus (Figure 46 page 75).
- La réactivité de l'intermédiaire $\text{PrxC}_P\text{-SOH}$ est-elle modulée au cours du cycle catalytique? En effet, les changements conformationnels mis en jeu lors de la formation de l'intermédiaire $\text{PrxC}_P\text{-S-S-C}_R\text{Prx}$ concernent à la fois la Cys C_P et la Cys C_R . Il est probable que cet intermédiaire ne présente pas la même sensibilité à la suroxydation au sein du site actif et après le changement conformationnel (Figure 25 page 39). C'est également ce que suggère le modèle de Wood (Figure 46 page 75). Si effectivement l'étape de suroxydation se produit majoritairement avant le changement conformationnel, on peut se demander pourquoi les valeurs de k_{SO_2} déterminées sur différentes 2 Cys-Prx typiques diffèrent de plusieurs ordres de magnitude, alors que le site actif de ces enzymes est très conservé.

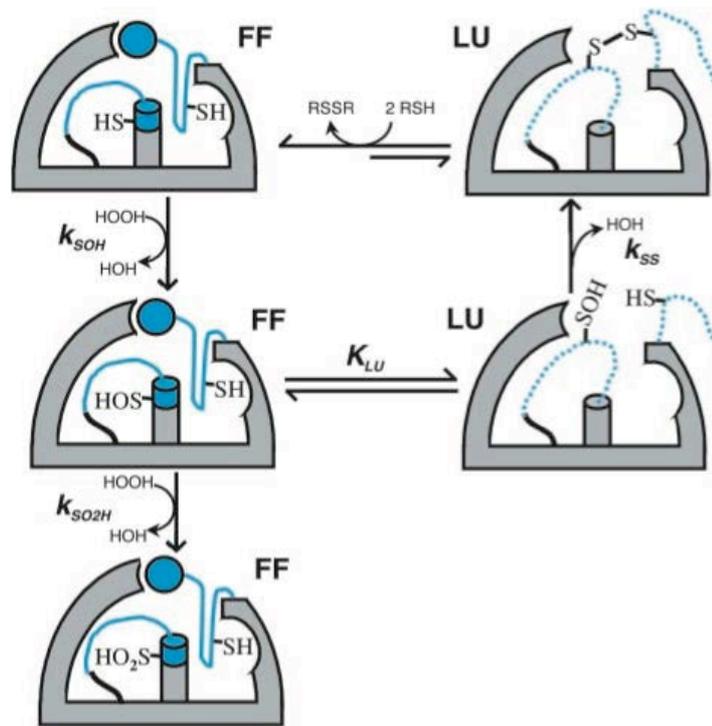


Figure 46 : Représentation schématique des conformations du site actif lors du cycle réactionnel d'une 2-Cys-Prx typique.

Les conformations de type « réduite » de l'enzyme sont représentées à gauche avec l'hélice α C-Ter (boule bleue) et les formes de type oxydée pont disulfure sont représentées à droite du schéma. Les lignes bleues continues et en pointillés représentent les structures qui doivent subir des changements conformationnels au cours de la catalyse. La Cys C_P est représentée par le groupement thiol porté par l'hélice α au centre du site actif, la Cys C_R est représentée par le groupement thiol porté par la structure bleue de droite. (D'après Wood et al., 2003 (144)).

Pour aborder ces questions, nous nous appuyerons sur la méthode que j'ai développée dans ce travail, qui permet de déterminer directement les valeurs de constantes de vitesse en compétition. Un modèle cinétique incluant une ou plusieurs étapes supplémentaires de changements conformationnels sera testé vis-à-vis des données expérimentales déjà obtenues. De plus de récents résultats de cinétique rapide obtenus sur une échelle de temps plus courte ont révélé qu'au moins deux phases supplémentaires très rapides peuvent être observées au cours du cycle de la Tsa1, qui pourraient correspondre aux étapes précédant la formation du pont disulfure. Couplées à des expériences de dichroïsme circulaire qui apporteront un éclairage complémentaire sur les changements conformationnels mis en jeu, ces données devraient nous permettre, en affinant le modèle cinétique, d'apporter des éléments de réponse.

Cette approche permettra également d'évaluer finement le rôle des motifs structuraux qui contribuent à rendre les 2 Cys-Prx typiques sensibles à la suroxydation, comme nous l'avons déjà évoqué (cf. Introduction § (3) page 37), au travers de l'étude de l'impact de mutations dans ces régions sur chacune des étapes du mécanisme catalytique.

II. Étude de la première étape du cycle catalytique de la Srx

La catalyse de la réduction d'un acide sulfinique implique l'activation de ce groupement chimiquement stable avant l'étape réductase. Dans le cas de la réaction catalysée par la Srx, la première étape du mécanisme catalytique est l'activation de la fonction acide sulfinique du substrat $\text{PrxC}_p\text{-SO}_2\text{H}$ par transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP, conduisant à la formation d'un intermédiaire anhydride phosphoryle sulfinique.

Les études initiales de l'activité de Srx de mammifères avaient conduit à la mesure de constantes catalytiques faibles de l'ordre de 0.2 à 0.5 min^{-1} (123,131). Lorsque l'étude de la ScSrx a débuté au laboratoire, une valeur de $1.8\text{-}2 \text{ min}^{-1}$ a été mesurée. Ce faible niveau d'activité enzymatique, inattendu, est probablement corrélé au rôle biologique de Srx dans la régulation cellulaire redox, au travers de la coordination des cycles Prx et Srx, et pourrait constituer un point de contrôle du flux et du niveau de suroxydation des 2-Cys-Prx. Il était donc important d'identifier les mécanismes et facteurs moléculaires à l'origine de cette faible constante catalytique, et en premier lieu, la nature de l'étape cinétiquement limitante du cycle catalytique.

Ces questions ont été abordées initialement par X. Roussel au cours de sa thèse, par la mise au point d'un test d'activité enzymatique couplé, permettant de mesurer la vitesse de formation des produits spécifiques à chacune des deux premières étapes de la réaction : l'ADP pour l'étape de transfert de phosphate, et le phosphate pour l'étape réductase conduisant à la formation de l'intermédiaire thiolsulfinate (cf. Figure 1 publication n°1 page 84). La comparaison des constantes de vitesse de la réaction par ces deux méthodes a permis de montrer qu'elles étaient égales à la constante catalytique, soit proches de 2 min^{-1} . Par conséquent, le processus limitant la vitesse de la réaction catalysée par ScSrx devait être associé à la première étape phosphotransférase.

L'étude approfondie de cette première étape a fait l'objet d'un volet de mon travail de thèse au cours duquel je me suis attachée d'une part, à identifier la nature de l'événement cinétiquement limitant au sein de cette première étape, et d'autre part à caractériser le mécanisme de formation du complexe Michaelien Prx/Srx/ATP qui préside à l'étape chimique du transfert de phosphate.

1. Identification du processus limitant de l'étape phosphotransférase

a) Contexte de l'étude

Ce travail fait suite à celui initié par le Dr. X. Roussel et fait l'objet de la publication n°1 : *The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins*, publié dans *FEBS Letters*. Dans cette publication sont inclus à la fois les résultats que j'ai obtenus concernant l'identification du processus limitant de la ScSrx, mais également ceux obtenus par X. Roussel sur le mécanisme catalytique de cette étape, résumés ci-dessous. Concernant le rôle de la Cys catalytique de la Srx dans l'étape de transfert de phosphate, deux études contradictoires avaient été publiées (131,145). Une première étude du mécanisme des Srx de mammifères, avait conduit Jeong *et al.*, (131) à proposer que le transfert du γ -phosphate de l'ATP sur l'acide sulfinique ne serait pas direct, mais passerait par une étape de phosphorylation de la Cys catalytique de la Srx, conduisant à un intermédiaire phosphocystéine de la Srx. Or, Jönsson *et al.*, (145) ont apporté, au contraire, des arguments en faveur d'un transfert direct du groupement γ -phosphate de l'ATP sur la fonction acide sulfinique de la Prx. Pour tester ces deux hypothèses contradictoires, X. Roussel avait entrepris l'étude de cette étape sur la ScSrx, avec pour objectif d'identifier le rôle de la Cys catalytique dans cette étape. Les résultats obtenus ont permis d'exclure un rôle de la catalytique de ScSrx dans le mécanisme de formation de l'intermédiaire anhydride phosphoryl sulfinique (cf. Figure 1 publication n°1). Pour ce faire, X. Roussel a évalué l'impact de la mutation de la Cys catalytique de ScSrx (Cys84) sur les cinétiques de libération d'ADP et de phosphate en absence de réducteur. Les résultats ont montré que pour la ScSrx sauvage et C84A il y a libération d'ADP à des constantes de vitesse significativement supérieures au bruit de fond (cf. Figure 2 publication n°1). De plus, la constante de vitesse de libération du phosphate mesurée en parallèle pour le variant C84A est similaire à celle de l'ADP, impliquant que le phosphate libéré ne peut provenir que de l'hydrolyse d'une espèce phosphorylée de PrxC_P-SO₂H. Ces résultats ont permis de montrer que le transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP sur la PrxC_P-SO₂H se fait de manière directe.

b) *Résumé des travaux*

Dans l'objectif d'identifier les déterminants moléculaires à l'origine de la faible constante catalytique de Srx, une fois le mécanisme de l'étape phosphotransférase établi, se posait la question de la nature du processus cinétiquement limitant. A priori, ce processus pouvait être associé a) à la reconnaissance entre Srx et son substrat PrxC_P-SO₂H, et ses co-substrats ATP et Mg²⁺, b) à l'étape chimique de transfert de phosphate, c) à l'étape de dissociation de l'ADP, ou d) à tout changement conformationnel associé.

Dans le but de déterminer si cette étape était liée à l'étape de la catalyse chimique de transfert de phosphate, j'ai analysé la cinétique de cette première étape pour le couple Tsa1/ScSrx, en utilisant des analogues des co-substrats ATP et Mg²⁺, à savoir le γ -thio-ATP et le Mn²⁺. La vitesse de la réaction est mesurée par le système couplé Trx/TrxR/NADPH qui permet de suivre la formation de l'espèce Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1 (produit de la réaction catalysée par ScSrx) au cours du cycle catalytique à l'état stationnaire. Au cours du cycle catalytique, l'espèce ScSrx oxydée sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire est également libérée et réduite très efficacement par la Trx, d'où la possibilité de déterminer les paramètres cinétiques de l'étape limitante de la réaction *via* le système couplé en suivant la consommation du NADPH par spectrophotométrie à 340 nm (cf. Matériel & méthodes. Figure 59 page 141). Comparée à la valeur déterminée pour l'ATP, la constante de vitesse à saturation mesurée pour le γ -thio-ATP est diminuée d'un facteur 2 (cf. Tableau 1 publication n°1). La structure chimique de cet analogue étant modifiée uniquement au niveau du groupement γ -phosphate transféré (Figure 47 page 79), ceci suggère que l'étape limitante de la réaction catalysée par ScSrx pourrait être associée au processus de la catalyse chimique de transfert de phosphate.

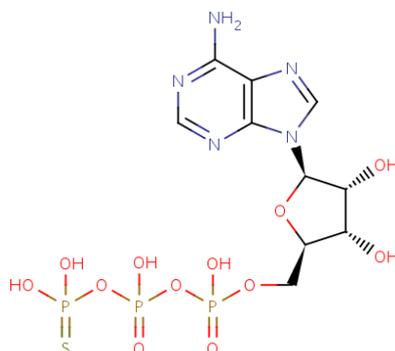


Figure 47 : Structure chimique de l'analogue du co-substrat ATP ; le γ -thio-ATP

Dans un second temps, afin de confirmer cette hypothèse, j'ai étudié la variation de la vitesse de l'étape limitante en fonction du pH, qui permet de révéler les groupements ionisables de la ScSrx, éventuellement de la Tsa1 et/ou de l'ATP impliqués dans la catalyse. En raison de la possibilité d'un effet du pH sur le système couplé Trx/TrxR/NADPH qui le rendrait limitant, j'ai utilisé le signal d'extinction du message de fluorescence de la Tsa1, qui est sensible à son état d'oxydation, pour suivre la vitesse de la réaction (Figure 48 page 80). En effet, ScSrx ne possède pas de résidu Trp, et ne fluoresce quasiment pas après excitation à 295 nm, ce qui nous a amenés à utiliser le signal d'extinction de fluorescence de la Tsa1 pour déterminer la vitesse de réduction de la Tsa1C_P-SO₂H par ScSrx en fonction du pH. Les mesures ont été effectuées en l'absence de réducteur (Trx ou DTT), donc à l'état pré-stationnaire, dans le but d'accumuler l'espèce oxydée Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1 et d'éviter de « polluer » le signal de fluorescence par un bruit de fond supplémentaire.

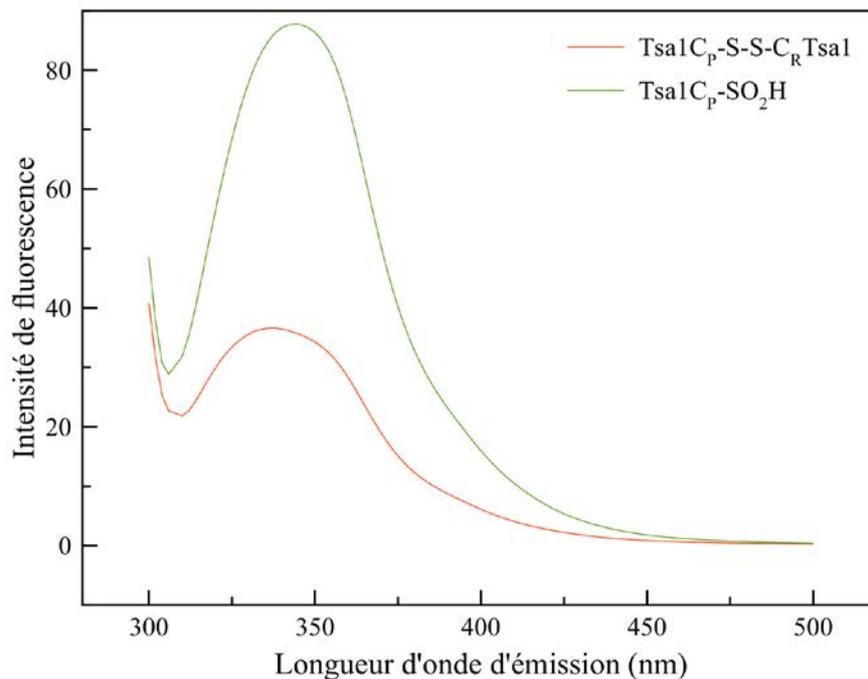


Figure 48 : Spectres d'émission de fluorescence de la Tsa1C_P-SO₂H et Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1. Les mesures sont effectuées sur un fluorimètre Flx (SAFAS®) dans du tampon TK à une concentration en Tsa1C_P-SO₂H et Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1 de 2 μM en monomère. La longueur d'onde d'excitation est de 295 nm afin d'exciter sélectivement les résidus Trp. Le photomultiplicateur est réglé à 650 V.

L'analyse de la constante de vitesse de la première étape en fonction du pH révèle un profil en cloche caractérisé par deux pK_{app}. Le pK_{app} de 6,2 correspond probablement au groupement γ-phosphate, une hypothèse confirmée par le décalage de la valeur de ce pK_{app} de -0,5 lorsque l'ATP est substitué par son analogue, le γ-thio-ATP. Cette interprétation est

confirmée par un effet similaire de la substitution du Mg^{2+} par le Mn^{2+} . Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment que l'étape limitante de la réaction est associée au processus de la catalyse chimique de transfert de phosphate et indiquent que le pK_{app} de 6,2 peut être attribué au groupement γ -phosphate de l'ATP, excluant ainsi l'hypothèse associant cette ionisation au groupement sulfinat du substrat dont le pKa en solution est de 1,9.

Le second pK_{app} de 7,5 observé correspond à un groupement ionisable qui doit être protoné pour que la réaction soit efficace. Ayant attribué le groupement γ -phosphate de l'ATP, ce pK_{app} correspond probablement à un résidu ionisable appartenant soit à la ScSrx, soit à la Tsa1, situé dans l'environnement du site actif au sein du complexe quaternaire Tsa1Cp-SO₂H/ScSrx/ATP/Mg²⁺. J'ai abordé l'étude de ce complexe dans la section suivante.

c) Publication n°1

L'ensemble de ce travail a abouti à la rédaction d'un article intitulé "*The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins*"

The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins

Xavier Roussel, Samia Boukhenouna, Sophie Rahuel-Clermont and Guy Branlant.



The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins

Xavier Roussel¹, Samia Boukhenouna, Sophie Rahuel-Clermont, Guy Branlant*

Unité Mixte de Recherche CNRS-Université Henri Poincaré 7214 AREMS, ARN-RNP structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Nancy Université, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2010

Revised 4 January 2011

Accepted 6 January 2011

Available online 13 January 2011

Edited by Barry Halliwell

Keywords:

Sulfiredoxin

Rate-limiting step

Peroxiredoxin

ATP

Sulfinic acid

Phosphoryl anhydride intermediate

ABSTRACT

The eukaryotic sulfiredoxin (Srx) catalyzes the reduction of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins PrxSO₂ via ATP/Mg²⁺-dependent phosphorylation of the sulfinic acid group, followed by formation of a PrxSO-SSrx thioisulfinate intermediate. Using real-time kinetics of wild-type and C84A Srxs, and pH-rate profiles with ATP/Mg²⁺ analogues, we show that the rate-limiting step of the reaction is associated with the chemical process of transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid, in contrast to that described by Jönsson et al. [7]. Two pK_{apps} of 6.2 and 7.5 were extracted from the bell-shaped pH-rate profile, corresponding to the γ -phosphate of ATP, and to an acid-base catalyst, respectively.

© 2011 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Peroxiredoxins belong to the Cys peroxidase family that reduces hydroperoxides including hydrogen peroxide (H₂O₂) and peroxytrite. Members of the typical eukaryotic two-Cys subfamily contain two essential cysteines. The first, termed the peroxidatic cysteine (2-Cys-Prx catalytic Cys (C_P), i.e., Cys48 in the case of the *Saccharomyces cerevisiae* typical two-cysteine peroxiredoxin (2-Cys-Prx) Tsa1 and referred to as native *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1 (Prx) in the following text), reduces hydrogen peroxide and alkyl hydroperoxide to water and alcohol, and is oxidized to a sulfinic acid (SOH). The second, the resolving cysteine (2-Cys-Prx regeneration Cys (C_R), i.e., Cys171) of the other Prx subunit within the homodimer attacks the sulfinic acid intermediate to form a disulfide [1–4]. This disulfide bond is reduced by thioredoxin (Trx). The peroxidatic cysteine is sensitive to overoxidation by

Abbreviations: 2-Cys-Prx, typical two-cysteine peroxiredoxin; C_P, 2-Cys-Prx catalytic Cys; C_R, 2-Cys-Prx regeneration Cys; LDH, lactate dehydrogenase; m⁷Guo, 7-methylguanosine; NTR, *E. coli* NADPH thioredoxin reductase; PEP, phosphoenolpyruvate; PK, pyruvate kinase; PNP, *E. coli* His-tagged purine nucleoside phosphorylase; Prx, PrxSO₂, native and overoxidized *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1; Srx, sulfiredoxin; Trx, thioredoxin

H₂O₂ to sulfinic acid (SOOH) [4]. This overoxidation, which inactivates the enzyme, is reversed by the enzyme sulfiredoxin (Srx) which reduces the sulfinic acid back to the sulfinic acid state [5]. Such a reversible peroxide-sensitive switch has been demonstrated to regulate the action of certain transcription factors targeting anti-oxidant genes in *Schizosaccharomyces pombe* [6].

Recently, it was shown that reduction of overoxidized 2-Cys-Prx (referred to as overoxidized *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1 (PrxSO₂) in the following text) by Srx involved a covalent intermediate linked by a thioisulfinate bond between the essential cysteine of Srx (referred to as the catalytic cysteine and numbered 84 in the *S. cerevisiae* Srx and 99 in the human enzyme) and the C_P of Prx [7,8]. Formation of the thioisulfinate species requires the activation of the sulfinic acid group of PrxSO₂ by transfer of the γ -phosphate of ATP in the presence of Mg²⁺, leading to a phosphoryl sulfinyl anhydride intermediate (Fig. 1). Reduction of the PrxSO-SSrx thioisulfinate intermediate is completed by Trx via the formation of an intra-disulfide oxidized Srx intermediate in the case of *S. cerevisiae* Srx [9].

Intriguingly, the catalytic rate constant of the Srx-catalyzed reaction was found to be low with a turnover of less than 2 min⁻¹ [8,10], that is limited by a step occurring before or associated with the formation of the thioisulfinate [8]. This low rate is consistent with a role of Srx in regulation of H₂O₂-dependent signaling processes since it would enable hydrogen peroxide to convey its cellular message [11]. This raises the question of the nature of the rate-limiting

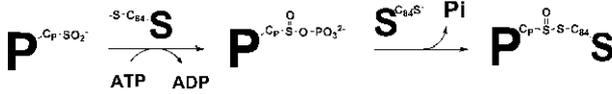


Fig. 1. Catalytic mechanism of the formation of the thioisulfinate intermediate of Srx. P: Prx; S: Srx.

process that leads to the thioisulfinate species. Based on rapid quench/mass spectrometry/¹⁸O exchange coupled technique, a kinetic scheme was put forward for the human Srx, in which a rapid formation of the sulfinyl phosphoryl intermediate is followed by a rate-limiting attack of Srx catalytic Cys (rate constant 1.4 min⁻¹) to give the thioisulfinate intermediate, in competition with hydrolysis (rate constant 0.35 min⁻¹ [7]). Thus, if the proposed scheme is right, the anhydride intermediate would accumulate.

To get insight into the molecular/mechanistic features responsible for these unexpected slow kinetics, we used both real-time enzymatic coupled systems to determine the rates of ADP and phosphate release for wild-type, C84S and C84A Srxs from *S. cerevisiae*, and pH-profile analysis of the rate of the Srx-catalyzed reaction. Taken together, our data support: (i) an overall rate-limiting step for the wild-type enzyme associated with the chemical process of the ATP-dependent activation of the Prx sulfinic acid that implies a non-accumulation of the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediate. Thus, as soon as the anhydride forms, either it reacts efficiently with the catalytic Cys84 of Srx or hydrolyzes when the Cys84 is substituted by an Ala residue, and; (ii) a rate of formation of the phosphorylated Prx intermediate that depends on two pK_{app}s of 6.2 and 7.5. The first pK_{app} corresponds to the C-phosphate of ATP and the second to an acid–base catalyst which would be involved in the ADP release.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tris was obtained from VWR, KCl, and MgCl₂ from Merck, NADH and C-S-ATP from Roche, and ATP, 7-methylguanosine (¹²⁵I-Guo), phosphoenolpyruvate (PEP), lactate dehydrogenase from rabbit muscle (LDH) and pyruvate kinase from rabbit muscle (PK) from Sigma–Aldrich.

Recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* (FNP), N-terminally His₆-tagged fusion of *S. cerevisiae* 2-Cys-Prx Tsa1 (referred to as Prx) and *S. cerevisiae* Srx were prepared following the experimental procedures described previously [8]. Oxidation of Cys C_p into the sulfinic acid state for both wild-type and C171A Prxs to form PrxSO₂, and determination of the steady-state rate of the Srx-catalyzed reaction using the *E. coli* Trx/NADPH thioredoxin reductase (NTR) system with NADPH, were performed as described previously [8].

2.2. LDH/PK/NADH-coupled assay

The kinetics of ADP release were followed under single turn-over conditions by the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH by the PK/LDH/NADH system in the presence of PEP, measured at 30 °C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for absorbance measurements. One syringe contained 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 1 mM PEP, and 400 μM NADH in buffer TK (50 mM Tris–HCl, 100 mM KCl, pH 7) and the other contained 80 μM C171A PrxSO₂, 20 U/ml PK, 60 U/ml LDH, and 10 μM Srx (final concentrations after mixing). For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and the data were deducted from the corresponding data obtained in the presence of Srx. An average of three runs was

recorded for each set of conditions. For wild-type Srx with C171A PrxSO₂, the rate constant k_{obs} was obtained by fitting blank-corrected absorbance traces against Eq. (1), in which c represents the end point and a, the amplitude of the signal. For other conditions, the rate constant k_{obs} was deduced by linear regression.

$$y = \frac{1}{4} a e^{-k_{obs} t} + b \quad (1)$$

The kinetic assay was validated under steady-state conditions using wild-type and C171A PrxSO₂ (which behaves similarly) in the presence of Trx as reducing agent [8].

2.3. FNP-coupled assay

The kinetics of Pi release were followed under single turn-over conditions as described previously [8]. Briefly, the decrease of the emission fluorescence intensity associated with the phosphorolysis of ¹²⁵I-Guanosine (¹²⁵I-Guo) catalyzed by FNP was recorded at 30 °C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus fitted for fluorescence measurements, with the excitation wavelength set at 305 nm, and the emitted light collected above 455 nm using a cutoff filter. One syringe contained 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 300 μM ¹²⁵I-Guo, and 5 μM FNP in buffer TK, and the other contained 80 μM C171A PrxSO₂, 20 μM FNP, and 10 μM Srx (final concentrations after mixing). For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and the data were deducted from the corresponding data obtained in the presence of Srx. For wild-type Srx with C171A PrxSO₂, the rate constant k_{obs} was obtained by fitting fluorescence traces against Eq. (1). For other conditions, the rate constant k_{obs} was obtained by linear regression. For C84A Srx, the rate constant k_{obs} corresponded to the initial rate constant. The fluorescence signal was calibrated independently against Pi concentration.

2.4. pH dependence of the rate-limiting step of the Srx-catalyzed reaction

The pH-profile of the rate-limiting step of the reaction was determined by following the decrease of intrinsic tryptophan fluorescence intensity of the wild-type Prx substrate upon transitioning from the SO₂ form to the disulfide form. As shown previously for the *S. cerevisiae* wild-type enzyme in the absence of added reductant [8], the reaction proceeds until the oxidized disulfide form of Prx is formed, whose intrinsic fluorescence signal is quenched by approximately 80% compared to the PrxSO₂ substrate. The decrease of the emission fluorescence intensity was recorded at 30 °C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus 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 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, and 40 μM PrxSO₂, and the other contained 5 μM Srx (final concentrations after mixing). Each measurement was carried out in 25 mM tricine, 100 mM imidazole, and 75 mM acetate buffer at a constant ionic strength of 0.1 M over a pH range of 5–9 [12]. The ionic strength was verified by conductimetry and adjusted to 0.1 M when necessary using KCl, after calibration against KCl solutions.

For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and the data were deducted from the corresponding data obtained in the presence of Srx. The rate constant k_{obs} was obtained by fitting the fluorescence traces against Eq. (1). The pH profile of the deduced rate constants was then fitted to Eq. (2), in which pK₁ and pK₂ represent the measured apparent pK values, k_{obs,max} the maximum rate constant and αk_{obs,max} the rate constant at high pH.

$$y = \frac{1}{4} \frac{k_{obs,max}}{1 + 10^{pK_1 - pH} + 10^{pH - pK_2}} + b \frac{\alpha k_{obs,max}}{1 + 10^{pH - pK_2}} \quad (2)$$

3. Results

3.1. Characterization of the rate-limiting step

To identify which step(s) in the reaction catalyzed by the Srx from *S. cerevisiae* contributes to the rate of formation of the thio-sulfinate intermediate, the LDH/PK/NADH coupled assay was used to monitor the quantity of ADP released in the first step. In this assay, phosphorylation of ADP by PK in the presence of PEP leads to production of pyruvate, which is then reduced by LDH with the consumption of NADH. Thus, the rate of ADP formation which can be monitored indirectly via the decrease in absorbance of NADH was determined under single turn-over conditions – that is, in the presence of an eightfold excess of C171A PrxSO₂ relative to wild-type Srx, and in the absence of reductant.

A control reaction lacking wild-type Srx produced a slow linear signal with rate lower than 0.05 min⁻¹ which was subtracted from

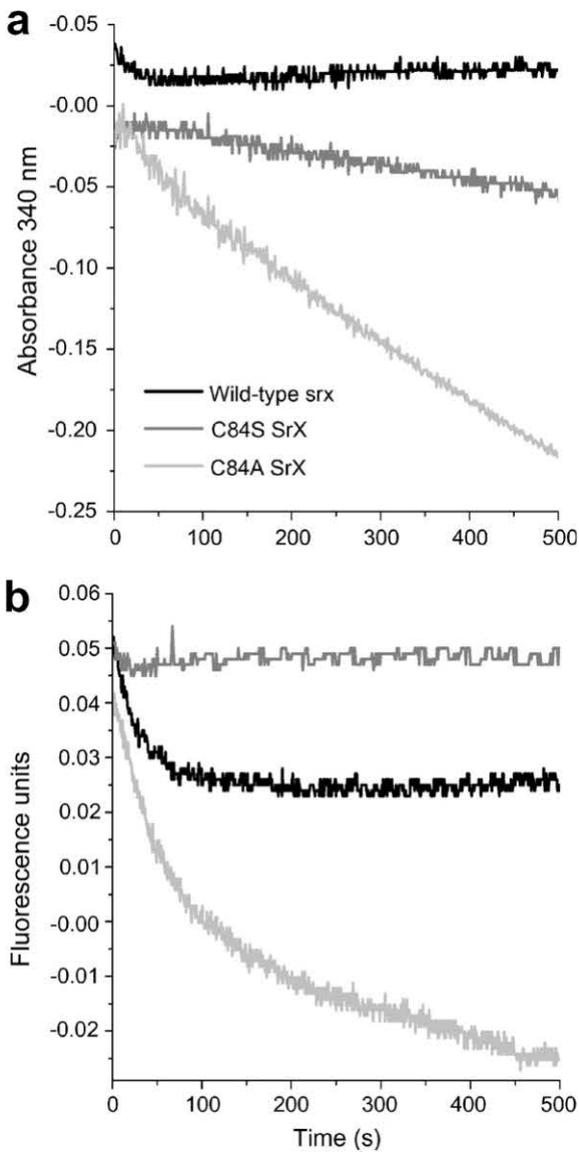


Fig. 2. Single turnover kinetics of the reaction catalyzed by Srx with C171A PrxSO₂. Reactions of 80 μM C171A PrxSO₂ with 10 μM wild-type (black), C84S (grey) and C84A (light grey) Srxs in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ were carried out in buffer TK at 30 °C. (a) The reaction was monitored by ADP release by the LDH/PK/NADH coupled assay (see Section 2.2). (b) The reaction was monitored by the PNP coupled assay (see Section 2.3). The progress curves are corrected from data collected in the absence of Srx.

traces collected under the same conditions in the presence of wild-type Srx. The best fit to the resulting progress curves was obtained with a monoexponential process, yielding a first order rate constant of 2.8 ± 0.5 min⁻¹ which was independent of wild-type Srx concentration (Fig. 2a). This rate constant is close to the rate of Pi release determined under single turnover conditions (1.8 ± 0.2 min⁻¹) and to the steady-state rate constant of the reaction measured either by the NADH/Trx/NTR coupled assay (1.9 ± 0.2 min⁻¹) [8] or by following the rate of Pi release by the PNP-coupled assay (1.7 ± 0.2 min⁻¹) in the presence of excess of Trx [8]. The amplitude of the exponential process was proportional to the concentration of wild-type Srx.

3.2. Rates of release of ADP and phosphate by C84A and C84S Srxs

The rates of release of ADP and phosphate by C84A and C84S Srxs were determined during reaction with C171A PrxSO₂ in the absence of reductant. As described previously, the release of ADP was monitored by the LDH/PK/NADH coupled assay while that of phosphate was followed by the PNP coupled assay. For C84A Srx, the time course of ADP release was linear, yielding a rate constant of 0.6 min⁻¹ (Fig. 2a). We observed a decrease in the rate of phosphate release with time, which resulted in a non-linear time course. Such a behavior remains to be explained. The rate constant for phosphate production in this case was deduced from the initial slope of the curve (Fig. 2b), giving a value of 0.7 min⁻¹, which is similar to that of ADP release. The same experiment with C84S

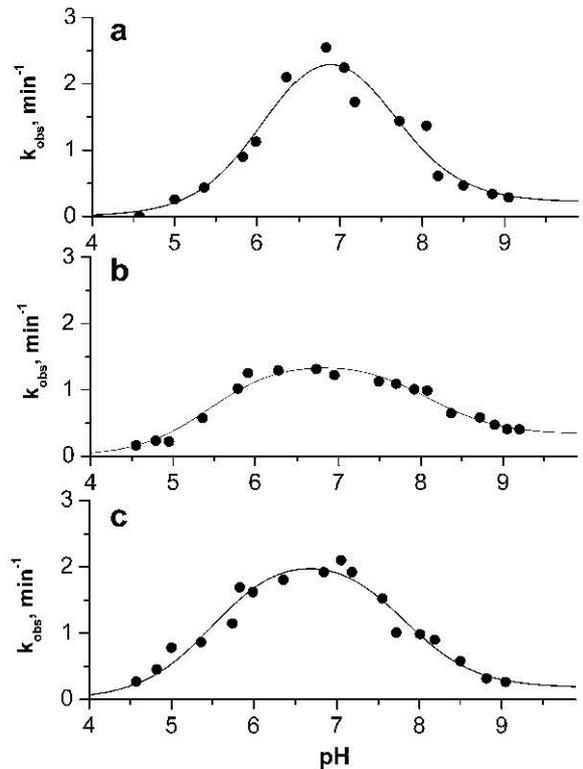


Fig. 3. Representative pH dependence of the rate-limiting step of the Srx-catalyzed reaction. Reaction of 40 μM wild-type PrxSO₂ and 5 μM wild-type Srx was followed at 30 °C by the attenuation of the intrinsic tryptophan fluorescence of PrxSO₂ (see Section 2.4) in the presence of 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂ (a), 1 mM ATP-c-Sand 1 mM MgCl₂ (b) or 1 mM ATP, 1 mM MnCl₂ (c). Each measurement was carried out in 25 mM tricine, 100 mM imidazole, and 75 mM acetate buffer at a constant ionic strength of 0.1 M. Apparent pK_a and pK_c values of 6.2 ± 0.2 and 7.5 ± 0.2 (a); 5.5 ± 0.1 and 8.0 ± 0.2 (b); and 5.5 ± 0.1 and 7.8 ± 0.2 (c) were deduced from the best fit (solid line) of the experimental points (d) against Eq. (2). Results are expressed as the average of two independent determinations (±SD).

Table 1

 Kinetic parameters of wild-type Srx for the co substrates ATP and Mg²⁺, and for the co substrate analogs γ -thio-ATP and Mn²⁺.

	ATP	γ -S-ATP	MgCl ₂	MnCl ₂
K_M (μ M)	125 \pm 50	130 \pm 30	250 \pm 60	230 \pm 70
$k_{obs\ max}$ (min ⁻¹)	1.83 \pm 0.18	0.96 \pm 0.04	1.82 \pm 0.13	1.75 \pm 0.15

The Michaelis constants were determined from activity measurement performed using the Trx/NTR coupled assay in TK buffer pH 7 at 30 °C by following the consumption of NADPH at 340 nm. Reaction of 50 μ M PrxSO₂, 200 μ M NADPH, 50 μ M Trx, 0.5 μ M NTR, and 1 mM MgCl₂ or 1 mM ATP with variable concentrations of the indicated co substrate, were initiated by adding 10 μ M Srx.

Srx yielded an essentially linear time course of ADP release with a rate constant of 0.1 min⁻¹ (Fig. 2a), but no phosphate production was seen (Fig. 2b). A control experiment was carried out under the same conditions using reduced Prx instead of the overoxidized substrate and C84A Srx to evaluate the rate of background ADP and phosphate production. A rate constant of 0.05 min⁻¹ was measured for ADP release while release of free phosphate was not observed. Thus, the phosphate which is released in the presence of C84A Srx and the substrate PrxSO₂ can only derive from hydrolysis of the sulfinyl phosphoryl anhydride species formed on the overoxidized substrate. Indeed, an alternative origin for the phosphate *via* an ATPase activity of C84A Srx is unlikely, given that the background rate of release of ADP is only 0.05 min⁻¹, and background production of phosphate is undetectable for this mutated Srx.

3.3. pH dependence of the rate-limiting step of the Srx-catalyzed reaction

We did not determine the pH-rate profiles using the PNP- or LDH/PK/NADH-coupled assays due to a potential dependence of the assays themselves on pH. Instead, we used as a kinetic probe the attenuation of intrinsic tryptophan fluorescence of wild-type Prx upon formation of the oxidized disulfide species PrxC₆S-SC_RPrx, which is rapid and follows the rate of release of the reaction product PrxSOH [8], whose rate is itself limited by that of the activation of the Prx sulfinic acid. The experiments were carried out under sub-saturating concentrations of PrxSO₂ ($2 \times K_M$) to obtain a sufficient signal to noise ratio, the signal being proportional to the Srx concentration, relative to the intrinsic fluorescence of the PrxSO₂. As shown in Fig. 3a, the rate of reaction exhibits a bell-shaped dependence on pH, which indicates that at least two groups are required to be in the proper ionization state for maximal catalytic activity at pH 7. One of these groups, characterized by a pK_{app} of 6.2 \pm 0.2, must be deprotonated, whereas the other with a pK_{app} of 7.5 \pm 0.2, must be protonated. When γ -S-ATP, whose K_M value is similar to that of ATP (Table 1), was used instead of ATP, the first pK_{app} value shifted from 6.2 to 5.5, while the second was determined to be of 8.0 \pm 0.2 (Fig. 3b). Moreover, a twofold decrease in the $k_{obs\ max}$ was observed (Table 1). Using Mn²⁺ instead of Mg²⁺ led (i) the first pK_{app} value to shift from 6.2 to 5.5, and the second from 7.5 to 7.8; and (ii) to similar $k_{obs\ max}$ (Fig. 3c) and K_M values for Mn²⁺ and Mg²⁺ (Table 1). In principle, these two pK_{apps} can correspond to ionizable groups on amino acids of Prx or Srx within the quaternary Srx/Prx/ATP/Mg²⁺ complex or to the γ -phosphate of ATP. Because the concentration of PrxSO₂ is not fully saturating, the k_{obs} vs. pH curve could also include a PrxSO₂ k_{obs}/K_M contribution.

4. Discussion

In the present study, the rates of release of phosphate and ADP by wild-type Srxs from *S. cerevisiae* have been determined under single turnover conditions. In the case of wild-type Srx with C171A PrxSO₂, the rate of ADP release is similar to that of

phosphate release, both determined under single turnover conditions (2.8 vs. 1.8 min⁻¹) [8]. As a thiol-sulfinate intermediate between Prx and wild-type Srx was shown previously to be formed at a rate of 1.7 min⁻¹ under steady-state conditions [8], this finding supports an overall rate-limiting step for the wild type that includes all steps up to the release of ADP and thus before the formation of the thiol-sulfinate intermediate.

In a previous study, a stoichiometry of one mole of phosphate released per mole of wild-type Srx was observed upon formation of the thiol-sulfinate intermediate in the absence of added reductant [8]. Combined with the above result, this demonstrates that hydrolysis of the sulfinyl phosphate does not occur, nor is detectable under the experimental conditions used. This finding implies that each sulfinyl phosphate anhydride Prx intermediate which is formed proceeds to the thiol-sulfinate PrxSO-Srx species at a much higher intrinsic rate than the 1.4 min⁻¹ reported [7] and does not accumulate. The reason why the Prx intermediate does not hydrolyze but forms a thiol-sulfinate Prx/Srx intermediate is the higher chemical reactivity of the Srx Cys84 (whose pK_{app} is 7.4² as also shown for the human Srx [10]) towards the sulfinyl phosphate anhydride intermediate, relative to a non-activated water molecule, a reactivity which is further favored by an entropic effect due to the relative positioning of the anhydride intermediate and Cys84 within the Prx/Srx complex.

To get deeper into the mechanism of phosphate transfer from ATP to the sulfinate group of PrxSO₂, we performed a kinetic analysis of ADP release rates using C84A and C84S mutants of Srx. As deduced from Fig. 2, the rates of release of ADP and phosphate with C84A Srx are in the same range and significantly higher (0.6–0.7 min⁻¹) than the background. Therefore, formation of a phosphoryl-Cys intermediate on the Cys84 of wild-type Srx can be excluded, in contrast to that suggested by Jeong et al. [13]. It is also in accord with structural data obtained on the human enzyme [14]. The fact that both rates are similar and the time course, in particular of ADP release, is linear indicates no accumulation of the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediate. Therefore, the ‘intrinsic’ rate of hydrolysis of this intermediate is likely significantly higher than 0.6 min⁻¹. Given the difference of pK_a between sulfinic and acetic acid (1.9 vs. 4.3, respectively), this result is consistent with the rate of hydrolysis of a phosphoryl carboxylic anhydride like acetyl phosphate, (0.004 and 0.01 min⁻¹ at pH 7.7 in the absence and presence of 100 mM of Mg²⁺, respectively [15]). Due to the regeneration of the substrate PrxSO₂, a futile cycle occurs that consumes ATP with linear, steady state kinetics, and an amplitude that is only limited by ATP and Mg²⁺ concentration, contrary to the wild-type mechanism that corresponds to single-turnover kinetics, with amplitude limited by the concentration of Srx.

The decrease in the rates of ADP and phosphate release for C84A Srx relative to wild type when using C171A PrxSO₂ as a substrate could be caused by a change in the environment near the γ -phosphate of ATP due to the substitution of Cys by Ala. In the case of C84S Srx, the rate of release of ADP is 0.1 min⁻¹, which is only twofold higher than the background rate, and 28- and 6-fold lower than the rate observed with wild-type and C84A Srxs, respectively. These data suggested that, for as yet undetermined structural reasons which is likely related to the high flexibility of the active site of Srx, the quaternary PrxSO₂/ATP/Mg²⁺/C84S Srx complex is not competent to transfer the γ -phosphate of ATP to PrxSO₂. The fact that no phosphate release was observed supports this interpretation.

The pH dependence of the rate of formation of the sulfinyl phosphoryl anhydride shows a bell-shaped profile from which two pK_{apps} of 6.2 and 7.5 were extracted. Based on the above demonstration that phosphate transfer does not depend on Cys84, the first ionization of pK_{app} 6.2 may be attributed to either the sulfinate group of PrxSO₂, or to the γ -phosphate group of ATP. Attribution of

the ionization to the γ -phosphate was established from the observation that the first pK_{app} decreased when ATP- γ -S and Mn^{2+} were used instead of ATP [16,17] and Mg^{2+} [18], respectively. Taken together, the data clearly demonstrate: (i) a rate-limiting step associated with the chemical process leading to the transfer of the γ -phosphate from ATP to the sulfinic acid; and (ii) the γ -phosphate of ATP as the group with a pK_{app} of 6.2, and thus excludes the sulfinic acid whose pK_{app} in solution is ~ 2 [19].

The nature of the second pK_{app} remains to be determined. The difficulty with this measurement stems partly from the overall low rate of turnover of Srx, which precludes kinetic comparison of the effects of different mutations introduced into the active site. The transfer of the γ -phosphate involves the release of ADP which is likely to be assisted by an acid catalyst. A candidate residue deduced from the inspection of the crystal structure of human Srx in complex with ATP- Mg^{2+} is His100 [14], which corresponds to His85 in the *S. cerevisiae* Srx. Indeed, substitution of this His by Asn either in the *S. cerevisiae*² or human [13] enzymes leads to a complete loss of activity, with a k_{cat} value approximately equal to that of background (e.g., a 20-fold decrease at least).

From a chemical point of view, the rate of the phosphotransferase activity was expected to be rapid. Indeed, a sulfinic acid has a pK_{app} of ~ 2 and is a better nucleophile than a carboxylate group [19]. However, the measured $k_{obs\ max}$ value is low ($2\ min^{-1}$). The structural/molecular factors which would be responsible for this low $k_{obs\ max}$ value remains to be elucidated. Nevertheless, the rate of formation of the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediate, although low, is sufficient to repair the overoxidized Prx as shown by *in vivo* experiments [5,10]. This fact could explain why no additional evolutionary pressure has occurred to force the sulfinic acid to reveal its 'intrinsic' chemical reactivity.

Acknowledgements

This work was supported in part by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, and by the French Agence Nationale de la Recherche (program ANR-06-BLAN-0369). X. Roussel and S. Boukhenouna were both supported, by the French Research Ministry. We thank I. Artaud and K. Weissman for helpful discussions and A. Kriznik and J. Charbonnel for excellent technical assistance.

References

- [1] Kang, S.W., Baines, I.C. and Rhee, S.G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303–6311.
- [2] Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. and Nakayama, K. (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem. J.* 351, 107–114.
- [3] Baker, L.M. and Poole, L.B. (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J. Biol. Chem.* 278, 9203–9211.
- [4] Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. and Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- [5] Biteau, B., Labarre, J. and Toledano, M.B. (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–984.
- [6] Vivancos, A.P., Castillo, E.A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M.B. and Hidalgo, E. (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H_2O_2 -sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8875–8880.
- [7] Jönsson, T.J., Tsang, A.W., Lowther, W.T. and Furdul, C.M. (2008) Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* 283, 22890–22894.
- [8] Roussel, X., Bechade, G., Kriznik, A., Van Dorselaer, 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.
- [9] 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.
- [10] Chang, T.-S., Jeong, W., Woo, H.A., Lee, S.M., Park, S. and Rhee, S.G. (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J. Biol. Chem.* 279, 50994–51001.
- [11] Hall, A., Karplus, P.A. and Poole, L.B. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276, 2469–2477.
- [12] Ellis, K. and Morrison, J. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* 87, 405–426.
- [13] Jeong, W., Park, S.J., Chang, T.S., Lee, D.Y. and Rhee, S.G. (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* 281, 14400–14407.
- [14] Jönsson, 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.
- [15] Koshland, D.E. (1952) Effect of catalysts on the hydrolysis of acetyl phosphate. Nucleophilic displacement mechanisms in enzymatic reactions 1. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2286–2292.
- [16] Pecoraro, V.L., Hermes, J.D. and Cleland, W.W. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of $MgATP$ and $MgADP$. *Biochemistry* 23, 5262–5271.
- [17] Frey, P.A. and Sammons, R.D. (1985) Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates. *Science* 228, 541–545.
- [18] Sigel, H. (1987) Isomeric equilibria in complexes of adenosine 5'-triphosphate with divalent metal ions. Solution structures of $M(ATP)^{2-}$ complexes. *Eur. J. Biochem.* 165, 65–72.
- [19] Reddie, K.G. and Carroll, K.S. (2008) Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 746–754.

² S. Boukhenouna, personal communication.

2. Caractérisation du mécanisme de formation du complexe Michaelien

Ayant établi que la réaction catalysée par la Srx est cinétiquement contrôlée par le processus de transfert de phosphate, se posait alors la question de la nature des facteurs moléculaires responsables de la faible constante de vitesse de cette étape. Du point de vue de la chimie réactionnelle, cette étape devrait être rapide, en raison du caractère nucléophile de la fonction acide sulfinique (pK_a 1,9 (146)). En outre, le transfert de phosphate implique le départ de l'ADP, qui doit probablement être assisté par une catalyse acide impliquant un résidu du site actif. L'inspection de la structure d'un complexe de la *HsSrxC99A* et la *HsPrxC52D* avec l'ATP suggère que l'His85 de la *ScSrx* (His100 dans la *HsSrx*) (Figure 49 page 88) pourrait jouer ce rôle et que son ionisation pourrait correspondre au pK_{app} de 7,5 observé dans le profil cinétique en fonction du pH pour cette étape (§ précédent). De plus, le résidu His85 pourrait participer à la stabilisation de l'état de transition formé au cours de la réaction de transfert (Figure 50 page 89). Les enzymes catalysant des réactions de transfert de phosphate comme les GTPase (du type Ras) ou les kinases passent par un état de transition de géométrie bipyramide trigonale au cours duquel le groupement transféré adopte une géométrie plane (Figure 50 page 89). La charge négative qui se développe sur cet état de transition pourrait être également stabilisée par le résidu invariant Arg86 de la *ScSrx* (Arg101 dans la *HsSrx*) (Figure 49 page 88).

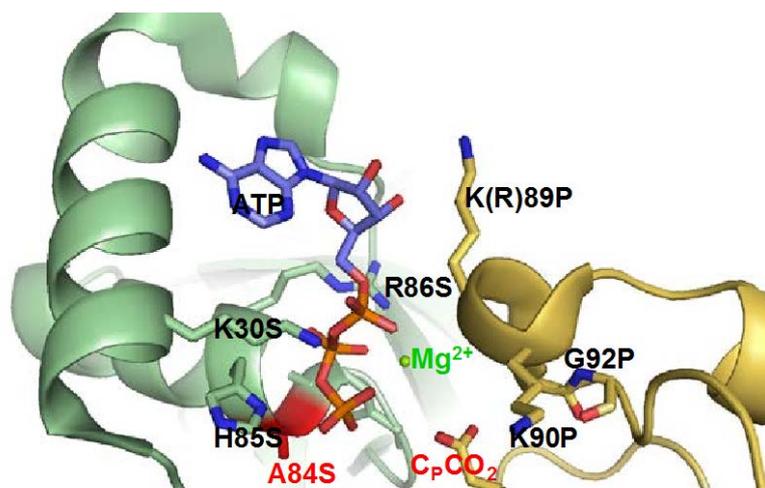


Figure 49 : Position et nature des résidus participant au site actif au sein du complexe Prx/ATP/Mg²⁺/Srx

La numérotation des acides aminés suit celle de *ScSrx* suivie de la lettre S (vert) et *Tsa1* suivie de la lettre P (jaune). La Cys catalytique (Cys84 de *ScSrx*) de *Srx* est remplacée par une Ala. La Cys C_P de *Prx* est remplacée par l'Asp. La molécule de Mg²⁺ est indiquées en boule verte, l'ATP est présenté sous forme de bâtons. (Code pdb : 3HY2).

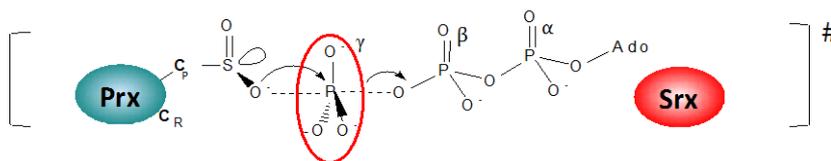


Figure 50 : Schéma hypothétique de l'état de transition de la réaction de transfert du γ -phosphate de l'ATP sur le groupement sulfiniate de la $\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H}$.

Ainsi, une hypothèse permettant d'expliquer la faible valeur de la constante catalytique serait que le complexe quaternaire $\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H/Srx/ATP/Mg}^{2+}$ serait catalytiquement peu efficace, en raison d'un positionnement suboptimal du phosphate γ de l'ATP par rapport à l'acide sulfinique et/ou d'une faible stabilisation de ce complexe au niveau de l'état de transition. Dans ce contexte, nous avons entrepris :

- la recherche de composés analogues de phosphate pouvant mimer la structure de l'état de transition au niveau de ce complexe
- l'étude du mode de formation de ce complexe et de sa stabilité.

a) Recherche de composés analogues de phosphate mimant l'état de transition

Dans le but d'étudier un complexe analogue de l'état de transition (Figure 51 page 89), nous avons analysé les propriétés d'inhibition de la ScSrx par le fluorure d'aluminium (AlF_3), un composant chimique utilisé classiquement pour étudier les enzymes à fonction phosphate transférase comme les kinases ou GTPases (147). Ce composé mime la géométrie plane du groupement γ -phosphate de l'ATP au cours des réactions de transfert (Figure 51 page 89).

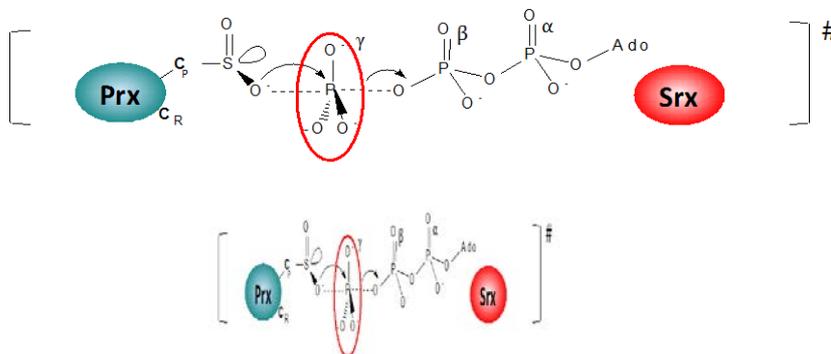


Figure 51 : La structure géométrique plane du fluorure d'aluminium est proche de celle du groupement γ -phosphate de l'ATP au niveau d'un état de transition de type bipyramide trigonale.

L'utilisation de ce composé nécessite des précautions liées à son instabilité, ce qui

requiert de le préparer en présence d'une concentration élevée de fluorure de sodium (NaF) (source de fluorure) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3) (source d'ion Al^{3+}) qui est ajouté en dernier. Pour analyser l'effet inhibiteur de AlF_3 sur la réaction catalysée par la ScSrx, j'ai mesuré la variation de la constante de vitesse (k_{obs}) en fonction de la concentration de AlCl_3 et NaF, dans une gamme allant de 2 à 10 mM. Les résultats sont résumés dans tableau suivant :

AlCl_3 (mM)	NaF (mM)	k_{obs} (min^{-1})
0	0	1.23 (contrôle positif)
2	50	1.28
4	50	1.18
6	50	1.37
8	50	1.1
10	50	1.3

Tableau 2 : Tests de l'activité sulfinyl réductase de ScSrx en présence de AlF_3 . Le mélange réactionnel comporte : ScSrx (50 μM), $\text{TsaC}_P\text{-SO}_2\text{H}$ (50 μM), ATP (1 mM), MgCl_2 (1 mM) et des concentrations variables en AlCl_3 et NaF. Les tests d'activité de ScSrx ont été effectués à pH 7 et à 30 °C, en utilisant le système couplé Trx/TrxR/NADPH.

Les variations non significatives de la constante de vitesse (k_{obs}) révèlent que ce composé (AlF_3) ne possède probablement pas de propriétés inhibitrices pour l'activité sulfinyl réductase de la ScSrx dans ces conditions expérimentales. Cependant, l'effet conjoint de l'ADP et de l' AlCl_3/NaF n'a pas pu être évalué en raison de l'inhibition observée par l'ADP seul. De même, des essais ont été effectués avec le vanadate, un composé qui peut adopter une structure pentacovalente proche de celle du groupement γ -phosphate de l'ATP (148). Ces tentatives se sont révélées également infructueuses.

b) Étude de la formation des complexes Prx/Srx/cosubstrat par anisotropie de fluorescence

Bien qu'un composé mimant l'état de transition de la réaction de transfert de phosphate n'ait pu être identifié, l'étude d'un complexe quaternaire de type Michaelien $\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H}/\text{ATP}/\text{Mg}^{+2}/\text{Srx}$ pourrait apporter des informations sur les facteurs moléculaires contribuant à la stabilité et au positionnement relatifs des groupement sulfinite, γ -phosphate de l'ATP et résidus d'acides aminés du site actif.

Dans le but d'étudier le mode de formation de ce complexe et d'étudier la contribution

de résidus des deux partenaires Srx et Prx à sa stabilité, nous avons adopté une stratégie permettant d'observer la formation des complexes Prx/Srx/cosubstrat en utilisant un analogue fluorescent de l'ATP suivi par anisotropie de fluorescence. Cette méthode permet d'étudier les complexes binaires, ternaires ou quaternaires entre les partenaires de la réaction, grâce à une sonde participant directement au site actif. De plus, il est à signaler qu'en raison de la faible vitesse de la réaction catalysée par Srx, l'étude cinétique de l'impact de certaines mutations du site actif de Srx a révélé une diminution de la constante de vitesse qui devient alors non mesurable. L'anisotropie de fluorescence représentait donc une alternative pour étudier la formation et la stabilité du complexe $\text{PrxC}_P\text{-SO}_2\text{H /ATP/Mg}^{2+}\text{/Srx}$ et analyser le rôle des résidus composant le site actif.

(1) Principe de la méthode

L'utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour l'étude de complexes non-covalents repose sur le fait que la polarisation du signal de fluorescence émis par un fluorophore excité par une source de lumière polarisée diffère selon que ce fluorophore existe à l'état libre ou lié sous forme de complexe. L'anisotropie mesure l'intensité relative de l'émission de fluorescence dans les directions parallèle et perpendiculaire à celles de la source d'excitation. Elle permet de suivre la dépolarisation de fluorescence d'un échantillon, qui peut être causée par plusieurs phénomènes (mouvement brownien, vibration de torsion, transfert d'énergie ...), mais dont la principale cause est la rotation par diffusion des fluorophores. En effet, la direction de l'émission de fluorescence dépend de la liberté de rotation du fluorophore dans le milieu. Une molécule de petite taille tourne rapidement et émet de la lumière fortement dépolarisée, par conséquent, l'anisotropie sera faible. Par contre si ce ligand fluorescent est fixé sur une grosse molécule, il tournera moins rapidement et la lumière sera faiblement dépolarisée. Le taux de polarisation et l'anisotropie seront élevés. L'exploitation de cette différence d'anisotropie permet de déterminer la constante de dissociation du complexe (K_d) lors d'expériences de titration.

Dans cette étude, afin de pouvoir étudier la formation des complexes entre la Srx et son substrat suroxydé, nous avons utilisé un analogue d'ATP fluorescent et non hydrolysable comme sonde, à savoir le mant-ADP, qui porte le groupement fluorescent N-méthyl-anthraniloyle sur les 2'/3'-OH du ribose (Figure 52 page 92). Comme le montre la structure du complexe Prx/Srx (Figure 49 page 88), l'architecture du site actif au sein de ce complexe peut accommoder un analogue de l'ATP modifié aux positions 2'/3' du ribose, qui pointent vers le

solvant.

Cat. No.	Amount
NU-201S	150 Units
NU-201L	750 Units

1 unit = 1 μ l of a 10 mM solution

Applications:

- MYOSIN-ATPase cycle^[1]
- SecA cycle^[2]
- Dissociation kinetic protein kinase A^[3]
- FRET: kinesin^[4], myosin^[5, 1]
- Conformational dynamic: DnaC-protein^[6]

Specific Ligands:

- Kinesin head domains^[4]
- Myosin^[5]

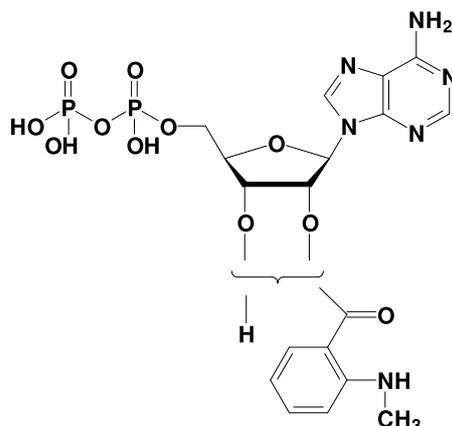


Figure 52 : Structure chimique du mant-ADP (2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-adenosine-5'-diphosphate).

Cat. No.: NU-201

Molecular Formula: C₁₈H₂₂N₆O₁₁P₂ (free acid)

Molecular Weight: 560.35 (free acid)

Purity: > 95%, clear aqueous solution, pH 7.5

Spectroscopic properties:

λ_{max} 255/355 nm; ϵ 23300/5800; λ_{exc} 365 nm;
 λ_{em} 448 nm

Storage conditions:

Short term exposure (up to 1 week cumulative) to ambient temperature possible. Long term storage at < -20°C. If stored as recommended, Jena Bioscience guarantees optimal performance of this product for 12 months after date of delivery.

(2) *Étude des complexes binaires*
For research use only!

La variation de la valeur de l'anisotropie de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un appareil spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC. Du point de vue technique, il est nécessaire de travailler en faible concentration d'analogue fluorescent par rapport à la concentration en protéine afin de favoriser la formation de 100% de ligand sous forme de complexe. Les titrations sont conduites par dilutions en cascade, ce qui permet de balayer une très large gamme de concentration en protéine.

Selected References:

- [1] Robertson *et al.* (2005) Structural rearrangements in the active site of smooth muscle myosin. *Biophysical J.* **89**:1882.
- [2] Fak *et al.* (2004) Nucleotide exchange from the high-affinity ATP-binding site in SecA is the rate-limiting step in the ATPase cycle of the *Escherichia coli* SecYEG complex. *Biochemistry* **43**:7307.
- [3] Ni *et al.* (2000) Insights into nucleotide binding in protein kinase A using fluorescent adenosine derivatives. *Protein Science* **9**:1818.
- [4] Hackney *et al.* (2009) Half-site inhibition of dimeric kinesin head domains by monomeric tail domains. *Biochemistry* **48**:3448.
- [5] Sun *et al.* (2006) Dynamics of the upper 50-kDa domain of myosin V examined with fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **281**:11111.
- [6] Galletto *et al.* (2005) The nucleotide-binding site of the *Escherichia coli* DnaC protein: Molecular topography of DnaC protein-nucleotide cofactor complex. *Cell Biochem. and Biophys.* **43**:331.
- Chen *et al.* (2009) ADP but Not Pi Dissociation Contributes to Rate Limitation for *Escherichia coli* Rho*. *The journal of biological chemistry* **284** (49):33773.

Dans un premier temps, j'ai étudié les interactions binaires entre la ScSrx ou son substrat Tsa1C_P-SO₂H avec l'ADP. Ce complexe existe sous deux états.

La fluorescence du mant-ADP n'étant pas significativement affectée par la liaison à l'une ou l'autre des protéines, le signal d'anisotropie mesuré correspond à la contribution de chacun des deux états en fonction de leur concentration :

$$\text{Formule (2)} : A = [x_f]A_f + [x_b]A_b$$

Avec $[x_f]$ et A_f correspondant à la concentration et à l'anisotropie du ligand libre, respectivement, $[x_b]$ et A_b correspondant à la concentration et à l'anisotropie du ligand lié.

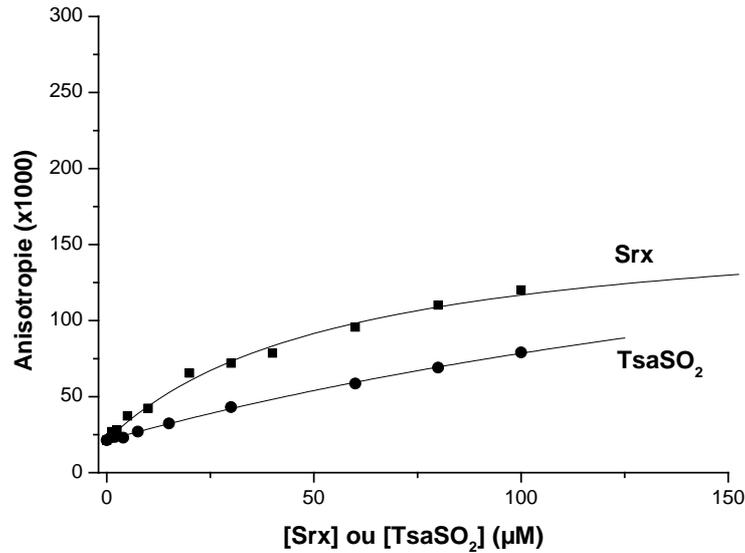


Figure 53 : Suivi de la formation des complexes binaires ScSrx/mant-ADP vs TsaIC_P-SO₂H/ mant-ADP par anisotropie de fluorescence. L'anisotropie de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un appareil spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 355 nm, et l'émission de fluorescence est collectée à 448 nm. Le mélange réactionnel est composé de 0,5 µM mant-ADP et de concentrations variables de ScSrx ou TsaC_P-SO₂H. Les données expérimentales (points noirs) ont été analysées selon un modèle hyperbolique simple (ligne continue). La température est fixée à 25°C.

Les données expérimentales obtenues pour la titration du mant-ADP avec chacune des deux protéines (Figure 53 page 93) sont décrites de façon adéquate par un modèle simple hyperbolique et ont été ajustées selon la formule (3) :

$$\text{Formule (3)} : Y = \frac{A_b \cdot P}{K_d + P}$$

Avec P correspondant à la concentration en protéine ajoutée et K_d à la constante de dissociation du mant-ADP.

Dans le cas de la TsaC_P-SO₂H, la titration n'atteignant pas la saturation même à concentration élevée (> 100 µM) suggère qu'elle ne fixe pas le ligand de façon spécifique (Figure 53 page 93). Ces titrations permettent néanmoins une estimation de la constante d'affinité K_d: > 300 µM et 56 ± 6 µM et pour, respectivement, la TsaC_P-SO₂H et ScSrx. La formation de ces complexes binaires traduit donc une affinité relativement faible de fixation du mant-ADP par ScSrx.

(3) *Étude du mode d'assemblage du complexe de type Michaelien*

Dans le but d'étudier en détail l'interaction entre les composants du complexe de type Michaelien, nous avons analysé l'interaction entre le mant-ADP et les deux protéines Tsa1C_P-SO₂H et ScSrx ajoutées ensemble (en stœchiométrie 1:1), par la même approche. Dans ce cas, l'intensité totale de fluorescence du ligand sous forme liée est significativement plus élevée que sous sa forme libre, ce qui nécessite un traitement préalable des données pour extraire la fraction de ligand sous forme liée :

$$\text{Formule (4)} \quad Fb = \frac{A-Af}{(Ab-A)\left(\frac{Qb}{Qf}\right) + A-Af}$$

Avec A : valeur d'anisotropie mesurée, Af : valeur d'anisotropie du mant-ADP à l'état libre et Ab : valeur d'anisotropie du mant-ADP à l'état lié, Qb et Qf, intensité de fluorescence du mant-ADP, respectivement, sous forme liée et sous forme libre.

Les données expérimentales représentées en noir (Figure 54 page 95) montrent l'importance de la correction apportée, la courbe de titration corrigée étant significativement décalée par rapport à la titration brute. De plus, la courbe de titration corrigée ne suit pas un tracé hyperbolique : aux faibles concentrations en protéine, nous pouvons identifier une phase « d'accélération » de la formation du complexe, mise en évidence par la représentation logarithmique (Figure 54 page 95). L'analyse de ces expériences ne pouvait donc pas se faire par un modèle hyperbolique simple.

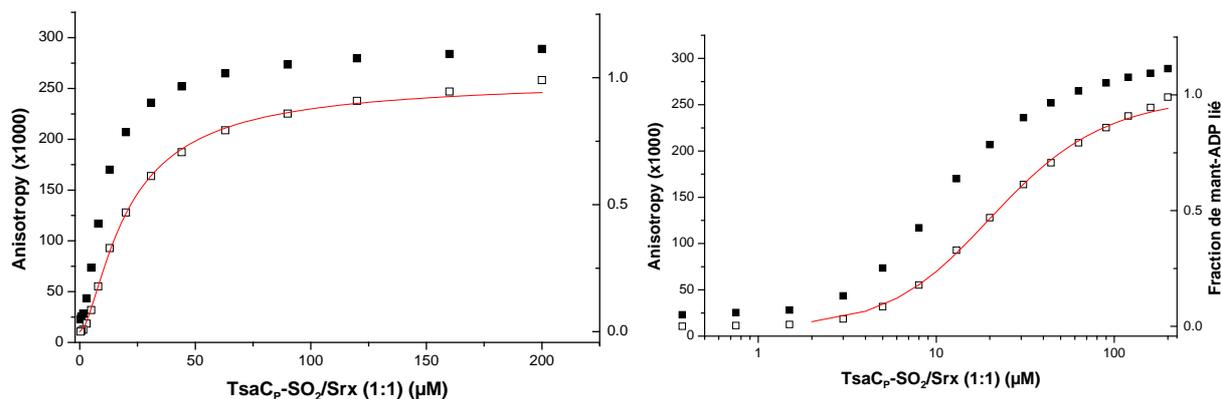


Figure 54 : Étude de la formation du complexe $Tsa1C_P-SO_2H/mant-ADP/ScSrx$ par anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence a été mesurée dans les conditions suivantes : la longueur d'onde d'excitation est fixée à 355 nm, et l'émission de fluorescence est collectée à 448 nm. Le mélange réactionnel est composé de 0.5 μM de mant-ADP, et de concentrations variables en ScSrx et $TsaC_P-SO_2H$, dont les concentrations varient conjointement avec un ratio fixe 1:1. Les mesures expérimentales sont représentées en noir (axe gauche), les données corrigées sont représentées blanc (axe droit) puis sont ajustées (tracé rouge) selon un modèle de préassemblage protéique entre ScSrx et $Tsa1C_P-SO_2H$. Ce modèle est présenté dans la figure Figure 55 page 95. Les deux figures représentent la même expérience, avec en abscisse un axe linéaire ou logarithmique.

En effet, la titration étant conduite en présence de 3 partenaires au moins, l'analyse doit prendre en compte plusieurs équilibres potentiels : ligand/ $TsaC_P-SO_2H$, ligand/ScSrx, $TsaC_P-SO_2H/ ScSrx$ et ligand/[$TsaC_P-SO_2H : ScSrx$]. Pour modéliser ce système complexe, nous avons utilisé à nouveau le logiciel Dynafit 4.0 (140) (cf. § 3 page 67). De plus, pour simplifier l'analyse, nous avons pris comme hypothèse que la contribution des équilibres ligand/ $TsaC_P-SO_2H$ et ligand/ScSrx était négligeable, compte-tenu des valeurs relativement élevées des constantes de dissociation déterminées ci-dessus. Le modèle utilisé est schématisé dans la figure suivante :

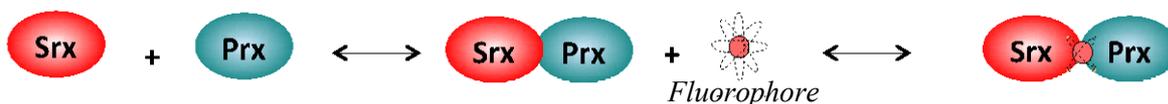


Figure 55 : Modèle d'assemblage du complexe de type Michaelien $Tsa1C_P-SO_2H/mant-ADP/ScSrx$

L'ajustement des données montre que ce modèle décrit fidèlement les points expérimentaux (Figure 54 page 95, tracé rouge) et suggère la formation d'un pré-complexe protéique ScSrx/ $Tsa1C_P-SO_2H$, qui se traduit par la phase « d'accélération », sur lequel vient se fixer le mant-ADP. Les constantes d'affinité déduites sont $K_d (ScSrx/Tsa1C_P-SO_2H) = 13 \pm 3 \mu M$

pour l'interaction $ScSrx/Tsa1C_P-SO_2H$ et $K_d (mant-ADP) = 9 \pm 1 \mu M$ pour la fixation du ligand au complexe protéique. Cette dernière valeur indique une affinité au moins 5 fois plus élevée du mant-ADP pour le complexe protéique $Srx/Tsa1C_P-SO_2H$ par rapport aux protéines seules, ce qui justifie notre hypothèse initiale de ne pas tenir compte des équilibres binaires. De plus, à titre de contrôle, nous avons vérifié l'effet compétiteur de l'ATP sur cette titration, qui confirme que le ligand fluorescent se fixe de façon spécifique dans le site actif du complexe formé par les deux protéines.

En utilisant la méthode mise au point, nous avons pu analyser la formation du complexe dans les conditions suivantes :

	$K_{ScSrx/Tsa1C_P-SO_2H} (\mu M)$	$K_{ligand} (\mu M)$
Tsa1C _P -SO ₂ H/ScSrx/mant-ADP	13 ± 3	9 ± 1
Tsa1C _P -SO ₂ H/ScSrx/mant-ADP/Mg ²⁺ (2 mM)	80 ± 10	4 ± 1
Tsa1 réduite/ScSrx/mant-ADP	54 ± 15	2,9 ± 0,5
Tsa1C _P -SO ₂ H/ScSrx/mant-ATP	20 ± 7	13 ± 2
Tsa1C _P -SO ₂ H/ScSrx/mant-AMP-PNP	7 ± 2	59 ± 3

Tableau 3 : Bilan des constantes de dissociation des interactions $Tsa1C_P-SO_2H/ScSrx$ et $[Tsa1C_P-SO_2H/ScSrx]$ /analogues co-substrat de l'ATP, déterminées dans les mêmes conditions décrites dans la Figure 54 page 95.

La présence de Mg^{2+} , et la substitution de $Tsa1C_P-SO_2H$ par la Tsa1 sous forme réduite, ont un effet légèrement favorable sur l'affinité du mant-ADP, mais déstabilisent significativement l'interaction $Tsa1C_P-SO_2H/ScSrx$. Le mant-ATP (Figure 56 (A) page 97) interagit avec le complexe $Tsa1C_P-SO_2H/ScSrx$ avec la même affinité que le mant-ADP contrairement au mant-AMP-PNP (Figure 56 (B) page 97) dont l'affinité pour le complexe est 5 à 6 fois plus faible.

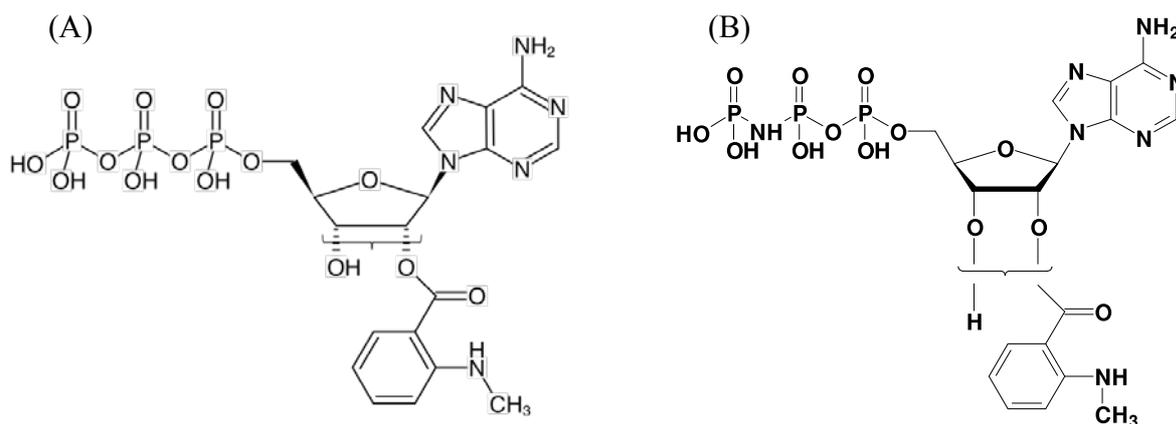


Figure 56 : Structure chimique du mant-ATP et mant-AMP-PNP
 (A) mant-ATP : 2'/3'-O-(N-Méthyl-anthraniloyl)-adenosine-5'-triphosphate
 (B) mant-AMP-PNP (2'/3'-O-(N-Méthyl-anthraniloyl)-adenosine-5'-[(β,γ)-imido] triphosphate.

3. Discussion et Perspectives

Les travaux décrits dans ce chapitre visaient à analyser l'enzymologie de la première étape du mécanisme de Srx, qui constitue l'étape cinétiquement limitante de la réaction, et par conséquent un point de régulation du système 2-Cys-Prx/Srx.

Du point de vue du mécanisme catalytique, nous avons établi que la vitesse de cette étape était contrôlée par le processus de transfert du γ -phosphate de l'ATP au groupement sulfinate de la 2-Cys-Prx typique suroxydée. Au niveau moléculaire, ce résultat signifie que les facteurs structuraux qui participent au positionnement relatif des éléments du site actif ou à la stabilisation de l'état de transition de cet événement chimique seraient à l'origine de la faible vitesse de cette étape. Or, les analogues d'état de transition testés, spécifiques des réactions de transfert de phosphate, n'ont révélé aucun effet inhibiteur significatif sur la réaction catalysée par Srx dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat surprenant. Dans une première hypothèse, l'état de transition passant par une géométrie plane du γ -phosphate pourrait être peu stabilisé, conséquence de l'architecture du site actif et d'un positionnement non optimal du phosphate γ de l'ATP par rapport à l'acide sulfinique. Dans ce cas, un effet inhibiteur pourrait se révéler en synergie avec l'ADP, ce que nous n'avons pas pu tester en raison d'un effet inhibiteur de l'ADP seul. Cette hypothèse pourrait contribuer à expliquer la faible constante catalytique de Srx. Une hypothèse plus spéculative serait que l'état de transition pourrait être plus proche de l'état final de la réaction, l'intermédiaire anhydride phosphoryle sulfinique, une espèce réactive et probablement de haute énergie, et pourrait correspondre à

une structure de géométrie non plane, qui ne serait pas ou peu susceptible à l'inhibition par AlF_3 . L'utilisation de méthodes de simulation et de dynamique moléculaire pourrait apporter un éclairage sur ces questions, bien que le complexe $\text{Prx/Srx/ATP/Mg}^{2+}$ représente un système difficile à modéliser.

En l'absence d'information directe concernant l'état de transition, ou l'intermédiaire anhydride phosphoryle sulfinique qui n'est pas isolable, nous avons initié l'étude des complexes de type Michaelien par une méthode utilisant l'anisotropie de fluorescence d'analogues de l'ATP. Cette approche a permis de révéler le mode d'assemblage de ce complexe, le cosubstrat ATP se liant sur le complexe Prx/Srx préformé. Elle permet d'apporter à la fois une information sur l'affinité du couple Prx/Srx et l'affinité du cosubstrat sur le complexe Prx/Srx . La comparaison des constantes de dissociation mesurées pour différents analogues avec le complexe $\text{Tsa1C}_P\text{-SO}_2\text{H/ScSrx}$ montre que, si le groupement γ -phosphate de l'ATP contribue peu à la force de l'interaction, la nature de la liaison pontant le β - et le γ -phosphate est importante. En effet, la substitution de l'oxygène de la liaison (β,γ)-phosphoanhydride par un groupement NH ((β,γ)-imido) (Figure 56 (B) page 97) affaiblit significativement l'interaction, ce qui suggère que l'atome d'oxygène correspondant dans l'ATP pourrait interagir avec un résidu du site actif comme l'His85. Dans ce cas, la présence d'un proton sur le groupement NH pourrait empêcher l'interaction avec l'His85 sous sa forme protonée (Figure 50 page 89).

La méthode d'anisotropie mise au point apporte également un éclairage sur l'interaction Prx/Srx qui précède la formation du complexe Michaelien. Les constantes d'affinité mesurées pour l'interaction de la $\text{Tsa1C}_P\text{-SO}_2\text{H}$ avec la ScSrx sont de l'ordre de $\sim 10 \mu\text{M}$, ce qui est cohérent avec les résultats publiés sur les protéines humaines (149) et avec les résultats obtenus par d'autres méthodes (thermophorèse, spectrométrie de masse en conditions natives). De façon intéressante, l'affinité de la Tsa1 réduite pour ScSrx est significativement plus faible que celle de l'enzyme suroxydée, ce qui suggère l'existence d'interactions polaires ou électrostatiques entre le groupement sulfinatate et certains résidus chargés positivement du site actif de ScSrx . Cette hypothèse est confirmée par l'effet défavorable de la présence de Mg^{2+} sur l'affinité de la $\text{Tsa1C}_P\text{-SO}_2\text{H}$ pour la ScSrx , le Mg^{2+} pouvant entrer en compétition avec ces interactions électrostatiques. Cette différence d'affinité pourrait permettre, *in vivo*, de favoriser l'interaction de Srx avec son substrat suroxydé, même en présence de fortes concentrations en Prx réduite, et d'éviter la séquestration de Srx sous forme de complexes inactifs. Une fois le complexe enzyme/substrat formé, les cosubstrats ATP et Mg^{2+} pourraient

se lier pour former un complexe catalytiquement compétent.

La contribution des résidus participant aux interfaces d'interaction entre les deux protéines pourra, grâce à cette approche, être étudiée au niveau de l'interaction Prx/Srx et de la liaison de l'ATP en présence ou non de magnésium. Ces résidus appartiennent à l'interface composant le site actif, notamment la Lys30, l'Arg89, et l'His85 de la *ScSrx*, et la Lys90 de la *Tsa1* (Figure 49 page 88), mais la contribution d'acides aminés de l'interface « arrière » pourra également être évaluée (Figure 32 page 47). Des résultats préliminaires ont confirmé l'importance de la nature de la chaîne latérale présente aux positions 85 et 86 de la *ScSrx*, en accord avec l'effet de la mutation de ces résidus sur l'activité enzymatique (131).

III. Étude du mécanisme de recyclage des Srx

1. Présentation de la stratégie expérimentale et principaux résultats

La compréhension des mécanismes de régulation du système 2-Cys-Prx/Srx implique la caractérisation du mécanisme de régénération de la Srx. En effet, le piégeage de Srx sous forme covalente thiolsulfinate au cours du cycle catalytique requiert une étape ultérieure permettant le recyclage de la Srx réduite et la libération de la Prx sous forme acide sulfénique (Figure 35 page 51). Cette étape fait intervenir un couplage avec un réducteur redox « externe ». Les études menées par notre équipe ont permis de montrer, *in vitro*, que le mécanisme de recyclage de l'activité de la ScSrx serait couplé avec le système Trx, avec formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre la Cys catalytique et une Cys de recyclage (Cys48), qui est réduit efficacement par la Trx par un mécanisme d'échange de ponts disulfure (128) (cf. Introduction § (3) page 49). Chez les mammifères et les plantes (1-Cys-Srx), l'absence de la Cys de recyclage implique un mécanisme de recyclage différent, puisque l'intermédiaire Srx oxydé sous forme pont disulfure ne peut plus se former (figure 1 A publication n°2). Le mécanisme de l'étape réductase étant identique pour les Srx de mammifères et de levure (145), ceci implique que l'intermédiaire thiolsulfinate doit être réduit directement par un réducteur externe. Aucune caractérisation de la nature du réducteur n'a été décrite sur des cellules mammifères *in vivo*. La levure, dont la génétique est bien maîtrisée, est ici utilisée en combinaison avec une approche enzymatique *in vitro* pour évaluer le rôle du GSH et de la Trx *in vivo*.

La réduction de l'intermédiaire thiolsulfinate étant très lente en présence de Trx, nous avons exploré l'hypothèse du rôle du GSH, un réducteur à thiol majeur au niveau cellulaire, dans le mécanisme de recyclage des 1-Cys-Srx. Nous avons donc choisi d'utiliser un mutant de ScSrx ne possédant pas de Cys de recyclage, le mutant ScSrx^{C84} (ScSrxC48A-C106V), comme modèle de 1-Cys-Srx. Compte tenu de la faible vitesse (0,2 min⁻¹) de réduction de l'intermédiaire thiolsulfinate par la Trx *in vitro* obtenue en utilisant ce modèle, il était raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'un autre réducteur comme le GSH pouvait être impliqué dans ce mécanisme.

Pour étudier *in vitro* le rôle du GSH dans le recyclage des 1-Cys-Srx, j'ai utilisé une approche fondée sur des études cinétiques à l'état pré-stationnaire et à l'état stationnaire en utilisant des systèmes enzymatiques couplés. Dans un premier temps, nous avons montré que contrairement au système de recyclage Trx, le GSH est capable de réduire de façon non-limitante la ScSrx C48S au cours de son cycle catalytique à l'état stationnaire, en présence de

Grx et de GR. Nous avons ensuite travaillé en conditions de cycle unique pour étudier la réduction directe de l'espèce thiolsulfinate par le GSH en combinant des méthodes de cinétique rapide, d'analyse sur gel SDS-PAGE et d'analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse. Ceci nous a permis de montrer (Figure 61 page 143)

1) que la molécule de GSH réduit l'intermédiaire thiolsulfinate avec une vitesse non-limitante par rapport à la vitesse de formation de cette espèce, qui reste l'étape limitante de la réaction globale;

2) que, de façon inattendue, la spécificité de cette réaction est assurée par un évènement de reconnaissance du GSH au sein du complexe thiolsulfinate;

3) que cette réaction conduit à la formation de *ScSrx* glutathionylée, avec une vitesse compatible avec la catalyse, qui est ensuite prise en charge par la Grx. L'espèce *ScSrx* glutathionylée joue donc le rôle d'intermédiaire catalytique.

Pour étudier *in vivo* l'implication du GSH dans le mécanisme de recyclage des 1-Cys-Srx, nous avons utilisé une souche de *S. cerevisiae* $\Delta srx1\Delta gsh1$ (*GSH1* correspond au gène de la γ -glutamyl cystéine synthétase qui contrôle la biosynthèse du GSH). L'effet de la déplétion en GSH a été comparé pour la souche $\Delta srx1\Delta gsh1$ transformée par un plasmide permettant l'expression de la *ScSrx* (*ScSrx_{WT}* ou *ScSrxC48S*) sous forme de fusion avec deux étiquettes HA, sous le contrôle du promoteur endogène du gène *SRX1* (110). Cette protéine de fusion est fonctionnelle puisque son expression dans des souches $\Delta srx1$ permet de rétablir le phénotype de résistance au peroxyde (110). Nos résultats montrent qu'après exposition à une forte concentration en H_2O_2 induisant la suroxydation des 2-Cys-Prx typiques cellulaires, la cinétique de réduction des complexes protéiques de *ScSrx* dans ces cellules confirme que la réduction de l'intermédiaire thiolsulfinate est assurée par le GSH dans ce modèle, et serait donc en faveur du rôle du GSH comme réducteur physiologique des 1-Cys-Srx.

Parallèlement, le rôle de la Trx comme réducteur de la *ScSrx* sauvage a été étudié *in vivo* en utilisant une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour l'expression des deux Trx cytoplasmiques $\Delta srx1\Delta trx1\Delta trx2$. Après un stress à H_2O_2 de cette souche transformée par le plasmide permettant l'expression de la *ScSrx_{WT}*, la déficience du système Trx est accompagnée par un défaut de réduction de l'espèce *ScSrx* oxydée sous forme pont disulfure. Ainsi, ces travaux confirment *in vivo* le rôle de réducteur physiologique de la Trx pour les 2-Cys-Srx.

2. Publication n° 2

L'ensemble de ce travail a abouti à la rédaction d'un article intitulé « *Evidence that glutathione efficiently recycles 1-Cys Sulfiredoxin in vivo* », qui est en cours de révision dans le journal *Antioxidants & Redox Signaling*.

Publication n° 2

**Evidence that glutathione efficiently recycles 1-Cys Sulfiredoxin
*in vivo***

Samia Boukhenouna, Hortense Mazon, Guy Branlant, Christophe Jacob, Michel B. Toledano
and Sophie Rahuel-Clermont

2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2014.5998

ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

Evidence That Glutathione and the Glutathione System Efficiently Recycle 1-Cys Sulfiredoxin *In Vivo*

Samia Boukhenouna,¹ Hortense Mazon,¹ Guy Branlant,¹ Christophe Jacob,¹ Michel B. Toledano,² and Sophie Rahuel-Clermont¹

Abstract

Aims: Typical 2-Cys-peroxiredoxins (2-Cys Prxs) are Cys peroxidases that undergo inactivation by hyperoxidation of the catalytic Cys, a modification reversed by ATP-dependent reduction by sulfiredoxin (Srx). Such an attribute is thought to provide regulation of 2-Cys Prxs functions. The initial steps of the Srx catalytic mechanism lead to a Prx/Srx thiolsulfinate intermediate that must be reduced to regenerate Srx. In *Saccharomyces cerevisiae* Srx, the thiolsulfinate is resolved by an extra Cys (Cys48) that is absent in mammalian, plant, and cyanobacteria Srxs (1-Cys Srxs). We have addressed the mechanism of reduction of 1-Cys Srxs using *S. cerevisiae* Srx mutants lacking Cys48 as a model. **Results:** We have tested the recycling of Srx by glutathione (GSH) by a combination of *in vitro* steady-state and single-turnover kinetic analyses, using enzymatic coupled assays, Prx fluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and reverse-phase chromatography coupled to mass spectrometry. We demonstrate that GSH reacts directly with the thiolsulfinate intermediate, by following saturation kinetics with an apparent dissociation constant of 34 μM , while producing S-glutathionylated Srx as a catalytic intermediate which is efficiently reduced by the glutaredoxin/glutathion reductase system. Total cellular depletion of GSH impacted the recycling of Srx, confirming *in vivo* that GSH is the physiologic reducer of 1-Cys Srx. **Innovation:** Our study suggests that GSH binds to the thiolsulfinate complex, thus allowing nonrate-limiting reduction. Such a structural recognition of GSH enables an efficient catalytic reduction, even at very low GSH cellular levels. **Conclusion:** This study provides both *in vitro* and *in vivo* evidence of the role of GSH as the primary reducer of 1-Cys Srxs. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Introduction

MECHANISMS OF H_2O_2 -dependent signaling generally rely on thiol chemistry and involve specific protein sensors such as peroxiredoxins (19). Typical 2-Cys-peroxiredoxins (Prxs) constitute an important class of thiol peroxidases that are structured as obligate head-to-tail dimers, with each monomer carrying two Cys residues that are named peroxidatic (C_P) and resolving (C_R) Cys. Their peroxidatic cycle involves a reaction of C_P with H_2O_2 , which leads to the formation of a reactive sulfenic C_P -SOH intermediate (6). The fast kinetics of this reaction, in the 10^5 – $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ range, explain the high H_2O_2 -reducing efficiency of these enzymes as peroxidases and their unique ability to detect very low levels of H_2O_2 (4, 7, 10, 26, 39). The nascent sulfenic acid then con-

Innovation

Typical 2-Cys peroxiredoxins (Prx) are thiol peroxidases regulated by a sulfenic redox switch reverted by the sulfiredoxin (Srx). Unlike yeast Srx, which is recycled by thioredoxin, a mutant of yeast Srx lacking the resolving cysteine residue operates *via* a distinct mechanism and is efficiently reduced by glutathione both *in vivo* and *in vitro*. This supports glutathione as the *in vivo* reducer of the 1-Cys Srx existing in mammals, plants, and cyanobacteria. Improved understanding of the crosstalk between Prx/Srx and the main cellular redox systems should contribute to elucidating the role of the Prx/Srx couple in antioxidant resistance, cell signaling, and aging.

¹UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine IMoPA, Vandœuvre-lès-Nancy Cédex, France.

²CEA. iBiTecS. LSOC. Gif-sur-Yvette Cedex. France.

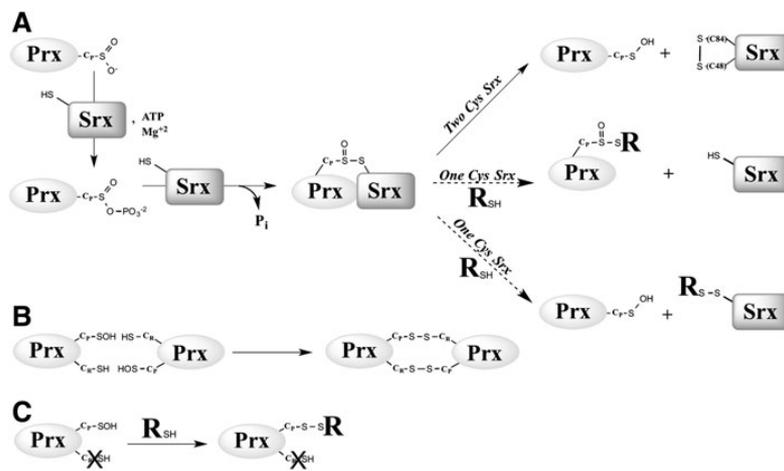
densates with the C_R of the symmetrical subunit to form an intermolecular disulfide, which is then reduced by thioredoxin (Trx), thus completing the cycle (41). Typical 2-Cys peroxiredoxins carry the unique ability to exit the catalytic cycle by H₂O₂-mediated hyperoxidation of Cys C_P-SOH to the sulfinic acid form (Prx-SO₂), thereby becoming inactive. Hence, the C_P-SOH sulfenic acid is poised to condense with C_R to a disulfide or to react with H₂O₂ to form a sulfinic acid (32, 40). Hyperoxidation is reversed by ATP-dependent reduction by sulfiredoxin (Srx) (1). The physiological significance of the inactivation of Prxs by hyperoxidation is not intuitive. The observation that this attribute and the presence of an Srx gene are both exclusive to eukaryotes, with some exception in cyanobacteria, has led to a suggestion that it might entail a regulation of Prx functions (2, 31, 40, 41). The so-called “floodgate model” was hence proposed, which posits that during H₂O₂ signaling, Prx must be inactivated for allowing the oxidant to reach its regulatory targets unhampered (40). This model is now supported by the feedback regulation of corticosterone biosynthesis in the mouse adrenal cortex by an H₂O₂ signaling pathway involving Prx3 and Srx (18). Hyperoxidation also stabilizes Prx into decameric and higher-order oligomeric forms that are capable of preventing aggregation of heat-denatured model substrates (12, 37). In yeast, the major cytosolic Prx Tsa1 accumulates in the hyperoxidized form during replicative aging, and elevating Srx activity counteracts this hyperoxidation and extends lifespan (23). Prx hyperoxidation has also been shown to undergo circadian oscillations, a phenomenon conserved across kingdoms (28, 29).

Srx catalyzes the ATP-dependent reduction of Prx-SO₂ to Prx-SOH by a unique enzymatic chemistry (Fig. 1A). Studies

both on the human enzyme from the Lowther’s group and on the *S. cerevisiae* enzyme from our group support a mechanism by which the sulfinic moiety of the Prx-SO₂ substrate is first activated by slow, rate-limiting formation of an anhydride bond with the γ-phosphate of ATP (35), leading to a phosphoryl sulfinic intermediate (oxidation state of Prx C_P + II) (15, 35). The sulfinyl sulfur (S=O) is then reduced by attack by the Srx catalytic Cys (Cys84 for *S. cerevisiae*), resulting in a thioisulfinate intermediate Prx-SO-S-Srx (oxidation state of Prx C_P + I) (16, 34). For the *S. cerevisiae* Srx, the cycle is completed by (i) the attack of the thioisulfinate by a second Srx Cys residue at position 48, leading to formation of an oxidized form of Srx with an intramolecular disulfide Cys48-Cys84 as catalytic intermediate, and (ii) the reduction of this intermediate by Trx (36) (Fig. 1A). This mechanism has been described *in vitro* but has not yet been verified *in vivo*.

The resolving Srx Cys48 is located in an extra sequence that is lacking in mammalian and plant Srxs (1), which indicates that the latter, or “1-Cys Srx” utilizes a mechanism for the reduction of the thioisulfinate that is different from the one proposed for the yeast enzyme, or 2-Cys Srx (Fig. 1A). Specifically, the nature of the thiol-reducing system and the chemical details of this mechanism are unknown. Initial experiments using *S. cerevisiae* Srx C48A mutant indicated that the rate of formation of the thioisulfinate intermediate is unaffected, but that recycling by Trx becomes slow and rate limiting for the overall reaction (36). A reasonable alternative reducer for 1-Cys Srx is glutathione (GSH), given its thiol-reduction property and its high cellular concentration (*i.e.*, 1–10 mM).

We have investigated the recycling mechanism of 1-Cys Srx, using *S. cerevisiae* Srx mutants lacking the resolving



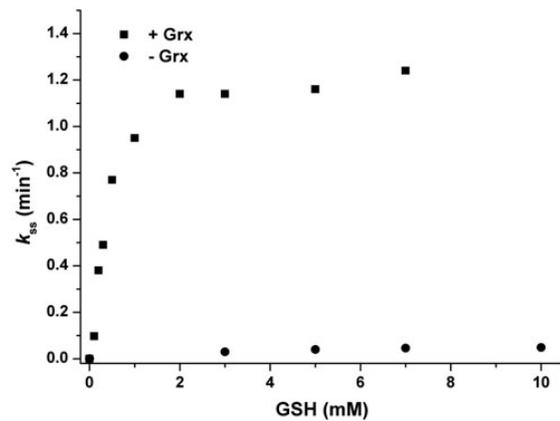
disulfide with the external thiol reducer added. R: thiol reducer.

Cys48 as a model. Since the kinetics of reduction will eventually determine whether GSH can act as 1-Cys Sr_x reducing system, we performed a kinetic analysis in the presence of a large range of GSH concentrations. These analyses were performed under steady-state and single-turnover conditions to get insight into the rate of the individual steps of the process. To establish the recycling mechanism, the products resulting from GSH attack were characterized by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), reverse-phase chromatography, and mass spectrometry. Finally, we have monitored the recycling of wild-type and C48S Sr_xs in *S. cerevisiae* strains lacking either the Trx or GSH pathways. Our study supports the conclusion that GSH is the reducing system for 1-Cys Sr_x, and confirms the role of Trx as the reducing system for 2-Cys Sr_x.

Results

GSH is not rate limiting when coupled with Grx for reduction of Sr_x^{C84} in steady-state conditions

S. cerevisiae Sr_x has a catalytic Cys (Cys84), a resolving Cys (Cys48) and Cys106 that has no known function. To investigate the reduction mechanism of 1-Cys Sr_xs, we used an Sr_x mutant retaining only Cys84 (Sr_x^{C84}) in which both Cys48 and Cys106 were substituted to Ala. Substitution of Cys106 was necessary to avoid the formation of unwanted side products *in vitro* (34). These two substitutions did not affect the rate of thiolsulfinate formation, which thus allowed the study of the subsequent steps of the Sr_x catalytic mechanism (36). The kinetics of the Sr_x^{C84} reaction were compared in the steady state under multiple enzymatic cycle conditions, using Trx/NTR (Trx, NADPH Trx reductase, and excess NADPH), GSH/GR (GSH, glutathione reductase, and excess NADPH), or GSH/Grx/GR (GSH, glutaredoxin, glutathione reductase, and excess NADPH)(Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars) as recycling systems. We previously reported that Trx can efficiently reduce the Sr_x Cys48–Cys84 disulfide *in vitro*, and that in the presence of the Trx/NTR system, reaction of wild-type Sr_x is only limited by the ATP-dependent activation of the Prx–SO₂ substrate at a rate constant of 1–2 min⁻¹ at pH 7 (36). In contrast, recycling of Sr_x^{C84} by the Trx/NTR system appeared to be rate limiting with a rate constant of 0.11 and 0.06 min⁻¹, for 50 and 100 μM Trx, respectively (not shown). In the presence of the GSH/Grx/GR system, however, the observed steady-state rate constant increased with the GSH concentration till a plateau value of 1.2–1.4 min⁻¹ for concentrations > 2 mM (Fig. 2), indicating that under these conditions, the recycling process of Sr_x^{C84} is not rate limiting with regard to the ATP-dependent step. In the presence of only GSH and GR, the kinetics of the reaction were much slower and linearly dependent on the GSH concentration, indicating that Grx is required for an efficient recycling of Sr_x^{C84} by the GSH/GR coupled system. These results were obtained with a Prx mutant lacking the resolving Cys171 (Fig. 2). Similar results were obtained with wild-type Prx (Supplementary Fig. S2), which indicates that Prx Cys171 is not involved in the Sr_x-recycling process. Furthermore, to validate the use of *S. cerevisiae* Sr_x^{C84} for the study of 1-Cys-Sr_x recycling, we performed an experiment similar to the one shown in Figure 2 using recombinant Sr_x and Prx1 from mouse. The data in-

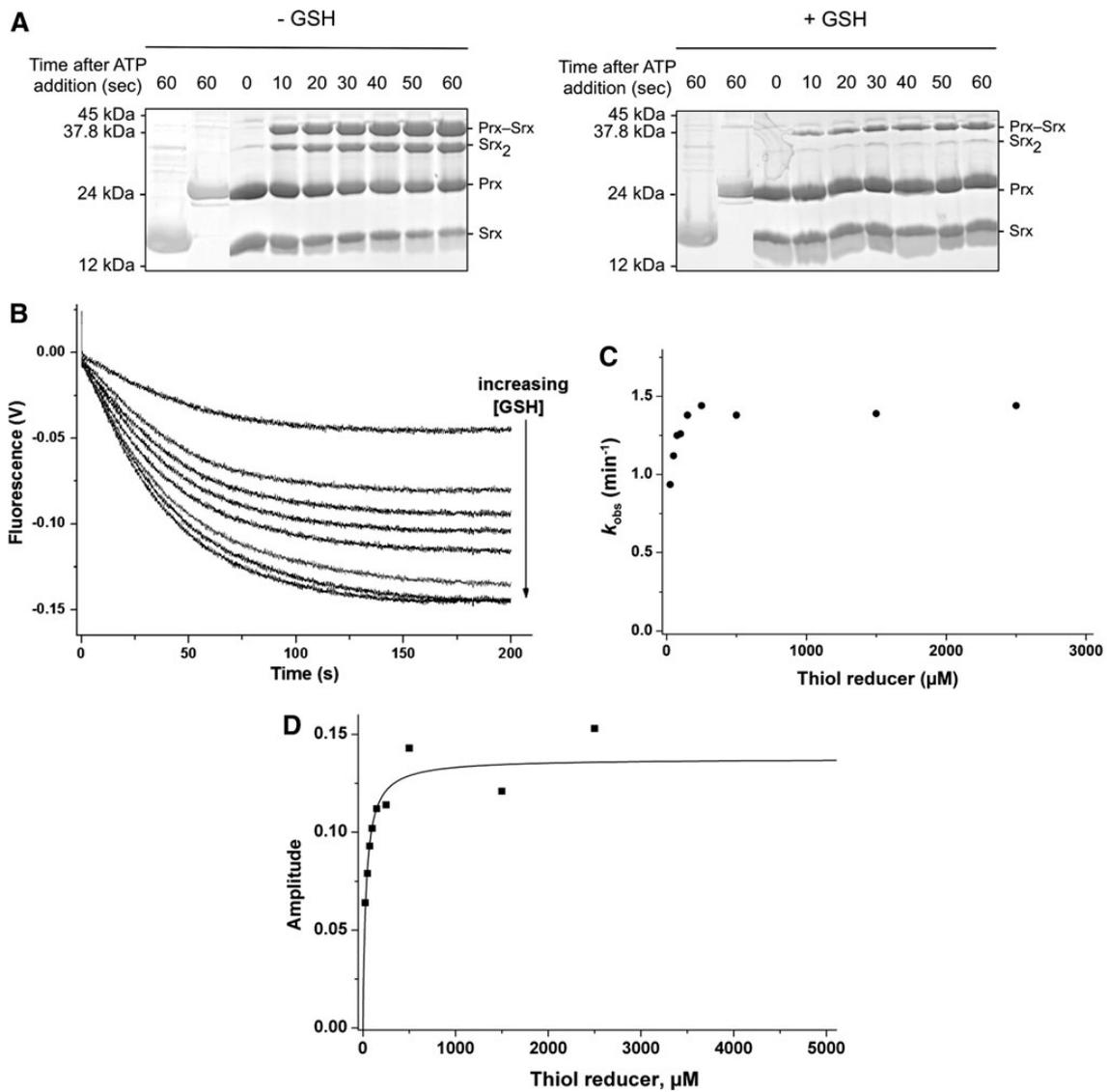


dicating that mouse Sr_x shows similar kinetics to *S. cerevisiae* Sr_x^{C84} (Supplementary Fig. S3 and Supplementary Materials and Methods): Under steady-state conditions, recycling of mouse Sr_x by the GSH/GR coupled assay is rate limiting (maximum rate constant of 0.1 min⁻¹), while in the presence of Grx, the observed rate constant increases with GSH concentration till 0.8 min⁻¹. This latter value is similar to the rate constant measured for the first step of the reaction (0.9 min⁻¹, data not shown), which corresponds to the formation of the thiolsulfinate species measured under single-turnover conditions. This shows that, as with *S. cerevisiae* Sr_x^{C84}, the recycling process by the GSH/Grx/GR coupled assay is not rate limiting.

GSH reduces the Prx–SO–S–Sr_x thiolsulfinate intermediate by saturation kinetics

We next explored the kinetics of the recycling of Sr_x^{C84} by GSH under single-turnover conditions, in the absence of the GSH/GR coupled system to limit the reaction till the step of thiolsulfinate reduction by GSH (Fig. 1A). We monitored by SDS-PAGE the formation of the reaction products after ATP addition. We previously showed by LC-MS that the thiolsulfinate species is the major species among Prx–Sr_x complexes that form by incubating equal concentrations of C171A Prx–SO₂ and Sr_x^{C84}, ATP and Mg²⁺ in the absence of added reducer, till 1 min (34) (Supplementary Fig. S6). In the absence of GSH (Fig. 3A, left panel), formation of two electrophoretic bands was observed in addition to monomeric Sr_x and Prx, which correspond to the thiolsulfinate intermediate and to a disulfide-linked Sr_x dimer that forms due to the reactivity of extra monomeric Sr_x^{C84} with the thiolsulfinate,

A ET AL.



although this reaction is slow, as similarly shown for the recycling reaction with Trx (see previous section). In the presence of 5 mM GSH, formation of the disulfide-linked SrxC₂ dimer was prevented, and the accumulation of the Prx-Srx species was significantly dampened, which supports the no-

tion that GSH reacts directly with the thiolsulfinate intermediate at a rate at least as fast as formation of the thiolsulfinate (Fig. 3A, right panel). As shown next (next section), this attack releases Prx-SOH and Prx-SSG that can react with SrxC₃₄ to give Prx-S-S-Srx, with both reactions

GSH EFFICIENTLY REDUCES 1-Cys SULFIREDOXIN

5

being favored by specific complex formation between Prx and Srx. This implies that in this experiment, the Prx-Srx band contains a fraction of disulfide species in addition to the thiol-sulfinate.

To obtain quantitative data on the kinetics of reduction by GSH, we studied the reaction kinetics of Srx^{C84} in the presence of increasing GSH concentrations. Here, we used wild-type Prx, which allowed monitoring reduction of the sulfinic acid through the decrease of Prx intrinsic tryptophan fluorescence caused by formation of the C_P-C_R disulfide bond (35). If, indeed, one assumes that the GSH attack on the Prx-SO-S-Srx is on the sulfinyl sulfur atom (the-S-of the Srx catalytic Cys) (17, 27), the reaction should release the Prx-SOH species, followed by the rapid condensation of the latter with the C_R residue into a disulfide-linked Prx homodimer (see next) (Fig. 1A, B). We first verified that the disulfide-linked Prx homodimer is not reduced by GSH on the time scale of the Srx-catalyzed reaction (data not shown). As shown in Figure 3B, decreasing fluorescence time courses were obtained in the presence of GSH, thus attesting the formation of the disulfide-linked Prx dimer. Since the phosphotransfer step is slow and determines the rate of all subsequent steps, this multistep mechanism could be modeled as a simple first-order process: Time courses were best described by first-order, single exponential kinetics characterized by (i) a rate constant k_{obs} that slightly increased with the concentration of GSH, reaching a plateau of 1.4 min⁻¹ for concentrations >150 μM (Fig. 3C), and unexpectedly (ii) signal amplitudes that followed a hyperbolic dependence on the GSH concentration, with a characteristic apparent K_{GSH} constant of 34 ± 7 μM (Fig. 3D). This result suggests that GSH binds to the thiol-sulfinate complex.

Kinetic competency of the glutathionylated Srx intermediate product

If as earlier assumed that GSH selectively reduces the thiol-sulfinate species by an attack on the Srx sulfinyl sulfur of the thiol-sulfinate bond (Fig. 1A), a glutathionylated Srx species should be released as a catalytic intermediate. We thus sought this intermediate among the products formed during the reduction of C171A Prx-SO₂ by Srx^{C84}, under single-turnover conditions, that is, in the presence of GSH and the absence of GR. Chromatographic analysis of the reaction mixture before initiation of the reaction identified Srx (peak b) and Prx-SO₂ (peak e) (Fig. 4A, B and Table 1). On ATP addition, three additional peaks appeared, one corresponding to the previously identified Prx/Srx complexes (peak c) (34), and the other two with masses compatible with glutathionylated Srx^{C84} (Srx-S-SG, peak a, Table 1) and glutathionylated Prx (Prx-S-SG, peak d, Table 1). The latter should form on a reaction between the released Prx-SOH and GSH (Fig. 1C), and its presence, thus, indicates that GSH, indeed, reacts on the Srx sulfinyl sulfur within the thiol-sulfinate intermediate (Fig. 1A). An oxidized form of glutathionylated Prx (Prx-S-SG + 16 Da) (estimated by mass spectrometry as amounting to less than 30% of peak d) was also present, which could have formed as a result of either the attack of GSH on the Prx sulfinyl sulfur (Fig. 1A) leading to Prx-SO-SG or the oxidation of the glutathionylated Prx species during the analysis. Addition of DTT reduced glutathionylated Srx^{C84} back to reduced Srx^{C84} (not shown),

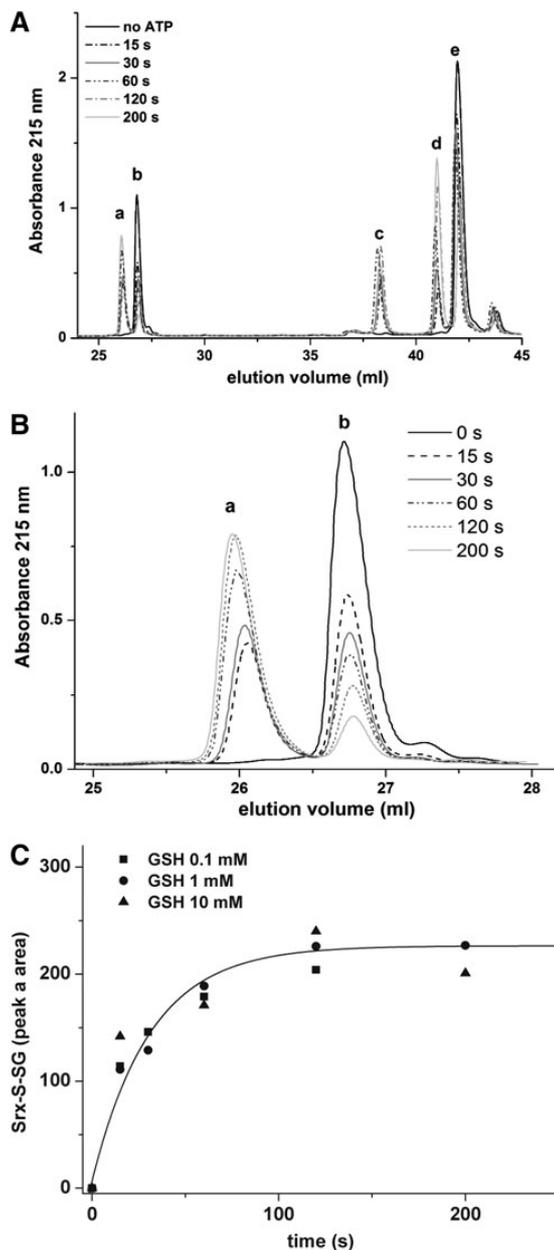


FIG. 4. Glutathionylated Srx^{C84} is a catalytic intermediate. The reaction was conducted as in Figure 3A and quenched before analysis by reverse-phase chromatography. (A) Chromatograms were obtained before and at 15 s, 30 s, 60 s, 120 s, and 200 s after ATP addition, in the presence of 1 mM GSH. Masses of the products eluted in each peak are in Table 1. (B) A zoom of the peaks a and b shown in (A). (C) Evolution of the area of peak a (S-glutathionylated Srx^{C84}) plotted as a function of time for GSH 0.1 mM (squares), 1 mM (circles), and 10 mM (triangles) and analyzed using a first-order mono-exponential kinetic model (solid line shown for GSH 1 mM).

6

BOUKHENOUNA ET AL.

TABLE 1. THEORETICAL AND OBSERVED MASS OF THE SPECIES OBSERVED IN REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF SRX^{C84}-CATALYZED REACTION IN THE PRESENCE OF GLUTATHIONE

Peak	Observed mass ^a , Da	Species ^b (theoretical mass, Da)
a	13963.7	Srx-S-SG (13964.0)
b	13658.5	Srx reduced (13658.7)
c	37261.5 (~50%)	Prx-SO-S-Srx (37262.5)
	37246.4 (~50%)	Prx-S-S-Srx (37246.5)
d	23895.3 (>70%)	Prx-S-SG (23895.1)
	23911.8 (<30%)	Prx-S-SG+O (23911.1)
e	23621.8	Prx-SO ₂ (23621.8)

^aThe estimated amount of each species found under peaks c and d is indicated in parentheses.

^bSpecies observed in the chromatographic analysis from Figure 4 using C171A Prx-SO₂ substrate and Srx^{C84}.

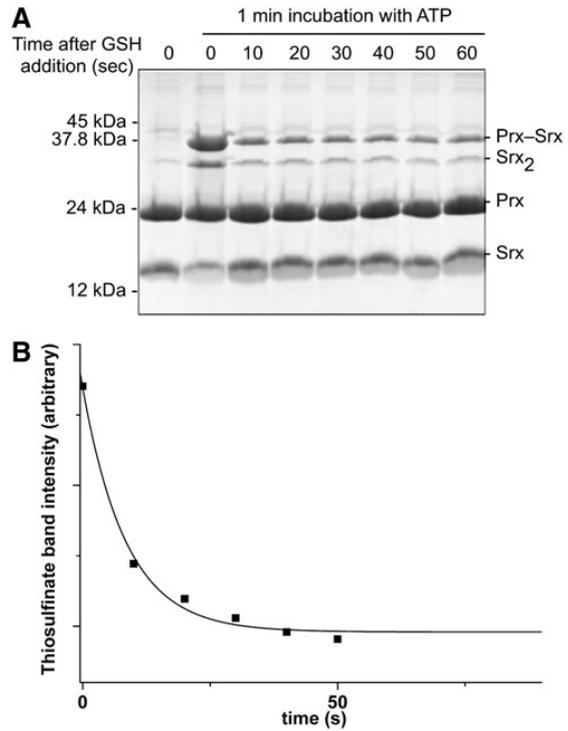
thus confirming that peak **a** corresponds to a mixed disulfide between Srx^{C84} Cys84 and GSH.

We next established the kinetics of evolution of peak **a** area (glutathionylated Srx) obtained in the presence of 1 mM GSH (Fig. 4A, B) and compared them with those obtained in the presence of 0.1 and 10 mM GSH (Fig. 4C). As in Figure 3B, this multistep mechanism could be modeled as a simple first-order process because the phosphotransfer step is very slow and determines the rate of all subsequent steps. The observed kinetics were very similar and could be described by a single exponential process characterized by comparable rate constants of $2.2 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ (0.1 mM GSH), $1.9 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ (1 mM GSH), and $3.6 \pm 1.0 \text{ min}^{-1}$ (10 mM GSH).

These data indicate that glutathionylated Srx^{C84} is produced at a rate compatible with the rate of thiosulfinate formation, as expected for a catalytic intermediate. A similar result was obtained using wild-type Prx-SO₂ as substrate (data not shown).

Determination of the rate constant for the attack of the thiosulfinate by GSH

Since the first step of the Srx catalytic mechanism is rate limiting for the overall reaction with a slow rate constant of $1\text{--}2 \text{ min}^{-1}$, the intrinsic rate of reaction of GSH on the thiosulfinate intermediate cannot be measured by following the overall reaction. To probe this step individually, we first accumulated the thiosulfinate intermediate by incubating C171A Prx-SO₂ and Srx^{C84} for 1 min in the presence of ATP, and then monitored the disappearance of this intermediate on addition of 5 mM GSH by SDS-PAGE (Figs. 5A and 3A). At this concentration, GSH is saturating for binding to the thiosulfinate complex, as shown in Figure 3D, thus allowing to observe the breakdown of the thiosulfinate/GSH complex, which can be modeled as a simple first-order process. Densitometric quantification of the thiosulfinate intermediate over time allowed modeling the kinetics of thiosulfinate reduction by GSH as a single exponential law, characterized by a rate constant of $7 \pm 1 \text{ min}^{-1}$ at 5 mM GSH (Fig. 5B). Secondary formation of Prx-S-S-Srx product explains why the band does not completely disappear on the SDS-PAGE. In similar experiments, we monitored glutathionylated Srx by reverse-phase chromatography, which confirmed that a lower



(solid line). r monoexponential model

limit for the intrinsic rate of GSH reduction of thiosulfinate was of the same order of magnitude for 200 μM and 1 mM GSH (data not shown).

In vivo recycling of 1-Cys and 2-Cys Srxs

We next sought to evaluate the role of GSH in Srx recycling *in vivo*. For this purpose, we inspected in yeast cells exposed to H₂O₂ the redox interaction between Srx and its Prx substrate Tsa1, taken as a token of *in vivo* Srx catalytic cycling (Fig. 6). We used a strain lacking both *SRX1* and *GSH1* ($\Delta srx\Delta gsh1$) and carrying a one-copy plasmid expressing either HA-tagged Srx (HA-Srx) or HA-C48S Srx. Deletion of *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthase, the rate-limiting step enzyme of the GSH biosynthesis pathway, allows to control cellular GSH levels by growth in the absence (GSH depletion) or presence of defined GSH amounts (20). Cells were first exposed to 100 μM H₂O₂ during 30 min to induce Srx expression, and then challenged with 500 μM H₂O₂ to cause full Prx sulfinylation (1). In the absence of GSH depletion (100 μM of GSH added to

GSH EFFICIENTLY REDUCES 1-Cys SULFIREDOXIN

7

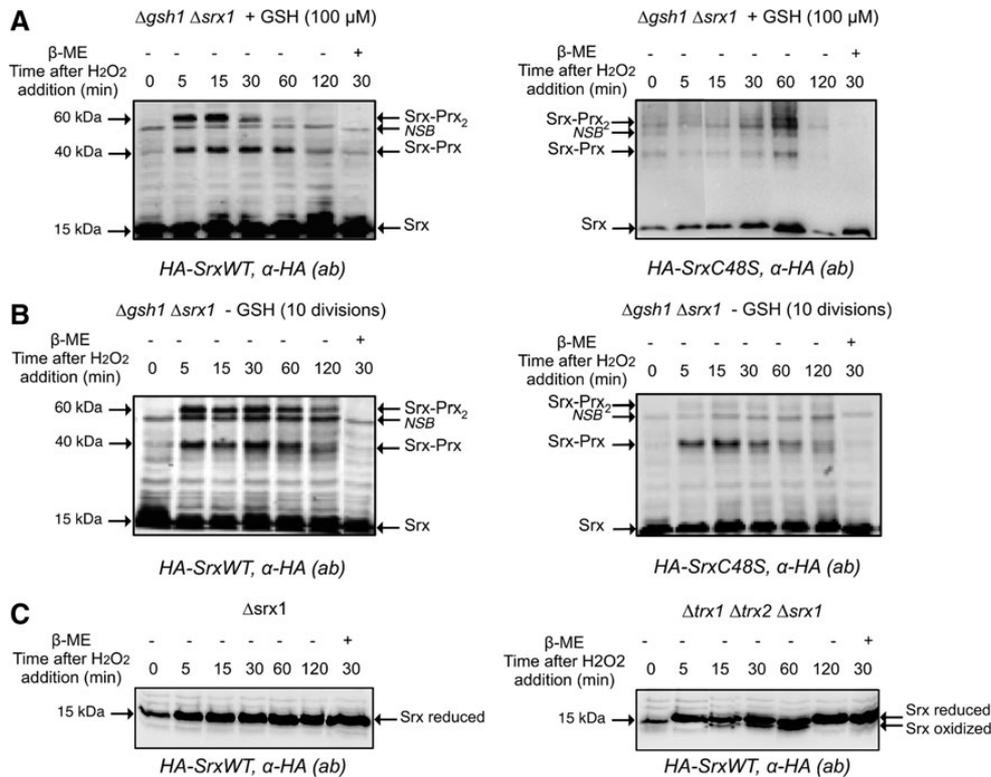
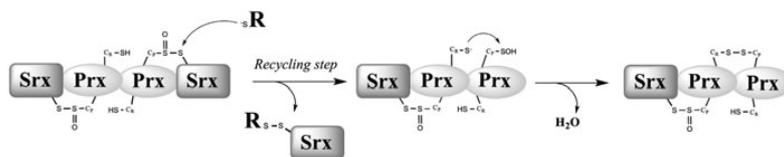


FIG. 6. *In vivo* analysis of the role of the Trx and GSH pathways in Srx redox status. (A) *Agsh1Δsrx1* strain expressing pRS316-HA2-Srx (left panel) or pRS316-HA2-SrxC48S (right panel), grown to an OD_{600nm} of 0.4 in selective minimal medium (SD URA⁻) supplemented with GSH (100 μ M), were treated for 30 min with 100 μ M H₂O₂ to induce *SRX1*. After 30 min, cells were treated with 500 μ M H₂O₂ to hyperoxidize Prx and lysed using the TCA-protocol after 5, 15, 30, 45, 60, and 120 min. Normalized total protein extracts were immunoblotted with the anti-HA monoclonal antibody after nonreducing 15% SDS-PAGE. The last lane is the same as after 30 min of treatment except that precipitated protein pellet was dissolved in the presence of 10% β -mercaptoethanol (β -ME). (B) *Agsh1Δsrx1* strains expressing pRS316-HA2-Srx (left panel) or pRS316-HA2-Srx C48S (right panel) grown in selective minimal medium (SD URA⁻) lacking GSH for 10 divisions were analyzed in the same conditions as in (A). NSB: indicates a protein reacting nonspecifically with the antibody. (C) *Δsrx1* (left panel) or *Δsrx1Δtrx1Δtrx2* strain (right panel) expressing pRS316-HA2-Srx were grown, and total proteins extracts were immunoblotted against the anti-HA monoclonal antibody in the same conditions as in (A).

cultures), three Srx-containing bands were observed with both wild-type and C48S Srx, one at 15 kDa, which represents monomeric Srx, and the other two at 40 and 60 kDa, which represent redox-linked Srx-Tsa1 complexes of different stoichiometry, as indicated by their β -mercaptoethanol (β -ME) sensitivity (Fig. 6A), and by their total absence in lysates of an HA-Srx-expressing *Δtsa1* strain (1). Based on the Srx catalytic mechanism, we propose that the 40-kDa band is the Prx-SO-S-Srx thioisulfinate intermediate, and the 60 kDa band is Srx attached by a thioisulfinate bond to a disulfide-linked Prx dimer. The latter complex is a reaction intermediate in which one of the C_P of a Prx dimer is still attached by a thioisulfinate to Srx, while the other has just been released on thioisulfinate reduction in the form of C_P-SOH, and condenses into a disulfide with the C_R of the other subunit of the Prx dimer (Fig. 7). It should be noted that compared with the 40 and 60 kDa bands formed by the wild-type enzyme, which both appeared at 5 min after H₂O₂ exposure and started to disappear after 60, and 30 min, re-

spectively, those formed with Srx C48S only started to disappear after 60 min, as a result of slower recycling. GSH depletion slowed down reduction of wild-type enzyme as the result of the global redox imbalance of the strain, but prevented formation of the C48S Srx 60kDa band, indicating that in this case the Srx-catalyzed reaction was aborted after formation of the 40 kDa thioisulfinate by defective reduction of the latter. To further demonstrate the role of GSH in 1-Cys-Srx recycling, the extracts expressing Srx C48S were blotted against anti-Prx-SO_{2/3} antibody under reducing conditions to monitor Prx-SO₂ reduction. The results (Supplementary Fig. S7) show that for Srx C48S under conditions of GSH depletion, the reduction of PrxSO₂ is significantly delayed, as it starts at 60 min after H₂O₂ treatment, while in the presence of GSH, reduction begins after 5 min and reaches near completion by 120 min.

We also evaluated the role of the Trx system in 2-Cys Srx recycling *in vivo* by a similar approach, using a *ΔsrxΔtrx1Δtrx2* strain. In this case, the Cys48 Srx residue



resolves the Prx-SO-S-Srx thiosulfinate with formation of an SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH intramolecular disulfide. In wild-type cells, monomeric SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH was present as a single band throughout the H₂O₂ time-course analysis (Fig. 6A, C). However, in $\Delta srx\Delta trx1\Delta trx2$ cells, an extra HA-immunoreactive band that migrated slightly faster than monomeric SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH was present, which corresponds to the Cys48-Cys84 intramolecular disulfide intermediate of SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH previously identified *in vitro* (36). This species appeared at 15 min after H₂O₂ exposure, increased in intensity till 1 h, and then disappeared (Fig. 6C, right panel). These *in vivo* data thus confirm the prominent role of TrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH in SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH recycling previously shown *in vitro*. They also indicate that in the absence of cytosolic TrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH, recycling still occurs, albeit inefficiently, by the probable engagement of GSH. The latter assumption is supported by *in vitro* data of the kinetics of the reduction of Cys48-Cys84 disulfide SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH by the GSH/GrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH coupled system, which, although much less efficient than the TrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH/NTR system, appeared not to be rate limiting relative to the SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH sulfinyl reductase kinetics (36).

Discussion

Catalytic mechanism of 1-Cys-Srx recycling *in vitro*

Reduction of the PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH sulfenic acid by SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH leads to the formation of a thiosulfinate as a reaction intermediate for both the *S. cerevisiae* and mammalian enzymes (16, 34). In the *S. cerevisiae* SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH, the thiosulfinate is resolved by a second Cys residue. However, in mammals, plants, and cyanobacteria, the resolving Cys residue is absent, which suggests that the thiosulfinate intermediate is reduced by an external thiol molecule. A comparison of the steady-state kinetics of SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH^{C84} with the TrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH or GSH systems (Supplementary Fig. S1) showed that only the latter is able to recycle SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH^{C84} at a rate that reaches a nonlimiting value with regard to the formation of the thiosulfinate intermediate. Furthermore, our data indicated that GSH efficiently reduces the thiosulfinate intermediate only when GrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH is present. Since neither TrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH nor GrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH (not shown) can efficiently recycle SrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH^{C84}, due likely to steric constraints on access to the PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84PrxCys48-Cys84SH thiosulfinate bond (Fig. 8), GSH must operate as the direct reducer of the

GSH EFFICIENTLY REDUCES 1-Cys SULFIREDOXIN

9

thiolsulfinate. Accordingly, the kinetics of the GSH-dependent reaction measured under single-turnover conditions showed that even at concentrations as low as $150 \mu\text{M}$, GSH reacts with the thiolsulfinate intermediate at a rate that is only limited by thiolsulfinate formation process (Fig. 3C). Therefore, as soon as it is formed, the thiolsulfinate is attacked by GSH and does not accumulate (Figs. 3 and 4).

Mass analysis of the reaction products formed on reduction of the thiolsulfinate by GSH revealed that the major species released is S-glutathionylated Srx^{C84} . In line with the selectivity of thiol attack on thiolsulfinate (17, 27), this result supports the notion that GSH preferentially reacts with the Prx-SO-S-Srx intermediate on the sulfenyl sulfur of Srx^{C84} , releasing S-glutathionylated Srx^{C84} and Prx-SOH as products (Fig. 1A). For wild-type Prx, a disulfide-linked dimer rapidly forms, as attested by the decrease in Prx fluorescence during the reaction (Fig. 1B). For C171A Prx, the reactive sulfenic species reacts with an additional GSH to form a Prx-S-SG intermediate, which is the predominant species observed in mass analysis of peak d (Figs. 1C and 4). Reactivity of this species with Srx^{C84} likely explains the formation of the Prx-S-S-Srx disulfide found under peak c (30), along with the thiolsulfinate intermediate. Importantly, kinetic monitoring of Srx-S-SG release by reverse-phase chromatography establishes the role of S-glutathionylated Srx as a catalytic intermediate.

The steady-state kinetics presented in Figure 2 show that in the absence of Grx, the recycling process is rate limiting for the overall Srx reaction. This strongly suggests that the reduction of SrxS-SG by a second GSH molecule is slow and largely rate limiting (Supplementary Fig. S1). Such results are consistent with previous studies performed on mammalian or plant Srx using GSH alone as reducer and explain the low Srx activity reported (11, 13). By contrast, the process is catalyzed by Grx, which will efficiently deglutathionylate SrxS-SG . In the presence of Grx, for GSH below 1 mM , after the glutathionyl exchange from Srx^{C84} to Grx, the rate-limiting process would likely be associated with reduction of glutathionylated Grx by a second GSH molecule, assuming that Grx follows a monothiol mechanism (9). For GSH concentration superior to 1 mM , the Srx^{C84} catalysis assumes the rate-limiting process, explaining why the steady-state rate reaches a plateau of 1.2 min^{-1} .

Determinants of the efficiency of Srx^{C84} recycling by GSH

The kinetics of the Srx^{C84} -catalyzed reaction monitored in single turnover using GSH as a reducer revealed unexpected features: While the rate constant of the reaction was only barely influenced by the GSH concentration and remained close to the value of thiolsulfinate formation (1.4 min^{-1}), the amplitude of the signal followed a saturation profile. This suggests that a process of binding of the GSH molecule on the thiolsulfinate complex occurs before reduction and controls the reaction for GSH concentrations below $\sim 250 \mu\text{M}$. At saturating GSH concentrations, since the Prx-SO₂ substrate was used in excess in this experiment, the amplitude of the reaction reached a limit corresponding to the Srx^{C84} concentration. With a deduced apparent binding constant of $34 \mu\text{M}$, this means that GSH saturation is reached for concentrations largely submillimolar and suggests that *in vivo*,

for 1-Cys Srx s, the rate of thiolsulfinate reduction will not depend on GSH, unless its concentration drops drastically down to micromolar concentrations. This is consistent with the observation that the intrinsic rate of GSH attack on the thiolsulfinate was not increased at 5 mM of GSH compared with $200 \mu\text{M}$.

The fact that GSH could bind to the thiolsulfinate complex raises the question as to whether the reaction is catalyzed within the active site, through GSH deprotonation, thiolate alignment relative to the thiolsulfinate bond, or stabilization of the transition state. The second-order rate constant for GSH attack on the thiolsulfinate intermediate (ratio of intrinsic rate of attack to the apparent binding constant) is $3.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for GSH at pH 7, which corresponds to $2.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for the GS^- thiolate (which is the reactive form of GSH), considering an apparent pK_a of 8.9 (21) for GSH thiol group. This latter value is similar to the one measured at $4.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for the reduction of a chemical thiolsulfinate model by Cys thiolate (27), suggesting that the thiol apparent pK_a of GSH is either not or only weakly altered within the active site. The efficiency of Prx-SO-S-Srx reduction by GSH would thus mainly rely on (i) the intrinsic reactivity of the thiolsulfinate bond with thiolate; (ii) the high GSH local concentration imparted by a specific recognition mode, allowing efficient reduction of the thiolsulfinate at physiological GSH concentrations; and potentially (iii) an optimized orientation of the thiolate relative to the thiolsulfinate bond.

From a structural standpoint, the thiolsulfinate complex likely participates in the recognition of GSH *via* both the flanking Prx and Srx moieties. To test this hypothesis, we looked for potential access paths for GSH within the crystal structure of the human disulfide-linked Prx1/ Srx complex (pdb access 2RII) (14), a good model for the 1-Cys Srx thiolsulfinate complex, using the program CAVER (33) (Fig. 8). The identified potential tunnels suggest that GSH binding probably occurs at the interface between Srx and one Prx monomer or dimer. This observation is reminiscent of the studies that have reported the existence of a deglutathionylation activity for Srx , and which suggested specific interactions between Srx and glutathionylated Prx, protein tyrosine phosphatase 1B, and actin (8, 30). In addition, the interaction between Srx and the protein S100A4, which plays a key role in regulating nonmuscle myosin IIA activity, is strongly enhanced when S100A4 is glutathionylated (3). Finally, the observed interaction between GSH and the *S. cerevisiae* Prx/ Srx complex (this work) suggests that this feature appeared early in evolution.

Srx catalytic cycle *in vivo*

In vitro kinetic data provided evidence for the existence of distinct recycling pathways for 2-Cys *vs.* 1-Cys Srx (36) and this work). We first confirmed *in vivo* the mechanism proposed for the *S. cerevisiae* 2-Cys Srx *in vitro*, which was suggested to proceed through an intramolecular disulfide Srx form that is efficiently reduced by Trx (Fig. 6C). We also compared the Srx redox species formed *in vivo* by 2-Cys (wild-type) and 1-Cys (C48S) Srx , which revealed the formation of two catalytic complexes (Fig. 6), both of which contain Srx and Prx moieties. We propose that the complex that migrates at 60 kDa corresponds to an Srx-Prx_2 complex and represents a hallmark for the reduction process of the

thiolsulfinate intermediate occurring within the dimeric Prx unit (Fig. 7). For 2-Cys Srx, this intramolecular process is fast and does not depend on an external reducer (36). For 1-Cys Srx, this complex was also present in wild-type cells, but was almost totally absent in cells totally depleted of GSH ($\Delta gsh1$ grown for 10 divisions without GSH supplementation) (Fig. 6), which indicates that (i) it is formed as a result of GSH reduction of 1-Cys Srx-Prx thiolsulfinate intermediate; (ii) Trx is not able to efficiently reduce this intermediate, in accordance with *in vitro* kinetic data. The presence of the 60 kDa band in cells that were not totally depleted of GSH [$\Delta gsh1$ grown for 7 divisions without GSH supplementation, total cellular concentration of about 100 μM GSH (20)] (not shown) further indicates that low amounts of GSH are sufficient for the recycling of 1-Cys Srx *in vivo*, which is also in full agreement with the kinetic studies. Our study thus highlights the pertinence to combine both *in vivo* and *in vitro* kinetic characterization of the processes involved in redox signaling pathways.

Conclusion

Here, we have addressed the question of which of the two thiol-redox control pathways assists Srx sulfinyl reductase activity. In *S. cerevisiae*, which carries a 2-Cys enzyme, this function is primarily devoted to Trx, which is consistent with a previous work (22, 36). We have also shown that GSH can compensate for the lack of Trx, albeit inefficiently. For other organisms possessing 1-Cys Srx, our study provides evidence that GSH acts as the reducer of the Prx/Srx thiolsulfinate intermediate *in vivo*. The catalytic efficiency of reduction of this intermediate is secured even in case of GSH depletion by a mechanism of binding of GSH to the Prx/Srx complex.

Materials and Methods

Materials

KCl, MgCl_2 , EDTA, ATP, trichloroacetic acid (TCA), and acetonitrile were purchased from Merck. Dithiothreitol (DTT) and Tris were from Euromedex. NADPH was obtained from Roche. Glutathione (GSH), N-ethylmaleimide (NEM), and glutathione reductase (GR) were from Sigma-Aldrich. Trifluoroacetic acid (TFA) and H_2O_2 were obtained from Acros Organics. SDS was obtained from AppliChem GmbH. Monoclonal anti-HA antibody and ammonium acetate were obtained from Sigma-Aldrich.

Preparation of recombinant proteins

Recombinant thioredoxin (Trx), NADPH Trx reductase (NTR) from *Escherichia coli*, wild-type and C171A Tsal (Prx) and wild-type and C48A-C106A Srxs (Srx^{C84}) from *S. cerevisiae* were prepared following the experimental procedures previously described (34). Recombinant glutaredoxin1 (Grx) from *E. coli* was obtained by cloning the *grx1* open reading frame amplified by PCR using the high-fidelity DNA polymerase *pfu* (Thermo Scientific), into the pET20b+ vector (Novagen), between the NdeI and SacI restriction sites (sequence of oligonucleotides not shown). Grx was produced in *E. coli* and purified following the same experimental procedures as previously described for Trx (24, 25). Preparation of hyperoxidized Prx-SO₂ was performed as previously described for both wild-type and C171A Prx (34).

Yeast strains and growth conditions

The *S. cerevisiae* strains used are derived from YPH98. The isogenic derivative $\Delta srx1$ of strain yAD1-1C (MATA, *ura3-52*, *lys2-801^{amber}*, *ade2-101^{ochre}*, *trp1- Δ 1*, *leu2- Δ 1*, and *his3- Δ 200*) was described (13). The $\Delta srx1\Delta trx1\Delta trx2$ strain was made by replacing the coding region of *SRX1*, *TRX1*, and *TRX2* ORFs by *HIS3*, *TRP1*, and *KAN*. Y252 $\Delta gsh1$ was described (38). The isogenic strain $\Delta gsh1\Delta srx1$ was obtained by replacing *SRX1* ORF by *KAN*. Cells carrying the pRS316-HA₂-Srx (wild-type or C48S) plasmid (1) were grown at 30°C in minimal medium SD (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose) complemented with adenine, amino acids, and GSH as appropriate. For experiments in GSH-depleted cells, $\Delta gsh1$ cultures were grown for ten divisions in SD medium lacking GSH.

SDS-PAGE analyses

Kinetic analysis of the species formed during the Srx-catalyzed reaction was followed by incubating C171A Prx-SO₂ and Srx^{C84} (30 μM each), 1 mM ATP, and 1 mM MgCl_2 in buffer TK (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7, close to physiological pH), in the presence of absence of 5 mM GSH as indicated. The reaction was stopped by TCA (20%); precipitated proteins were washed in acetone, air dried, and dissolved in 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, and 1% SDS containing 50 mM NEM at 30°C for 1 h. Proteins were loaded onto 15% nonreducing SDS-PAGE gel, followed by Coomassie Blue staining. Species quantification was done by densitometry (ImageJ).

Redox Western blots

For *in vivo* Srx redox-state analysis, we first added H_2O_2 (100 μM) to an early-log-phase culture ($\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.4$) to induce *SRX1*. After 30 min, cells were treated with 500 μM H_2O_2 to hyperoxidize Prx. We collected cells corresponding to 5 OD_{600} of culture at the indicated time. Lysates were prepared by the TCA lysis protocol (5). Precipitated proteins were solubilized in buffer containing Tris-HCl pH 8 (100 mM), SDS (1%), EDTA (1 mM), and NEM (50 mM) at 30°C for 1 h (cysteine-trapping method). Extracts were analyzed by nonreducing 15% SDS-PAGE. Srx was immunodetected with anti-HA monoclonal antibody.

Steady-state kinetics

The reduction of Prx-SO₂ by Srx^{C84} was measured in the steady state by using the following enzymatic coupled assays: Trx/NTR (variable Trx, 0.5 μM NTR, and 200 μM NADPH), GSH/GR (Variable GSH, 0.5 μM GR, and 200 μM NADPH), and GSH/Grx/GR (variable GSH, 50 μM Grx, 0.5 μM GR, and 200 μM NADPH) (Supplementary Fig. S1). The assay contained 50 μM of C171A Prx-SO₂ in excess to Srx^{C84} (10 μM), 1 mM MgCl_2 and was started by the addition of 1 mM ATP. Initial rate measurements were carried out at 30°C in buffer TK on a UV mc2 spectrophotometer (Safas) by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. We confirmed that the recycling system was not in itself rate limiting, as doubling of the GR concentration produced no change in the measured rate. A blank measurement recorded in the absence of Srx^{C84} was systematically deduced from the assay to account for the

GSH EFFICIENTLY REDUCES 1-Cys SULFIREDOXIN

11

nonspecific oxidation of NTR or GR. The observed steady-state rate constant k_{ss} was calculated as the ratio between the rate measured and Sr_x concentration (Supplementary Fig. S4). A stoichiometry of 2 mol of NADPH per mol of C171A Prx-SO₂ was used in rate calculations to account for the oxidation of 2 mol GSH in reduction of the glutathionylated Sr_x product and of the Prx sulfenic intermediate. When wild-type Prx-SO₂ was used in the Trx/NTR assay, a stoichiometry of 2 mol of NADPH per mol of Prx-SO₂ was used in rate calculations to account for the oxidation of 1 mol Trx in Sr_x^{C84} recycling, and of 1 mol Trx per mol Prx-SO₂ in Prx own catalytic cycle.

Stopped-flow kinetics

Recycling of Sr_x^{C84} by GSH was followed on a stopped-flow apparatus by monitoring the quenching of fluorescence intensity of wild-type Prx on going from the oxidized Prx-SO₂ to the disulfide form (Fig. 1) (35). The decrease of the emission fluorescence intensity was recorded at 30°C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus 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 oxidized Prx-SO₂ (40 μM), ATP (1 mM), MgCl₂ (1 mM), and GSH at variable concentrations as indicated, in buffer TK. The other syringe contained the Sr_x^{C84} (5 μM) in buffer TK (final concentrations after mixing). Equal volumes of each syringe were rapidly mixed to start the reaction. An average of at least three runs was recorded for each concentration of GSH. For each condition, the data were corrected from the corresponding blank time course recorded in the absence of reducer. Rate constants k_{obs} were obtained by fitting fluorescence traces against a single exponential model by nonlinear regression analysis. The amplitude of the monoexponential process was proportional to the Sr_x concentration, which is limiting relative to the substrate and cofactors (Supplementary Fig. S5).

Reversed-phase chromatography

To monitor the formation of products of the reaction in the presence of GSH, reaction mixtures containing 30 μM Sr_x^{C84}, 30 μM C171A Prx-SO₂, 1 mM ATP, and 1 mM MgCl₂ were incubated in the presence of 0.1, 1, and 10 mM GSH in TK buffer at 30°C. Aliquots were quenched by using TFA 0.1% (final concentration) and were loaded onto a Vydac 208TP52 (C8) column, 2.1 × 250 mm, 5 μm (PerkinElmer Life Sciences), equilibrated in H₂O plus 0.1% TFA, coupled to the ÄKTA explorer system (Amersham Biosciences). Proteins were eluted from the column using a linear gradient from 30% to 80% of B (0.1% TFA in acetonitrile), at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Fractions eluted were collected and stored at -20°C until mass spectrometry (MS) analysis. For the reduction of the glutathionylated Sr_x^{C84} product, the sample was lyophilized, redissolved in 50 mM AcNH₄ pH 6.8, in the presence of 10 mM DTT (30 min, RT). Before MS analysis, the sample was diluted twice in ACN/H₂O/formic acid (50/50/1).

Mass spectrometry

Electrospray ionization mass spectrometry measurements were performed on a MicrOTOF-Q instrument (Bruker Daltonics). Samples were directly injected with a syringe pump in

the mass spectrometer at a flow rate of 6 μl/min. The nebulization gas pressure was 0.4 bar, drying gas flow was 4 L/min, source temperature was 190°C, and the capillary and end plate voltage was set to 4500 V and 500 V, respectively. The acquisition range was 500–3000 m/z. For the measurements, an external calibration standard was used (Tuning Mix solution). Collected data were processed *via* Bruker Data Analysis software (version 4.0). Deconvoluted mass spectra were prepared using the Maximum Entropy Charge Deconvolution module.

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the University of Lorraine, the Fédération de Recherche “Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique,” local funds from the Région Lorraine and the Ligue contre le Cancer, and ANR and INCA grants to MBT. Mass spectrometry was performed at the “Service commun de spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques couplées” from the Université de Lorraine. The authors thank A. Kriznik and J. Charbonnel for their very efficient technical help.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Biteau B, Labarre J, and Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425: 980–984, 2003.
2. Boileau C, Eme L, Brochier-Armanet C, Janicki A, Zhang C-C, and Latifi A. A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in the reduction of the sulfenic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *New Phytol* 191: 1108–1118, 2011.
3. Bowers RR, Manevich Y, Townsend DM, and Tew KD. Sulfiredoxin redox-sensitive interaction with S100A4 and non-muscle myosin IIA regulates cancer cell motility. *Biochemistry* 51: 7740–7754, 2012.
4. D’Autreaux B and Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813–824, 2007.
5. Delaunay A, Isnard A-D, and Toledano MB. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* 19: 5157–5166, 2000.
6. Ellis HR and Poole LB. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36: 13349–13356, 1997.
7. Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, and Denicola A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol* 24: 434–450, 2011.
8. Findlay VJ, Townsend DM, Morris TE, Fraser JP, He L, and Tew KD. A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res* 66: 6800–6806, 2006.
9. Gallogly MM, Starke DW, and Mieyal JJ. Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signal* 11: 1059–1081, 2009.
10. Hall A, Parsonage D, Poole LB, and Karplus PA. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on

- transition-state stabilization. *J Mol Biol* 402: 194–209, 2010.
11. Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, and Lázaro J-J. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J Exp Bot* 61: 1509–1521, 2010.
 12. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, and Lee SY. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117: 625–635, 2004.
 13. Jeong W, Park SJ, Chang T-S, Lee D-Y, and Rhee SG. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J Biol Chem* 281: 14400–14407, 2006.
 14. Jönsson TJ, Johnson LC, and Lowther WT. Structure of the sulfiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature* 451: 98–101, 2008.
 15. Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, and Lowther WT. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Peroxiredoxin by Sulfiredoxin Proceeds Directly through a Sulfinic Phosphoryl Ester Intermediate. *J Biol Chem* 283: 23846–23851, 2008.
 16. Jönsson TJ, Tsang AW, Lowther WT, and Furdul CM. Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *J Biol Chem* 283: 22890–22894, 2008.
 17. Kice JL and Liu C-CA. Reactivity of nucleophiles toward and the site of nucleophilic attack on phenyl benzenethiolsulfinate. *J Org Chem* 44: 1918–1923, 1979.
 18. Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu M-C, Bae SH, and Rhee SG. Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H₂O₂-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. *Mol Cell* 46: 584–594, 2012.
 19. Klomsiri C, Karplus PA, and Poole LB. Cysteine-Based Redox Switches in Enzymes. *Antioxid Redox Signal* 14: 1065–1077, 2011.
 20. Kumar C, Igarria A, D'Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, Bachhawat AK, Delaunay-Moisan A, and Toledano MB. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* 30: 2044–2056, 2011.
 21. Marchal S and Branlant G. Evidence for the Chemical Activation of Essential Cys-302 upon Cofactor Binding to Nonphosphorylating Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38: 12950–12958, 1999.
 22. Moan NL, Clement G, Maout SL, Tacnet F, and Toledano MB. The *Saccharomyces cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols. Contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem* 281: 10420–10430, 2006.
 23. Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, and Nyström T. Life span extension and H₂O₂ resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 43: 823–833, 2011.
 24. Mössner E, Huber-Wunderlich M, and Glockshuber R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci Publ Protein Soc* 7: 1233–1244, 1998.
 25. Mulrooney SB. Application of a single-plasmid vector for mutagenesis and high-level expression of thioredoxin reductase and its use to examine flavin cofactor incorporation. *Protein Expr Purif* 9: 372–378, 1997.
 26. Nagy P, Karton A, Betz A, Peskin AV, Pace P, O'Reilly RJ, Hampton MB, Radom L, and Winterbourn CC. Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen Peroxide. A kinetic and computational study. *J Biol Chem* 286: 18048–18055, 2011.
 27. Nagy P, Lemma K, and Ashby MT. Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the reaction of cysteine thio-sulfinate ester with cysteine to give cysteine sulfenic acid. *J Org Chem* 72: 8838–8846, 2007.
 28. O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget FY, Reddy AB, and Millar AJ. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469: 554–558, 2011.
 29. O'Neill JS and Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469: 498–503, 2011.
 30. Park JW, Mieyal JJ, Rhee SG, and Chock PB. Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin. *J Biol Chem* 284: 23364–23374, 2009.
 31. Pascual MB, Mata-Cabana A, Florencio FJ, Lindahl M, and Cejudo FJ. Overoxidation of 2-Cys Peroxiredoxin in Prokaryotes. Cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress. *J Biol Chem* 285: 34485–34492, 2010.
 32. Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, Paton LN, Pace PE, Hampton MB, and Winterbourn CC. 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, 2013.
 33. Petrek M, Otyepka M, Banás P, Kosinová P, Koca J, and Damborský J. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* 7: 316, 2006.
 34. Roussel X, Béchade G, Kriznik A, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, and Rahuel-Clermont S. Evidence for the formation of a covalent thiosulfinate intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *J Biol Chem* 283: 22371–22382, 2008.
 35. Roussel X, Boukhenouna S, Rahuel-Clermont S, and Branlant G. The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins. *FEBS Lett* 585: 574–578, 2011.
 36. Roussel X, Kriznik A, Richard C, Rahuel-Clermont S, and Branlant G. 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, 2009.
 37. Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, Morea V, Sriratana P, Williams DL, Bellelli A, and Angelucci F. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Struct Lond Engl* 1993 20: 429–439, 2012.
 38. Spector D, Labarre J, and Toledano MB. A genetic investigation of the essential role of glutathione. Mutations in the Proline biosynthesis pathway are the only suppressor of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem* 276: 7011–7016, 2001.
 39. Tavender TJ, Springate JJ, and Bulleid NJ. Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 29: 4185–4197, 2010.
 40. Wood ZA, Poole LB, and Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650–653, 2003.

GSH EFFICIENTLY REDUCES 1-Cys SULFIREDOXIN

13

41. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, and Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28: 32–40, 2003.

Address correspondence to:
 Dr. Sophie Rahuel-Clermont
 UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine IMoPA
 Structural and Molecular Enzymology Team
 Biopôle, 9 avenue de la forêt de Haye, CS 50184
 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex 54505
 France

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

Date of first submission to ARS Central, May 25, 2014; date of final revised submission, October 24, 2014; date of acceptance, November 11, 2014.

Abbreviations Used

1-Cys Srx = Srx possessing only one Cys as catalytic residue and no resolving Cys
 C_P, C_R = Prx peroxidatic and resolving cysteines
 C_P-SOH = Prx peroxidatic cysteine oxidized as a sulfenic acid
 GR = glutathione reductase
 Grx = glutaredoxin

GSH, GSSG = reduced and oxidized glutathione
 HA-Srx = N-terminus tagged *S. cerevisiae* Srx
 k_{obs} = observed presteady-state rate constant
 k_{ss} = steady-state rate constant
 LC-MS = mass spectrometry coupled to liquid chromatography
 NTR = NADPH thioredoxin reductase
 Prx = typical 2-cysteine peroxiredoxin
 Prx-SO₂ = hyperoxidized Prx with Cys C_P oxidized as a sulfenic acid
 Prx-SOH = Prx oxidized with peroxidatic Cys C_P oxidized as a sulfenic acid
 Prx-SO-S-Srx = catalytic thiolsulfinate intermediate of the reduction of Prx-SO₂ by Srx
 Prx-S-SG = Prx glutathionylated on the peroxidatic cysteine C_P
 Prx-S-S-Srx = disulfide complex linking Prx and Srx catalytic cysteines
 SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
 Srx = Sulfiredoxin
 Srx^{C84} = *S. cerevisiae* C48A-C106A Srx
 Srx-S-SG = Srx glutathionylated on the catalytic cysteine
 Trx = thioredoxin
 Tsa1 = major cytosolic typical 2-cysteine peroxiredoxin in *S. cerevisiae*
 β-ME = β mercaptoethanol

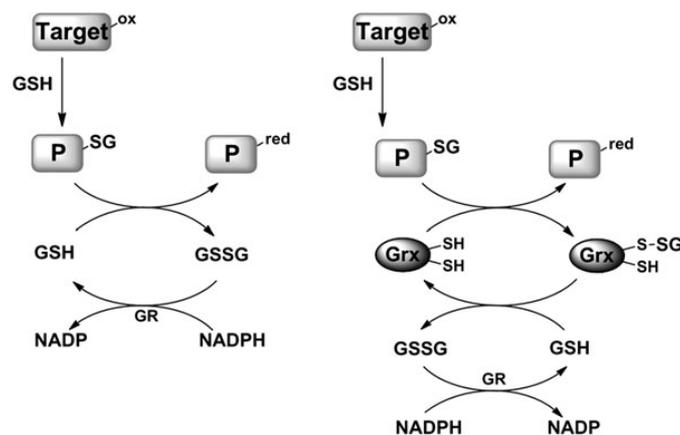
Supplementary Data

Supplementary Materials and Methods

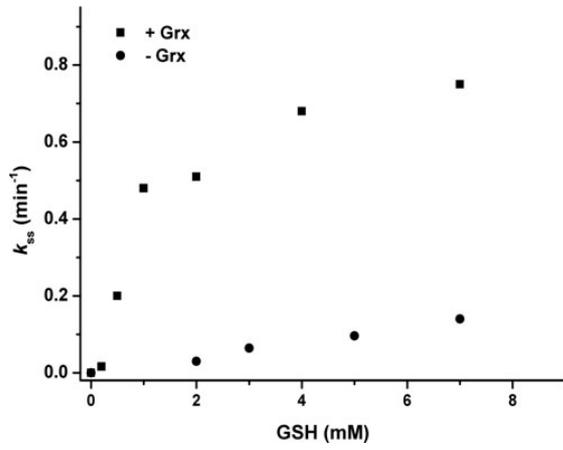
Production and purification of mouse *Srx* and *Prx1*

Recombinant *M. musculus* *Srx* was obtained by cloning a synthetic ORF coding mouse *Srx* optimized for expression in *Escherichia coli* (GeneArt; Life Technologies, Carlsbad, CA) into a modified pGEX-6P-1 plasmid (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ), enabling production of an N-terminal 6xHis/GST fusion protein. Recombinant His-tagged mouse *Prx1* was obtained by cloning a synthetic ORF coding mouse *Prx1* optimized for expression in *E. coli* (GeneArt; Life Technologies) into the pET28b(+) plasmid (source) between the *Nde*I and *Sac*I sites. The C41(DE3) [*F*⁻ *ompT* *hsdS*_B (*r*_B⁻ *m*_B⁻) *gal dcm* (DE3)] *E. coli* strain was used for production of mouse *Srx* and *Prx1*.

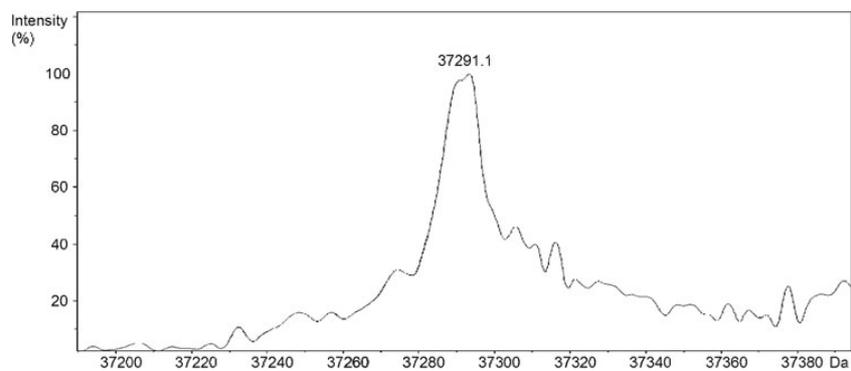
For protein purification, cells were harvested by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer (50 mM potassium phosphate buffer, 50 mM imidazole, 0.5 M KCl, pH7) and sonicated. The fusion His tagged proteins contained in the soluble fraction were purified on a Ni-Sepharose column that was connected to an AKTA FPLC system (GE Healthcare Bio-Sciences), and eluted by a 0.5 M imidazole step. For mouse *Srx*, the HT-GST tag was cleaved by the PreScission protease (GE Healthcare Bio-Sciences) overnight at 4°C, before final purification by gel filtration on a superdex 75 column. Both purified proteins were stored at -20°C, in the presence of 15% glycerol and 10 mM DTT. Molecular concentrations were determined spectrophotometrically, using theoretical extinction coefficients at 280 nm of 13,400 M⁻¹.cm⁻¹ for mouse *Srx* and 20,065 M⁻¹.cm⁻¹ for mouse *Prx1*.



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Schematic principle of the GSH/GR (left) and GSH/Grx/GR (right) coupled assays. The oxidized target is reduced by a molecule of GSH, which results in formation of a glutathionylated protein (P). The glutathionyl moiety is then transferred to a second GSH molecule either directly (left) or via Grx (right). The oxidized glutathione GSSG produced is reduced to GSH by GR coupled to NADPH oxidation. GR: glutathione reductase.



...rves were analyzed using a first-order kinetic model to deduce the amplitudes (*squares*) of the process.



ce (*dark gray*) of GSH.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le basculement entre les différentes fonctions redox des 2-Cys-Prx typiques est un mécanisme finement régulé auquel participent plusieurs cycles enzymatiques interdépendants. Les différents points de régulation étudiés au cours de ce travail permettent de préciser au niveau cinétique la contribution de plusieurs étapes clés dans ce mécanisme (Figure 57 page 122).

Au niveau du cycle catalytique des 2-Cys-Prx typiques (point (1)), la sensibilité à la suroxydation pourrait être contrôlée par une réorganisation conformationnelle déterminant la vitesse de formation de l'espèce $\text{PrxC}_P\text{-S-S-C}_R\text{Prx}$. Au niveau du cycle catalytique de Srx, la constante catalytique est déterminée par la première étape du cycle catalytique et est associée au processus chimique de transfert de phosphate (point (2), flèche grise). Enfin, contrairement à la ScSrx qui est recyclée par le système Trx, le mécanisme de recyclage des 1-Cys-Srx existant chez les plantes ou les mammifères implique le GSH comme réducteur cellulaire, dont la spécificité est assurée par un événement de reconnaissance au sein du complexe Prx/Srx (point (3)).

Ce dernier point soulève la question de l'intégration du système 2-Cys-Prx/Srx dans les voies cellulaires redox. En ce qui concerne le mécanisme de recyclage de ScSrx , les études cinétiques (128) et *in vivo* (ce travail) ont démontré le rôle de la Trx, un résultat cohérent avec le rôle primordial du système Trx dans le métabolisme de H_2O_2 chez *S. cerevisiae* (150). Ce mécanisme assure une étape de régénération de ScSrx très efficace et contribue à la résistance de cet organisme unicellulaire aux stress environnementaux. Cependant, en cas de stress oxydant sévère conduisant à l'oxydation de la majorité de la Trx cellulaire, nous avons montré également *in vivo* que le GSH pouvait compenser l'absence de Trx et réduire la forme oxydée de la ScSrx . Cette observation est en accord avec le fait que, *in vitro*, le système GSH/Grx est capable de réduire la ScSrx oxydée, avec cependant une constante catalytique 20 fois inférieure à celle du système Trx. Chez les organismes possédant une 1-Cys-Srx, l'efficacité de la régénération de la Srx par le GSH est assurée par la réactivité chimique intrinsèque de la liaison thioisulfinate vis-à-vis des thiols, et par la reconnaissance du glutathion dans le site actif de l'espèce $\text{PrxC}_P\text{-SO-S-C}_R\text{Srx}$.

D'autres éléments de régulation sont également susceptibles de moduler les flux des différentes espèces redox dans ce système : les concentrations de chaque partenaire, Prx et Srx, du peroxyde d'hydrogène, des systèmes réducteurs Trx et GSH. Ces concentrations doivent être définies dans l'espace, en termes de concentrations locales dans la cellule, ou dans un compartiment cellulaire, et dans le temps, l'expression de Srx étant inductible, par

exemple. D'autres facteurs protéiques pourraient également interagir avec Prx ou Srx et moduler leurs propriétés enzymatiques. Ces différents éléments pourraient être pris en compte dans un modèle cinétique global, qui permettrait de simuler et comprendre leur impact sur l'évolution de l'état redox des 2-Cys-Prx typiques, donc de leurs propriétés. Ce type d'approche nécessite de connaître les constantes cinétiques réelles des différentes étapes enzymatiques, et en particulier les étapes de régulation, ce qui a fait l'objet de ce travail.

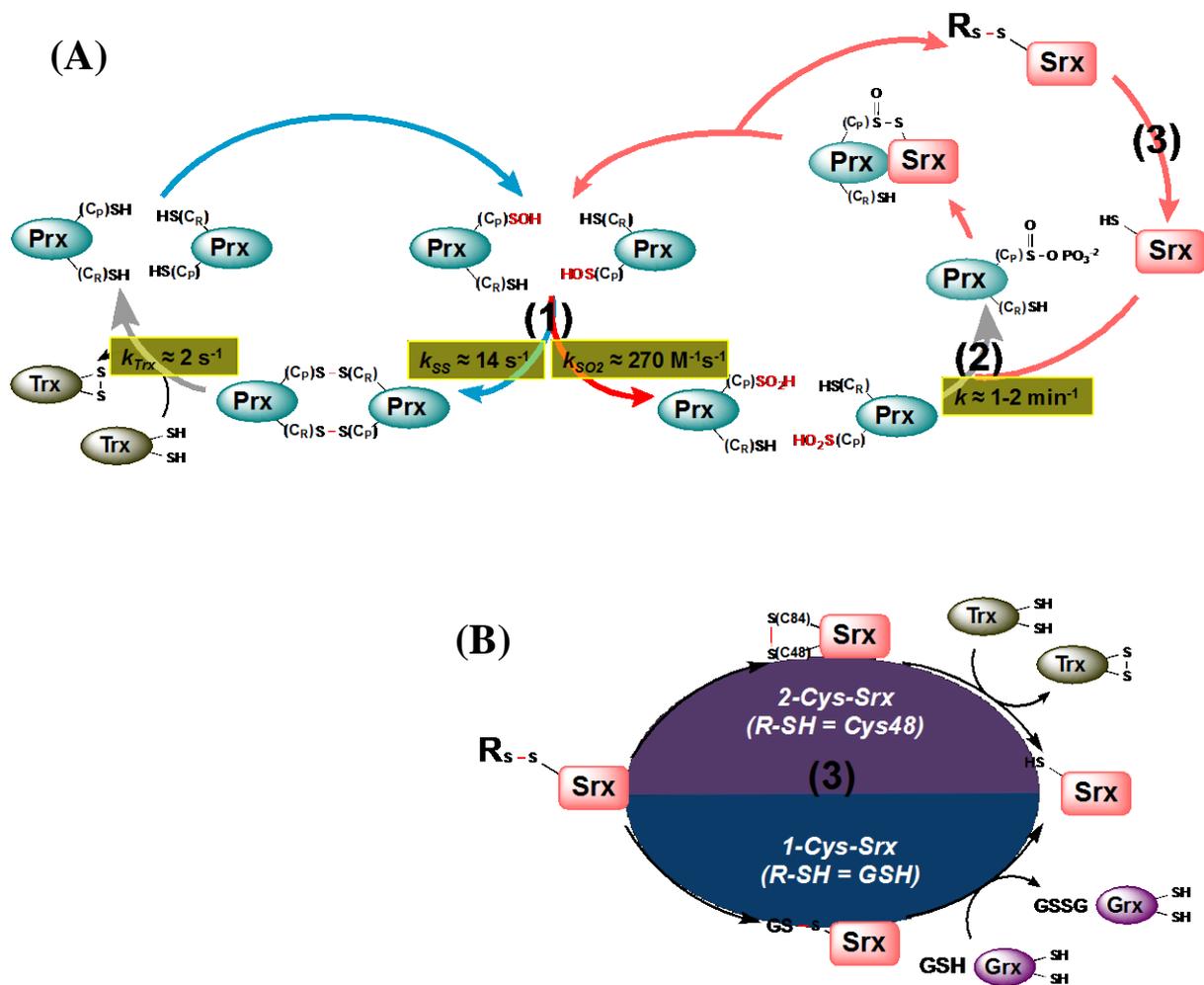


Figure 57 : Bilan des cycles enzymatiques interdépendants du système 2-Cys-Prx et Srx et les points de régulation étudiés.

(A) Les flèches grises représentent les étapes cinétiquement limitantes dans les cycles catalytiques de 2-Cys-Prx et Srx. Dans un souci de clarté, seul un monomère de 2-Cys-Prx est représenté dans le mécanisme catalysé par la Srx. (B) schéma du mécanisme de recyclage des 1-Cys-Srx vs 2-Cys-Srx

Enfin, l'état oligomérique des 2-Cys-Prx typiques, qui est modulée en fonction de leur état redox, apporte un élément de complexité supplémentaire à ce réseau de régulations. Au cours du cycle catalytique, une 2-Cys-Prx typique existe sous forme de décamère, son oxydation sous forme $\text{PrxC}_P\text{-S-S-C}_R\text{Prx}$ conduit à la stabilisation d'une forme dimérique. Par contre la suroxydation de la Cys C_P stabilise la forme décamérique, voire des formes d'empilement du décamère (HMW) auxquelles a été associée la fonction chaperon (cf. Introduction § d) page 39). La dynamique d'association/dissociation entre ces différents états pourrait par elle-même constituer des étapes et points de régulation supplémentaires dans le système décrit Figure 57 page 122. D'autre part, ceci implique que la Srx interagit avec une structure décamérique ou avec un empilement de décamères. La méthode d'anisotropie de fluorescence ne permet pas d'avoir accès à des informations sur l'interaction de plusieurs molécules de Srx par décamère. Par contre, par spectrométrie de masse en conditions natives en collaboration avec le Dr. S. Cianferani (Strasbourg) et le Dr. H. Mazon (notre équipe), nous avons montré que dix molécules de Srx peuvent interagir avec le décamère de Prx. Au niveau d'une structure HMW, la Srx ne pourra probablement interagir que sur les faces « externes » de l'empilement, n'ayant alors accès qu'à cinq sous-unités de Prx suroxydée (Figure 26 page 41). Cependant, la réduction du groupement sulfinate sur une sous-unité de la Prx sera suivie de changements conformationnels dans le site actif de l'enzyme et au niveau de son extrémité C-terminale, conduisant à une déstabilisation de l'interface décamère/décamère et dimère/dimère (115). Ainsi, la réduction de tout ou partie des sous-unités accessibles pourrait induire la déstabilisation et la dissociation de l'empilement de décamères, permettant ainsi l'accès des autres sous-unités à la réduction par Srx. Dans ces processus, la dynamique conformationnelle de l'extrémité C-terminale des 2-Cys-Prx joue un rôle central, étant impliquée dans l'activité peroxydase, la sensibilité à la suroxydation, l'interaction avec Srx, mais également potentiellement avec les substrats protéiques pour lesquels elle joue le rôle de chaperon (115).

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Matériel

1. Les souches bactériennes d'*E. 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)	Souche dérivée de la souche BL21 (DE3) : F ⁻ <i>dcm ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) <i>gal</i> λ (DE3) et deux mutations non caractérisées (Miroux et Walker, 1996). Cette souche est utilisée pour la surexpression des protéines recombinantes (<i>Tsa1</i> , <i>Srx</i> , <i>Trx1</i> , <i>Grx1</i>). 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 *S. cerevisiae*

Nom de la souche	Utilisation
yAD1-1C	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1</i> - Δ 1, <i>leu2</i> - Δ 1, <i>his3</i> - Δ 200
Δ <i>srx1</i>	yAD1-1C, <i>srx1</i> :: <i>KanMX</i>
Δ <i>gsh1</i> Δ <i>srx1</i>	yAD1-1C, <i>srx1</i> :: <i>KanMX</i> , <i>gsh1</i> :: <i>LEU2</i> .
Δ <i>srx1</i> Δ <i>trx1</i> Δ <i>trx1</i>	yAD1-1C, <i>srx1</i> :: <i>HIS3</i> , <i>trx1</i> :: <i>TRP1</i> et <i>trx2</i> :: <i>KanMX</i>

3. Plasmides pour transformation des bactéries

Nom du plasmide	Utilisation
pET20b-Srx Σ	Plasmide portant la séquence nucléotidique synthétique codant la ScSrx, optimisée pour l'expression dans <i>E. coli</i> , sous le contrôle du promoteur T7. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline.
pET20b-SrxC48S-C106V	pET20b-Srx Σ portant les mutations C48S et C106V.
pET28b-HT-Tsa1	Plasmide portant la séquence nucléotidique de la Tsa1 sauvage sous forme de fusion N-ter avec une séquence codant une étiquette 6xHis, sous contrôle du promoteur T7. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.
pET28b-HT-Tsa1C171A	pET28b-HT-Tsa1 portant la mutation C171A.
pET20b-Tsa1	pET20b portant la séquence nucléotidique de la Tsa1 sauvage.
pET20b-Tsa1C171A	pET20b-Tsa1 portant la mutation C171A.
pET20b-Trx1	pET20b portant la séquence nucléotidique de la Trx1 de <i>E. Coli</i>
pET20b-Grx1	pET20b portant la séquence nucléotidique de la Grx1 de <i>E. Coli</i>

4. Plasmides pour transformation des levures

Nom du plasmide	Utilisation
pRS316– <i>SRX1</i> -HA ₂	Plasmide portant la séquence nucléotidique codant ScSrx sous le contrôle du promoteur endogène de <i>SRX1</i> (inductible par H ₂ O ₂), sous forme de fusion en C-ter avec une séquence codant deux étiquettes HA (séquence YPYDVPDYA). Le plasmide pRS316 porte le gène <i>URA3</i> permettant de compléter l'auxotrophie de la souche pour l'uracile.
pRS316– <i>SRX1</i> -C48S-HA ₂	pRS316– <i>SRX1</i> -HA ₂ portant la mutation C48S
pUG6	Ce vecteur contient le gène de <i>KanMX</i> Tn903 qui confère une résistance à l'antibiotique G418 sulfate (ou généticine®). Ce plasmide a été utilisé comme matrice pour la PCR pour créer la cassette de délétion du gène <i>SRX1</i> .

5. Les anticorps

Les anticorps suivants ont été employés pour les analyses par Western-blot :

- **anti-HA** : anticorps monoclonal produit chez la souris (Sigma). Utilisé à une dilution de 1/10000^{ème}.

6. Cultures des bactéries

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 des différentes protéines recombinantes et la production de Tsa1, Trx1 et Grx1.

- **Milieu GRAFFINITY** : Milieu LB, glucose (0,5 %), Hepes (20 mM), lactose (0,6 %). Ce milieu est utilisé pour la production de ScSRX (ScSRX_{WT} et ScSRXC48A-C106V ou SrxC⁸⁴).

7. Cultures de levures

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

- **YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) liquide** : Extrait de levure (10g/l) ; bactopectone (20 g/l) ; glucose (20 g/l). Ce milieu est utilisé pour préparer les cellules aux différentes transformations.
- **YDP solide** : YPD liquide avec ajout d'agar (20 g/l) dans le milieu avant stérilisation. Ce milieu est utilisé pour préparer les cellules aux différentes transformations.
- **SD URA⁻ liquide** : SD (Yeast Minimal Media ou Synthetic Defined) 0.67 % (p/v) de « yeast nitrogen base », 2 % de glucose, ce milieu (SD) étant sans uracile (40 mg/l d'adénine, 60 mg/l leucine, 40 mg/l tryptophane, 20 mg/l méthionine, 30 mg/l lysine et 20 mg/l histidine). Ce milieu permet la sélection des cellules possédant le plasmide pRS316-SRX1-HA₂ (ou pRS316-SRX1-C48S-HA₂).
- **SD URA⁻ solide** : SD URA⁻ liquide avec ajout d'agar (20 g/l) dans le milieu avant stérilisation. Ce milieu permet la sélection des cellules possédant le plasmide pRS316-SRX1-HA₂ (ou pRS316-SRX1-C48S-HA₂) après transformation.

- **SD URA⁻ solide + GSH** : Lorsque le milieu SD URA⁻ fondu est à une température de 60 °C, le GSH (100 µM) est ajouté. Ce milieu est utilisé lors de la transformation des cellules *Δgsh1Δsrx1*.

8. Les tampons et solutions d'usage courant

Tampon	Composition
Tampon Start	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.
Tampon TE	Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8.2.
Tampon TE, KCL	Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8.2, KCL 1 M.
Tampon TK	Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, pH 7.
Tampon MES	MES 100 mM, pH 6,1.
Tampon MES, SA	MES 100 mM, pH 6,1, Sulfate d'ammonium 1 M.
Tampon MES, KCl	MES 100 mM, pH 6,1, KCl 1 M.
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 %.
Solution de coloration au bleu colloïdal	Bleu de Coomassie G 250 0,1 % ; sulfate d'ammonium 10 % ; acide orthophosphorique 1,6% ; éthanol 20 %.
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 de transfert	3,02 g/L Tris, 14,5 g/L Glycine, 200 mL d'éthanol, 10 mL SDS

	(10 %).
--	---------

II. Méthodes

1. Mutagenèse dirigée par PCR

Au cours de ma thèse, l'approche de 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 mutée. 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* DH5a 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 page 127.

a) Production et purification des *Tsa1* recombinantes portant une étiquette His

La *Tsa1* portant une étiquette His (*Tsa1*_{WT} ou *Tsa1*C171A) est produite dans la souche C41(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET28b-HT-*Tsa1* (WT ou C171A), dans du milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/l). Les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0.1 DO_{600nm} puis incubées à 37 °C sous agitation. L'expression de cette protéine est induite par ajout d'IPTG (1 mM) à une DO_{600nm} cellulaire d'environ 0.6 au bout de 3 à 4 heures. Ces cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

(1) Culture et extraction

Après suspension du culot de cellules dans le tampon Start en présence de Benzonase (20 U/mL) et de MgSO₄ (2 mM), le mélange est passé dans un désintégrateur de cellules sous une pression de 1350 bar (Constant Cell Disruption Systems), à 4 °C, puis centrifugé à 20000 g à 4 °C pendant 40 min. Le surnageant (extrait cellulaire soluble) correspond à l'extrait brut débarrassé des débris cellulaires insolubles.

(2) Chromatographie d'affinité sur complexe 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 His fusionnée du côté N-ter de la Tsa1. Ces interactions sont dues aux propriétés des histidines dont le noyau imidazole possède un doublet d'électrons libres porté par un atome d'azote (à pH 8), pouvant former des complexes avec les ions métalliques divalents comme le Ni²⁺. Les ions Ni²⁺ utilisés pour cette purification, sont fixés à la résine qui possède des groupements iminodiacétate, chélateur de ces ions.

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 FPLC ÄKTATM Avant (GE Healthcare[®]), préalablement équilibrée avec le tampon TE, 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 la DO₂₈₀.

(3) Concentration et conservation

Les fractions contenant la 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), et additionné de 5% de glycérol. Enfin la protéine est conservée à -20°C après ajustement à 15 % en glycérol. La concentration molaire est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm (coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{nm}} = 27500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

b) Production et purification des Tsa1 recombinantes ne portant pas d'étiquette His.

Les protéine Tsa1_{WT} et Tsa1C171A ont été utilisé principalement pour les expériences d'anisotropie de fluorescence (voir ci dessous). Et ce, pour éviter toute fixation non spécifique de l'analogue de l'ATP par la Tsa1 portant une étiquette His.

(1) Culture et extraction

La protéine Tsa1 (Tsa1_{WT} ou Tsa1C171A) est produite dans la souche *E. coli* C41(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET20b-Tsa1 (WT ou C171A). Les cultures sont réalisées, dans du milieu LB supplémenté en ampicilline (50 mg/l). Les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 0.1 DO_{600nm} puis incubées à 37 °C sous agitation. L'expression de Tsa1 est induite par ajout d'IPTG (1 mM) à une DO_{600nm} cellulaire d'environ 0.6 au bout de 3 à 4 heures. Ces cultures sont ensuite incubées pendant 16 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

(2) Chromatographie d'interactions hydrophobes

Le surnageant (extrait cellulaire soluble) correspond à l'extrait brut débarrassé des débris cellulaires insolubles contenant Tsa1 est ajustées à 1 M de SA et 20 mM de DTT, puis injecté sur une colonne d'interaction hydrophobe de type phényl-Sépharose HP (volume de 75 mL, Amersham Biosciences[®]) couplée au système FPLC ÄKTA[™] Avant (GE Healthcare[®]), préalablement équilibrée dans le tampon TE additionné de SA (1 M). Les protéines, détectées par la mesure de la DO_{280nm}, sont éluées par un gradient linéaire en SA de 1 M à 0 M en 4 volumes colonne. Cette étape permet de séparer Tsa1 des contaminants protéiques et des contaminants nucléiques en fonction de leur degré d'hydrophobie de surface.

(3) Chromatographie échangeuse d'anions

La solution protéique contenant Tsa1 issue de l'étape précédente est injectée sur une colonne échangeuse d'anion Q-Sépharose (résine d'agarose 6 % sur laquelle sont greffés des groupements triméthylammonium) préalablement équilibrée avec du tampon TE et couplé au système FPLC ÄKTA[™] Avant (GE Healthcare[®]). L'éluion est réalisée par un gradient croissant de KCl de 0 à 1 M et elle est suivie par la mesure d'absorbance à 280 nm. La Tsa1 est éluee à une concentration de 300 mM de KCl.

Cette étape permet d'éliminer les derniers contaminants protéiques et les fragments d'acides nucléiques encore présents.

(4) *Concentration et conservation*

Les fractions contenant la Tsa1 purifiée sont rassemblées, concentrées selon le même protocole décrit en (3) page 132.

c) *Production et purification des protéines recombinantes ScSrx.*

(1) *Culture et extraction*

La protéine recombinante ScSrx (*ScSrx_{WT}* ou *ScSrxC48A-C106V* également appelée *ScSrx^{C84}*) est produite dans la souche C41 (DE3) transformée par le plasmide pET20b-Srx Σ (WT ou portant la mutation C48A-C106V, respectivement), dans du milieu *GRAFFINITY* supplémenté en ampicilline (20 mg/L).

Dans un premier temps, les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO_{600nm} dans du LB supplémenté en glucose 0,5 % et en ampicilline (20 mg/l), puis incubées à 37 °C sous agitation (180 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 1,2 et 1,5. Les cultures sont ensuite diluées deux fois par ajout de LB supplémenté en lactose 0,6%, Hepes 20 mM (milieu *GRAFFINITY*), et IPTG 1 mM, et sont incubées à 20°C sous agitation pendant 18 heures.

Les conditions d'extraction des protéines solubles sont les mêmes que celles décrites dans le § (1) page 132, en utilisant le tampon MES en présence de DTT (10 mM) et 0.1% Triton X-100.

(2) *Précipitation au sulfate d'ammonium*

Après extraction, l'extrait cellulaire est dilué à une DO_{280nm} de 50 puis est amené à 55% de saturation en SA et incubé 2 à 3 heures à 4 °C sous agitation douce. La protéine *ScSrx_(WT ou DM)* est récupérée dans le culot après 30 min de centrifugation à 12000 g.

(3) *Chromatographie échangeuse de cations*

Le culot de précipitation repris dans le tampon MES est injecté, après filtration sur une membrane d'acétate de cellulose (0,45 μ m), sur une colonne échangeuse de cations de type

SP-Sépharose HP de 75 ml (résine portant des groupements sulfopropyl), Amersham Biosciences), couplée au système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée avec le même tampon (MES). La protéine ScSrx est éluée par un gradient linéaire en KCl de 0 à 1 M en 3 volumes colonne. Cette étape permet de séparer ScSrx d'une grande partie des contaminants protéiques et nucléiques grâce à son caractère basique (pI théorique de 9,2). Les fractions contenant ScSrx, identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE sont rassemblées.

(4) *Chromatographie d'interactions hydrophobes*

Les fractions contenant ScSrx issues de la chromatographie échangeuse de cations sont ajustées à 1 M de SA, puis injectées sur colonne d'interactions hydrophobe de type phényl-Sépharose HP de 75 ml, Amersham Biosciences, couplée au système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée dans le tampon MES additionné de SA (1 M). Les protéines suivies par la mesure de la DO_{280nm}, sont éluées par deux gradients linéaires en SA, le premier de 1 à 0,5 M en 1,5 volumes colonne, et le deuxième de 0,5 à 0 M en 4,5 volumes colonne. Cette étape permet de séparer ScSrx des contaminants protéiques en fonction de leur degré d'hydrophobie de surface.

(5) *Concentration et conservation*

Les fractions contenant ScSrx sont concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La Srx est conservée sous forme précipitée à -20°C en présence de DTT (20 mM) et de SA (70% de saturation). La concentration molaire est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 7280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

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

(1) *Culture et extraction*

Le même protocole est utilisé que celui décrit dans le § (1) page 133.

(2) Précipitation au sulfate d'ammonium

Après extraction, l'extrait cellulaire est dilué à une $DO_{280\text{nm}}$ de 50 puis est amené à 55% de saturation en SA et incubé 2 à 3 heures à 4 °C sous agitation douce. La protéine Trx1 est récupérée dans le culot après 30 min de centrifugation à 12000 g.

(3) 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.

(4) Chromatographie échangeuse d'anions

Le même protocole est utilisé que dans le § (3) page 133. La Trx1 est éluée à une concentration de 320 mM de KCl.

(5) Concentration et conservation

Les fractions contenant Trx1 sont concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La Trx1 est conservée à -20°C. La concentration molaire est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 14500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

e) Production et purification de la Grx1 d'E. coli.

Le même protocole décrit dans le § d) page 135.

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, ainsi que d'analyser les complexes protéiques produits au cours de la réaction de ScSrx^{C84} en absence vs présence de réducteur (cf. § (3) page 145). 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 (151).

b) Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes.

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été déterminé à l'aide des méthodes de Lewis (152) et de Gill et von Hippel (153). La méthode de Lewis repose sur le calcul de la concentration en protéine par une relation empirique :

$$C = \frac{DO_{280\text{ nm}} - 10 (2,5 \times \text{Log DO } 320\text{ nm} - 1,5 * \text{Log DO } 350\text{ nm})}{5540 \times \text{nombre de Trp par monomère} + 1480 \times \text{nombre de Tyr par monomère}}$$

La méthode de Gill et von Hippel est fondée sur la mesure des densités optiques à 280 nm pour la protéine en conditions native et dénaturante (en présence de chlorure de guanidinium). Le calcul de la concentration en condition dénaturantes repose sur la valeur théorique du coefficient d'extinction molaire à 280 nm ($\epsilon_{\text{dénat}} = 1280 \times \text{nombre Tyr} + 5690 \times \text{nombre Trp}$).

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

Le contenu en thiols libres des protéines purifiées est déterminé par réaction avec le DTNB (0,3 mM) en suivant l'apparition du thionitrobenzoate libéré à 412 nm ($\epsilon_{412\text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Figure 58 page 138). La concentration en protéine (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).

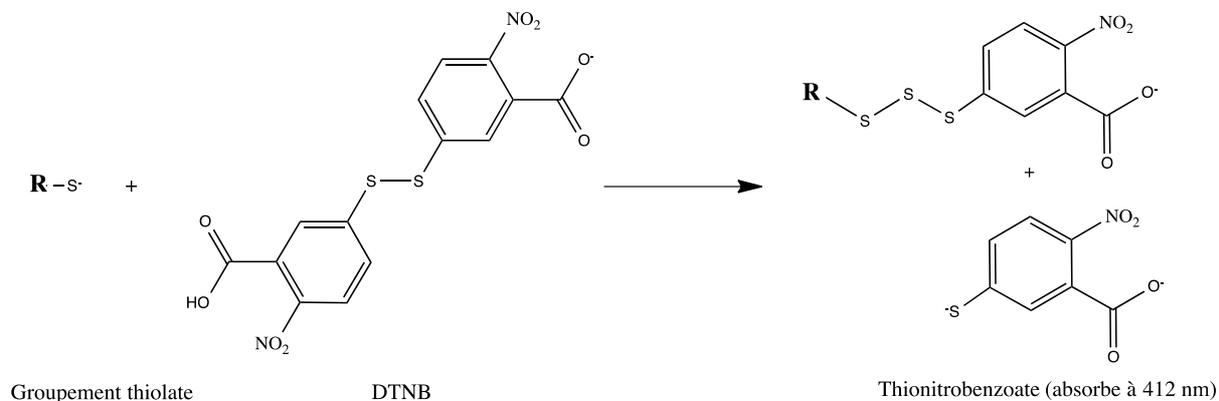


Figure 58 : Réaction de dosage des groupements thiols avec le DTNB.

d) Détermination de la masse moléculaire des protéines par spectrométrie de masse

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon exempt de toute trace de sels, les protéines sont dessalées par chromatographie en phase inverse sur une colonne de type C8 (Vydac 208TP52, 2,1 x 250 mm, 5 µm ; PerkinElmer Life Sciences) couplée au système HPLC ÄKTA explorer (Amersham Biosciences). Les protéines éluées sont ensuite lyophilisées puis solubilisées dans l'acétate d'ammonium (50 mM), pH 6.8, en absence ou en présence de DTT (10 mM), pour être 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 MicroTOF-Q (Bruker Daltonics).

4. Caractérisation enzymatique

a) Oxydation de la cystéine catalytique d'une 2-Cys Prx sous forme acide sulfinique

La forme de Tsa1C_P-SO₂H, substrat de ScSrx, est obtenue en présence de H₂O₂ 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 H₂O₂ et de 100 mM de DTT, pendant 10

minutes, un second puis un troisième ajout de 5 mM de H₂O₂ chacun suivi d'une incubation de 10 minutes à 30 °C permettent d'atteindre un degré d'oxydation de la Cys C_p en acide sulfonique supérieur à 95 %. Le mélange réactionnel est dessalé par filtration sur gel sur une colonne Econo-Pac 10DG (Bio-Rad) pour éliminer le DTT et H₂O₂ en excès. La concentration molaire est déterminée spectrophotométriquement à 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 27500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

b) Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire

(1) Test d'activité de la ScSrx_{WT} via le système couplé Trx1/TrxR/NADPH.

Les tests d'activité sont effectués dans le tampon TK à 30 °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 : Tsa1-C_p-SO₂H (50 µM), ATP (1 mM), MgCl₂ (1 mM), Trx (50 µM), Trx réductase (0.5 µM), NADPH (200 µM), l'ajout de Srx_{WT} déclenchant la réaction. Une mesure à blanc est enregistrée systématiquement avant l'ajout de Srx_{WT} et est déduite de la mesure finale. La Trx jouant le rôle de réducteur dans les cycles catalytiques de la ScSrx_{WT} et de la Tsa1_{WT} (Figure 59 page 141), deux moles de NADPH sont consommées par mole de Tsa1C_p-SO₂H réduite, soit un coefficient d'extinction molaire à 340 nm résultant de 2 x 6200 M⁻¹.cm⁻¹ ou 12400 M⁻¹.cm⁻¹.

Les paramètres cinétiques de la ScSrx_{WT} pour les cosubstrats Mg²⁺ ou Mn²⁺ et ATP ou le γ -thio-ATP sont déterminés en utilisant le système couplé Trx/TrxR/NADPH, en faisant varier la concentration de MgCl₂, MnCl₂, ATP ou γ -thio-ATP, respectivement, dans une gamme allant de 0,5 à 10 K_M, la concentration des autres substrats restant fixe. La variation de la constante de vitesse mesurée k_{obs} est analysée à l'aide du logiciel Sigma plot 6.0, par régression non linéaire contre l'équation de Michaelis-Menten (ci dessous):

$$k_{obs} = \frac{k_{max} [S]}{(K_M + [S])}$$

Avec [S] correspondant à la concentration du substrat variable, k_{max} : la constante de vitesse maximum de la réaction dans ces conditions et K_M la constante de Michaelis.

(2) *Test d'activité de la ScSrx^{C84} via le système couplé Trx1/TrxR/NADPH*

Les mêmes conditions détaillées dans le § (1) page 139 ont été utilisées, en substituant la ScSrx_{WT} par ScSrx^{C84} pour déclencher la réaction. La Trx1 jouant le rôle de réducteur de Tsa1C_P-SO-S-CSrx et Tsa1C_P-S-S-C_RTsa1 (Tsa1 notée Prx dans la Figure 60 page Figure 60), deux moles de NADPH sont consommées par mole de Tsa1C_P-SO₂H, soit un coefficient d'extinction molaire à 340 nm résultant de 12400 M⁻¹.cm⁻¹.

(3) *Test d'activité de la ScSrx^{C84} via le système couplé GSH/Grx1/GR/NADPH*

Les tests d'activité sont effectués dans le tampon TK à 30 °C en utilisant la Grx1 d'*E. coli*, en présence de GSH et la glutathion réductase. La disparition du NADPH est suivie par la diminution de la DO_{340nm} au cours du temps. Le mélange réactionnel comporte : Tsa1C_P-SO₂H (50 µM), ATP (1 mM), MgCl₂ (1 mM), Grx1 (50 µM), GSH (concentrations variables), glutathion réductase (0.5 µM), NADPH (200 µM), l'ajout de ScSrx^{C84} déclenchant la réaction. Une mesure à blanc est enregistrée systématiquement avant l'ajout de ScSrx^{C84} et est déduite de la mesure finale. ■ Une stœchiométrie de 2 moles de NADPH par mole de Tsa1C_P-SO₂H a été utilisée dans les calculs des constantes de vitesse pour tenir compte de l'oxydation de 2 moles NADPH dans la réduction du produit ScSrx^{C84} glutathionylée et de la Prx (Figure 61 page 143), soit un coefficient d'extinction molaire à 340 nm résultant de 12400 M⁻¹.cm⁻¹.

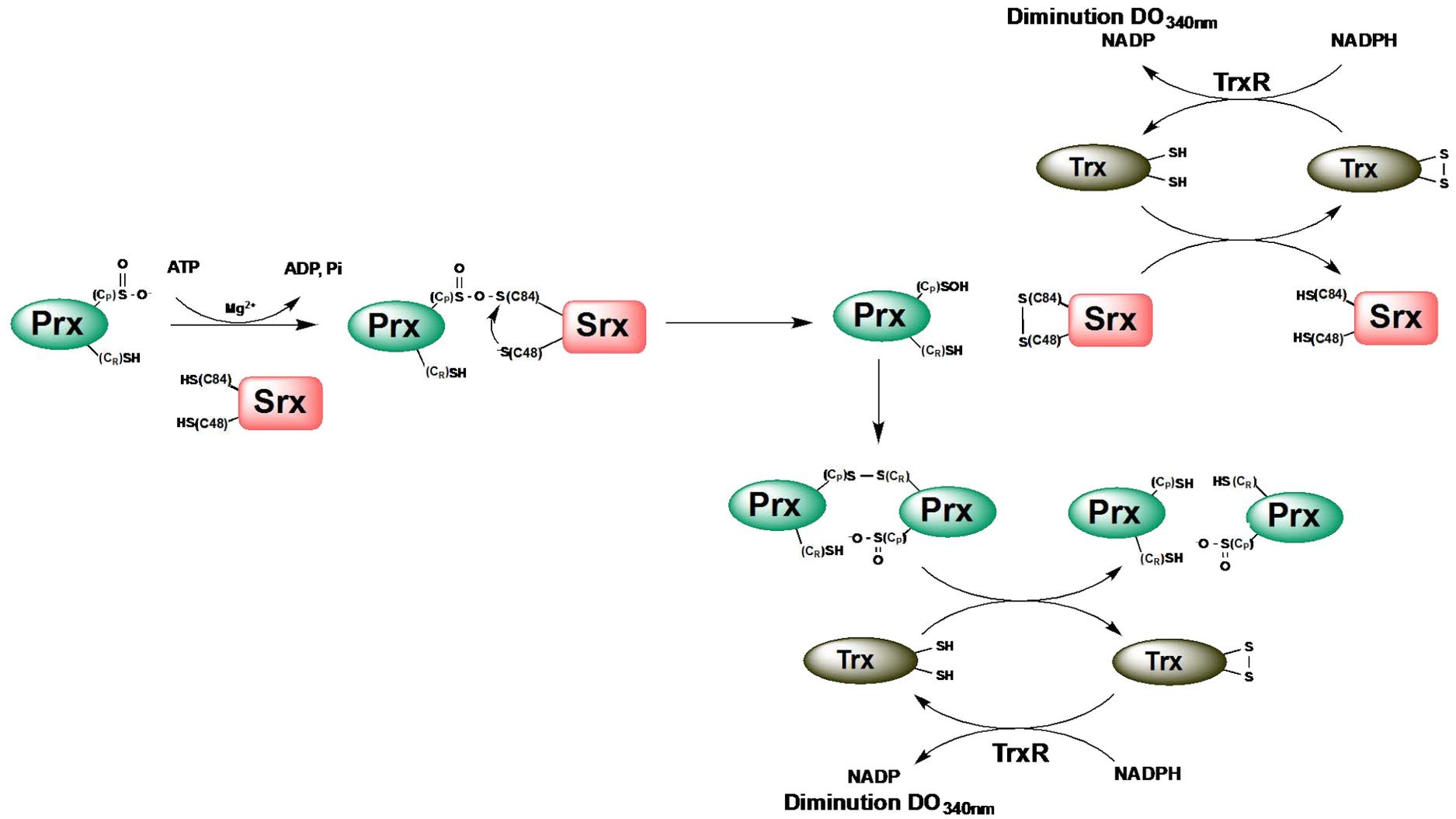


Figure 59 : Schéma représentatif du système couplé Trx1/TrxR/NADPH correspondant à un cycle catalytique de *ScSrx_{WT}* en présence de son substrat *Tsal_{CP}-SO₂H*

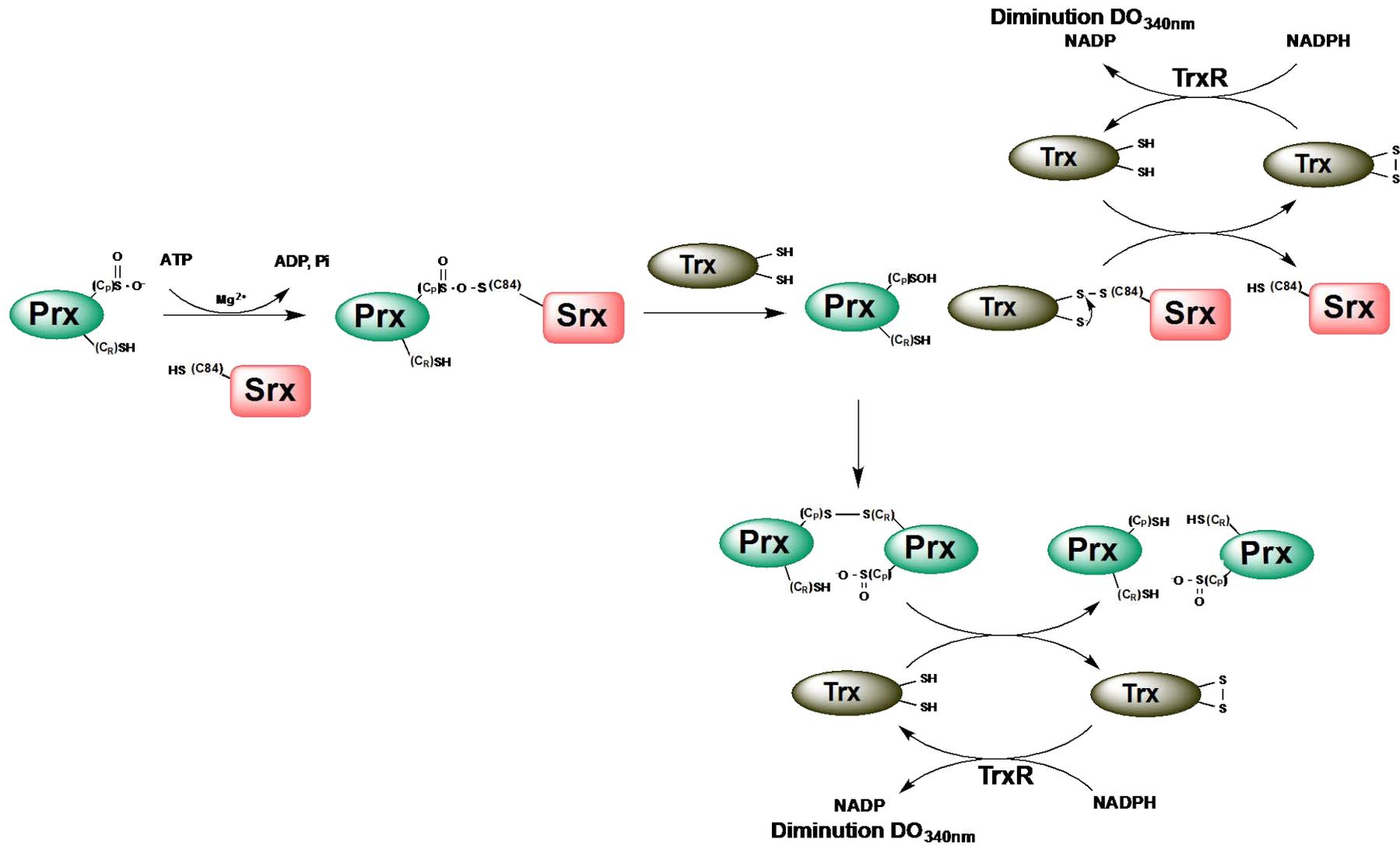


Figure 60 : Schéma représentatif du système couplé *Trx1/TrxR/NADPH* correspondant à un cycle catalytique de *ScSrx^{C84}* en présence de son substrat *Ts1Cp-SO₂H*

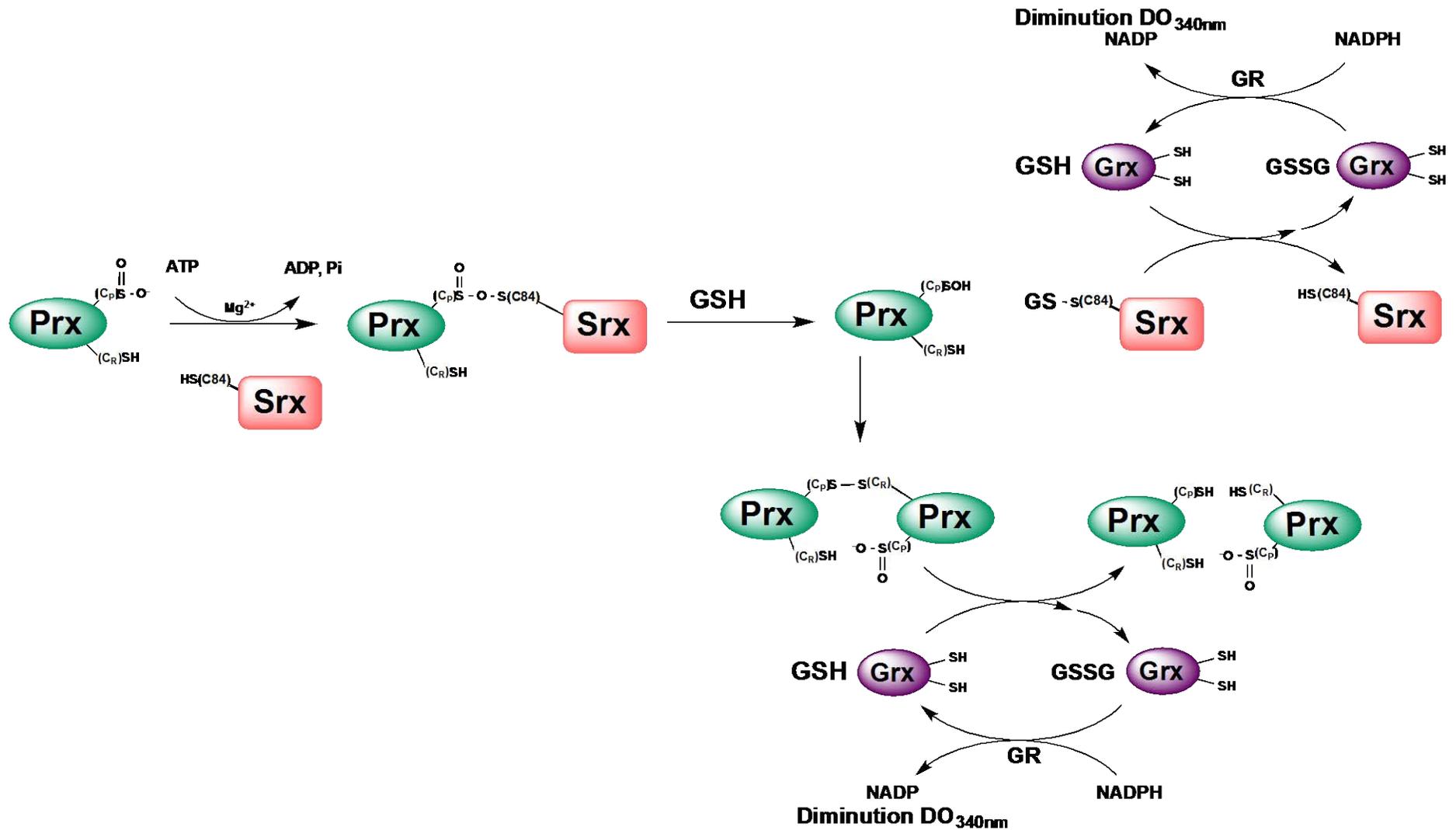


Figure 61 : Schéma représentatif du système couplé GSH/Grx/GR/NADPH correspondant à un cycle catalytique de ScSrx^{C84} en présence de son substrat TsalCp-SO₂H

c) *Détermination des paramètres cinétiques à l'état pré-stationnaire*

(1) *Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx_{WT}, en fonction du pH*

Cette technique est fondée sur la variation d'intensité d'émission de fluorescence de Tsa1_{WT}, en fonction de son état d'oxydation (Figure 48 page 80). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R (Leatherhead, UK) (stopped-flow). La première seringue contient ScSrx_{WT} 10 µM dans un tampon (tricine 25 mM, imidazole 100 mM, acide acétique 75 mM) dont la force ionique est ajusté à 0.1 M avec KCl, de pH variable (de 4.5 à 9.2). La deuxième seringue contient la Tsa1C_P-SO₂H 80 µM, ATP ou γ-thio-ATP 2 mM, MgCl₂ ou MnCl₂ 2 mM, dans le même tampon. La température est maintenue à 30 °C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence intrinsèque de la Tsa1 aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm. Les données expérimentales obtenues sont ajustées par régression non linéaire contre une équation décrivant une phase exponentielle décroissante suivie d'une phase linéaire afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes (équation ci dessous) :

$$y = Ae^{-k_{obs}.t} + B.t + C$$

avec A : l'amplitude de la phase exponentielle, B : la pente correspondant au bruit de fond non spécifique (B < 0), C : une constante et k_{obs} : la constante de vitesse de la phase exponentielle.

La variation de k_{obs} en fonction du pH est ajustée par régression non linéaire contre l'équation ci dessous :

$$y = \frac{k_{obs\ max}}{1 + 10^{\text{pK}_{app1} - \text{pH} + 10}} + \frac{\gamma k_{obs\ max}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{app2}}}$$

Avec pK_{app1} and pK_{app2} correspondants aux valeurs de pK_a apparents mesurée, k_{\max} représente la constante de vitesse maximum de la réaction dans ces conditions et γk_{\max} la constante de vitesse à pH élevé.

(2) *Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx^{C84}, en présence du GSH*

Le recyclage de ScSrx^{C84} par GSH a été suivi à l'aide d'un appareil de cinétique à l'aide d'un appareil de cinétique rapide stopped-flow. Une seringue contient Tsa1C_P-SO₂H (80 µM), l'ATP (2 mM), MgCl₂ (2 mM) et du glutathion à des concentrations variables, comme indiqué, dans un tampon TK. L'autre seringue contenant ScSrx^{C84} (10 µM) dans le tampon TK. Les données expérimentales obtenues sont ajustées par régression non linéaire contre une équation décrivant une phase exponentielle décroissante suivie d'une phase linéaire afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes (équation II).

(3) *Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx^{C84} sur gel SDS-PAGE*

L'analyse cinétique des espèces formées pendant la réaction catalysée par ScSrx^{C84} a été suivie en incubant Tsa1C_P-SO₂H C171A (30 µM), ScSrx^{C84} (30 µM), ATP (1 mM) et de MgCl₂ (1 mM) dans un tampon TK, en absence vs présence de GSH (5 mM), comme indiqué. La réaction a été arrêtée par acidification suite à l'ajout de TCA (20 %), les protéines précipitées sont alors lavées à trois reprises dans l'acétone, séchées à l'air (speedVac) et dissoutes dans un tampon 100 mM de Tris-HCl, pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1% et N-éthylmaléimide 50 mM à 30 ° C pendant 1 h et à l'abri de la lumière. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel SDS-PAGE 15% non réducteur, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. La quantification des espèces présentes a été réalisée par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ.

(4) *Étude cinétique de la réaction catalysée par la ScSrx^{C84} par chromatographie en phase inverse C8*

Le suivi de l'évolution des espèces protéiques en présence de GSH, a été également réalisé par chromatographie en phase inverse. Les mélanges réactionnels contenant ScSrx^{C84} (30 µM), Tsa1C_P-SO₂H C171A (30 µM), ATP (1 mM) et de MgCl₂ (1 mM) ont été incubés en présence de 0,1 , 1 et 10 mM de GSH dans un tampon TK à 30 °C. La réaction a été arrêtée à différents temps comme indiqué par acidification à l'aide du TFA (0,1% concentration finale). Les aliquots issus ont été chargés sur une colonne Vydac 208TP52 (C8), 2,1 x 250

mm, 5 μm (PerkinElmer Life Sciences), préalablement équilibrée dans H_2O , 0,1% de TFA, couplée au système ÄKTA explorer (Amersham Biosciences). Les protéines ont été éluées en utilisant un gradient linéaire de 30 à 80 % de B (TFA 0,1% dans de l'acétonitrile), à un débit de 1 mL/min. Les fractions recueillies ont été stockées à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ puis analysées par spectrométrie de masse. Le calcul de l'aire de surface des pics a permis de suivre l'évolution des espèces en fonction du temps.

d) Étude de la stabilité des complexes type Michaelien par anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence représente l'outil adapté pour étudier la stabilité de complexes quaternaires de type Michaelien ($\text{Tsa1C}_P\text{-SO}_2\text{H/ATP/Mg}^{2+}/\text{Srx}$). Dans ces expériences, un analogue d'ATP fluorescent et non hydrolysable (mant-ADP et mant-AMP-PNP) (Figure 52 page 92, Figure 56 page 97) a été utilisé comme sonde pour caractériser la formation du complexe. Le principe de l'anisotropie de fluorescence repose sur la vitesse de rotation du fluorophore. Cette vitesse dépend de la taille de la sonde fluorescente (libre ou engagée dans un complexe), celle-ci "tourne" moins vite en solution lorsqu'elle est impliquée dans un complexe macromoléculaire qu'à l'état libre. L'exploitation de cette différence d'anisotropie a permis de déterminer la constante de dissociation du complexe (K_d). La titration est réalisée par dilution en cascade de $\text{Tsa1C}_P\text{-SO}_2\text{H}$ et ScSrx ajoutées ensemble (stœchiométrie 1 :1). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil Spectrofluorimètre *SAFAS Xenius XC*, λ_{exc} 355 nm; λ_{em} 448 nm.

L'appareil détermine l'anisotropie des échantillons excités par une source polarisée verticalement selon la relation :

$$A = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 G \cdot I_{VH}}$$

Avec : I_{VV} : intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation verticale pour l'excitation et l'émission ; I_{VH} : intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation horizontale pour l'émission. Le facteur G de l'appareil représente le ratio de la sensibilité du détecteur pour la lumière polarisée verticalement et horizontalement et est calculée à chaque mesure.

5. Techniques de manipulation des levures

a) Transformation de cellules compétentes de levures

La préparation de cellules de levure compétentes et leur transformation est réalisée à partir de 10 mL de cellules cultivées à 30 °C, en phase exponentielle de croissance. À une absorbance ($A_{600\text{nm}}$) d'environ 0,4 à 0,6 unités, les cellules sont lavées dans 1 mL d'eau stérile, avant d'être reprises dans 1 mL tampon TE-LiAc (Acétate de lithium 0,1 M ; Tris 10 mM EDTA 1 mM, pH 7,5). Le culot cellulaire est ensuite repris dans un volume de 100 μL de TE-LiAc et la suspension cellulaire est incubée 30 min à 30 °C. La transformation est réalisée par l'ajout de 0,5 à 1 μg d'ADN (plasmide pRS316-SRX1-HA₂ ou pRS316-SRX1-C48S-HA₂), de 45 μg d'ADN de sperme de saumon dénaturé (10 min à 100 °C) et de 300 μL de tampon TE-PEG (PEG 4000 40 % ; TE-LiAc). A l'issue de cette étape, les cellules sont incubées pendant 1 h à 30 °C, puis ensuite pendant 15 min à 42 °C, avant d'être lavées dans 1 mL d'eau stérile, puis étalées sur milieu sélectif solide (SD URA⁻) et incubées à 30 °C pendant 1 à 3 jours.

Avant chaque expérience, les souches Δgsh1 Δsrx1 et Δgsh1 sont cultivées dans un milieu de préculture contenant une concentration en GSH suffisante (100 μM) pour assurer une croissance similaire à celle d'une souche non invalidée pour le gène *GSH1*. Ces cellules également sont supplémentées en GSH (100 μM) pendant la phase de régénération pendant la transformation avant d'être étalées sur un milieu sélectif solide supplémenté par le GSH (100 μM) (SD URA⁻, + GSH) à 30 °C pendant 3 à 5 jours.

b) Modification génétique des souches de levure

Au cours de ce travail, certaines des souches de levure (Δgsh1 , Δsrx1 , $\Delta\text{srx1}\Delta\text{trx1}\Delta\text{trx2}$) ont été préparées dans le laboratoire du Dr. Michel Toledano (laboratoire LSOC équipe stress oxydants et cancer -CEA Saclay). La souche $\Delta\text{srx1}\Delta\text{gsh1}$ a été préparée au laboratoire. Pour ce faire, les levures ont été transformées avec environ 1 μg d'ADNdb linéaire obtenus par PCR et permettant la modification d'un *locus* spécifique par recombinaison homologue. Ce fragment d'ADN est obtenu à partir du plasmide pUG6 (aimablement fourni par le Dr. Christophe Jacob), porteur de la cassette KanMX permettant la résistance à la généticine. Pour cela, des oligonuclotides avec amorces complémentaires du gène *SRX1* (en 5') (40 nt) et des extrémités de la séquence *kanMX* (en 3') (20 nt) ont été

utilisés (Figure 62 page 149). Après amplification utilisant comme matrice le plasmide pUG6, les fragments obtenus sont purifiés et dosés par mesure d'absorbance à 260 nm. Ce produit de PCR (fragment chimère) purifié a été ensuite utilisé pour transformer des cellules $\Delta gsh1$. A l'issue de la transformation, les cellules sont incubées 24 h à 30 °C, sur milieu YPD puis répliquées, à l'aide d'un velours, sur le milieu sélectif YPD + généticine. L'invalidation dans les clones positifs obtenus a été par la suite confirmée par PCR sur l'ADN génomique à l'aide d'amorces extérieures au cadre ouvert de lecture de *SRX1*.

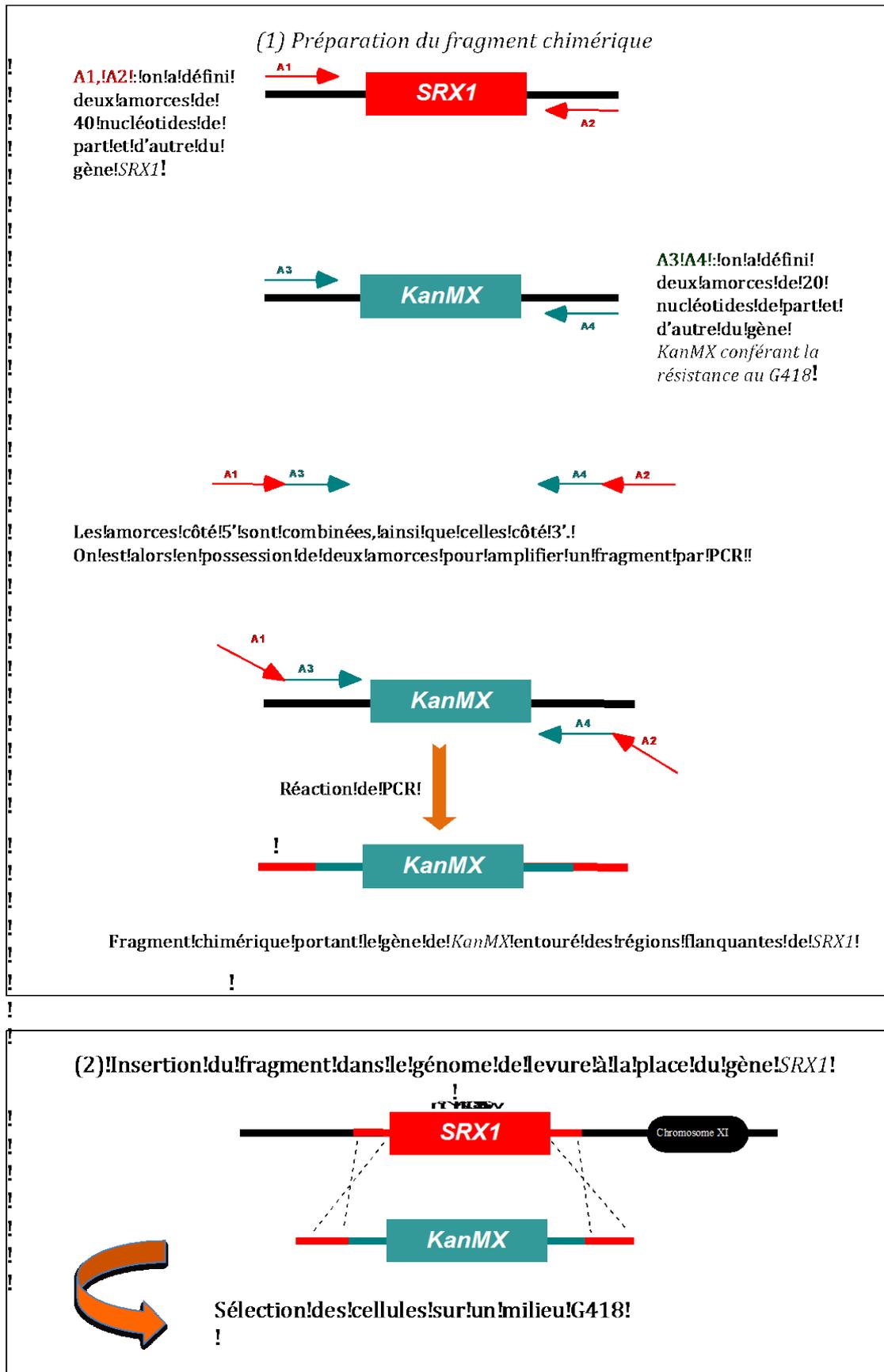


Figure 62 : Schéma de l'invalidation du gène SRX1

c) *Analyse des extraits cellulaires*

(1) *Extraction des protéines par lyse à pH acide*

La protéine Srx1 étant indétectable en conditions standard de croissance (Biteau *et al.*, 2003), les cellules en début de phase exponentielle de croissance (0.3 à 0.4 DO_{600 nm} /mL) sont traitées avec 100 µM d'H₂O₂ pendant 15 min afin d'induire l'expression de *SRX1*. Les cultures sont ensuite exposées à 500 µM d' H₂O₂ pendant les temps indiqués. Le traitement est arrêté par ajout dans le milieu d'acide trichloracétique (TCA) (20 % final). Les cellules sont lavées dans le TCA 20 %, puis congelées dans un bain d'azote liquide. La lyse est effectuée dans 400 µL de TCA 20 %, à l'aide de billes de verre (taille 425-600 µm). Les échantillons sont alternativement vortexés pendant une minute et refroidis dans la glace. Cette étape est répétée cinq fois. Le lysat est ensuite récupéré, les billes de verre sont lavées avec 200 µL de TCA 5 % et les produits de lavage sont ajoutés au lysat. Les extraits sont ensuite centrifugés 10 minutes à 20 000g. Le culot, contenant les protéines précipitées, est ensuite lavé 3 fois à l'acétone puis séché sous vide. Les protéines sont alors resolubilisées dans 100 µL de tampon Tris 100 mM pH 8, SDS 1 %, EDTA 1 mM, N-ethylmaléimide (NEM) 50 mM sous agitation à 30°C pendant 30 min à l'abri de la lumière.

(2) *Analyse des formes oxydées des protéines par western blot redox*

Les échantillons protéiques sont dosés par la méthode de Bradford, et une quantité de 10 µg environ est déposée dans chaque puits. Les protéines sont dénaturées par ajout d'une solution tampon de Laemmli [SDS (2 %), Tris-HCl pH 8.7 (62.5 mM), glycérol (10 %), bleu de bromophénol (0.01 %)], avec ou sans ajout de DTT 10 mM. Les échantillons sont incubés 5 minutes à 95°C, puis déposés sur gel SDS PAGE (acrylamide : bis acrylamide; 30 : 0.4). Après séparation par électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. L'immuno-détection est réalisée au moyen d'un anticorps spécifique et d'une réaction de chimio-luminescence (ECL- Plus, Amersham-Pharmacia).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bindoli A, Rigobello MP. Principles in Redox Signaling: From Chemistry to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May;18(13):1557–93.
2. DeYulia GJ, Cárcamo JM, Bórquez-Ojeda O, Shelton CC, Golde DW. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor–ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5044–9.
3. D’Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Oct;8(10):813–24.
4. Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JTR, Goldstein BJ. Hydrogen Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):48662–9.
5. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, et al. Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Generation of Hydrogen Peroxide ROLE IN EGF RECEPTOR-MEDIATED TYROSINE PHOSPHORYLATION. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):217–21.
6. Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J*. 1989;263:539–45.
7. Lo YYC, Cruz TF. Involvement of Reactive Oxygen Species in Cytokine and Growth Factor Induction of c-fos Expression in Chondrocytes. *J Biol Chem*. 1995 May 19;270(20):11727–30.
8. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1865–79.
9. D’Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813–24.
10. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978 Sep 8;201(4359):875–80.
11. Winterbourn CC, Metodiewa D. The Reaction of Superoxide with Reduced Glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 1994 Nov;314(2):284–90.
12. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 1999 Aug;27(3–

4):322–8.

13. Mumbengegwi DR, Li Q, Li C, Bear CE, Engelhardt JF. Evidence for a Superoxide Permeability Pathway in Endosomal Membranes. *Mol Cell Biol*. 2008 Jun 1;28(11):3700–12.

14. Hidalgo E, Ding H, Demple B. Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(6):207–10.

15. Winterbourn CC. *The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide*. *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2014 Mar 20]. p. 3–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012405881100001X>

16. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2006 Aug;1758(8):994–1003.

17. Mishina NM, Tyurin-Kuzmin PA, Markvicheva KN, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Laketa V, et al. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(1):1–7.

18. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):722–8.

19. Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med*. 2008 Mar 15;44(6):956–68.

20. Conrad M, Sandin A, Forster H, Seiler A, Frijhoff J, Dagnell M, et al. 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Sep 7;107(36):15774–9.

21. Beck CF. Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta*. 2005 Nov;222(5):743–56.

22. Girotti AW, Kriska T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(2):301–10.

23. Smith BC, Marletta MA. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Curr Opin Chem Biol*. 2012 Dec;16(5-6):498–506.

24. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, et al. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul 1;45(1):18–31.

25. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys*. 1995;323(1):120–6.

26. Midwinter RG, Vissers MCM, Winterbourn CC. Hypochlorous Acid Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Enhances Cell Survival. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Oct;394(1):13–20.
27. Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating Redox Signaling Networks through Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chem Biol*. 2010 Jan 15;5(1):47–62.
28. Geiszt M, Leto TL. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):51715–8.
29. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*. 2007 Aug 1;43(3):319–31.
30. Oakley FD, Abbott D, Li Q, Engelhardt JF. Signaling Components of Redox Active Endosomes: The Redoxosomes. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun;11(6):1313–33.
31. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, et al. Mitochondrial α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7779–88.
32. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*. 2004 Feb;25(1–2):17–26.
33. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis. *Cell*. 2005 Jul 29;122(2):221–33.
34. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 1999 Nov 18;402(6759):309–13.
35. Lee SB, Kim JJ, Kim TW, Kim BS, Lee M-S, Yoo YD. Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1. *Apoptosis*. 2010 Feb;15(2):204–18.
36. Chung YM, Kim JS, Yoo YD. A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 1;347(3):649–55.
37. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death Differ*. 2010;17(9):1420–34.
38. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1822(9):1363–73.
39. Li Y, Tharappel JC, Cooper S, Glenn M, Glauert HP, Spear BT. Expression of the hydrogen peroxide-generating enzyme fatty acyl CoA oxidase activates NF-kappa B.

DNA Cell Biol. 2000;19(2):113–20.

40. Faccio G, Nivala O, Kruus K, Buchert J, Saloheimo M. Sulfhydryl oxidases: sources, properties, production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Aug;91(4):957–66.

41. Bulleid NJ, Ellgaard L. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem Sci.* 2011 Sep;36(9):485–92.

42. Reddie KG, Carroll KS. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Dec;12(6):746–54.

43. Levine RL, Berlett BS, Moskowitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 1999 Mar 15;107(3):323–32.

44. Swaim MW, Pizzo SV. Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol.* 1988 Apr 1;43(4):365–79.

45. Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 2001 Mar;83(3–4):301–10.

46. Gitlin G, Tsarbopoulos A, Patel ST, Sydor W, Pramanik BN, Jacobs S, et al. Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. *Pharm Res.* 1996 May;13(5):762–9.

47. Schöneich C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 17;1703(2):111–9.

48. Boschi-Muller S, Olry A, Antoine M, Branlant G. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 17;1703(2):231–8.

49. Cabreiro F, Picot CR, Friguet B, Petropoulos I. Methionine Sulfoxide Reductases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 May 1;1067(1):37–44.

50. Nagy P, Ashby MT. Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J Am Chem Soc.* 2007 Nov;129(45):14082–91.

51. Nagy P, Lemma K, Ashby MT. Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Reaction of Cysteine Thiosulfinate Ester with Cysteine to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J Org Chem.* 2007 Nov;72(23):8838–46.

52. Giles GI, Tasker KM, Collins C, Giles NM, O'rourke E, Jacob C. Reactive sulphur species: an in vitro investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides.

Biochem J. 2002 Jun 1;364(Pt 2):579–85.

53. Roussel X, Bechade G, Kriznik A, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, et al. Evidence for the Formation of a Covalent Thiosulfinate Intermediate with Peroxiredoxin in the Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin. *J Biol Chem.* 2008 Jun 18;283(33):22371–82.

54. Jonsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Lowther WT. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Peroxiredoxin by Sulfiredoxin Proceeds Directly through a Sulfinic Phosphoryl Ester Intermediate. *J Biol Chem.* 2008 Jun 4;283(35):23846–51.

55. Prinz WA, Åslund F, Holmgren A, Beckwith J. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coli Cytoplasm. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):15661–7.

56. Draculic T, Dawes IW, Grant CM. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2000;36(5):1167–74.

57. Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F. The system biology of thiol redox system in Escherichia coli and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett.* 2007 Jul;581(19):3598–607.

58. Pillay CS, Hofmeyr J-HS, Olivier BG, Snoep JL, Rohwer JM. Enzymes or redox couples? The kinetics of thioredoxin and glutaredoxin reactions in a systems biology context. *Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):269.

59. Krause G, Lundström J, Barea JL, Cuesta CP de la, Holmgren A. Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in Escherichia coli thioredoxin. *J Biol Chem.* 1991 May 25;266(15):9494–500.

60. Cheng Q, Sandalova T, Lindqvist Y, Arnér ESJ. Crystal Structure and Catalysis of the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1. *J Biol Chem.* 2009 Feb 6;284(6):3998–4008.

61. Arnér ESJ. Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2009 Jun;1790(6):495–526.

62. Jeng MF, Campbell AP, Begley T, Holmgren A, Case DA, Wright PE, et al. High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin. *Struct Lond Engl* 1993. 1994 Sep 15;2(9):853–68.

63. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal.* 2013

Apr;18(10):1165–207.

64. Morgan B, Ezeriņa D, Amoako TNE, Riemer J, Seedorf M, Dick TP. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol*. 2012 Dec 16;9(2):119–25.

65. Winther JR, Jakob U. Redox control: A black hole for oxidized glutathione. *Nat Chem Biol*. 2013 Feb;9(2):69–70.

66. Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW, Grant CM. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell*. 1998;9(5):1081–91.

67. Deponce M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2013 May;1830(5):3217–66.

68. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*. 1989 Aug 25;264(24):13963–6.

69. Kumar C, Igarria A, D’Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*. 2011 Apr 8;30(10):2044–56.

70. Spector D, Labarre J, Toledano MB. A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7011–6.

71. \AAslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(11):6161–5.

72. Zheng M. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science*. 1998 Mar 13;279(5357):1718–22.

73. Dubbs JM, Mongkolsuk S. Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria. *J Bacteriol*. 2012 Oct 15;194(20):5495–503.

74. Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):471–81.

75. Delaunay A, Isnard A-D, Toledano MB. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J*. 2000;19(19):5157–66.

76. Paulsen CE, Carroll KS. Chemical Dissection of an Essential Redox Switch in Yeast. *Chem Biol*. 2009 Feb 27;16(2):217–25.

77. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic Principles and Emerging Concepts in the

- Redox Control of Transcription Factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 15;15(8):2335–81.
78. Tanner JJ, Parsons ZD, Cummings AH, Zhou H, Gates KS. Redox Regulation of Protein Tyrosine Phosphatases: Structural and Chemical Aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jul;15(1):77–97.
79. Chiarugi P, Cirri P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci*. 2003 Sep;28(9):509–14.
80. Kato M, Iwashita T, Takeda K, Akhand AA, Liu W, Yoshihara M, et al. Ultraviolet Light Induces Redox Reaction-mediated Dimerization and Superactivation of Oncogenic Ret Tyrosine Kinases. *Mol Biol Cell*. 2000 Jan 1;11(1):93–101.
81. Rhee SG, Bae YS, Lee S-R, Kwon J. Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation Through Cysteine Oxidation. *Sci Signal*. 2000 Oct 10;2000(53):pe1.
82. Lohse DL, Denu JM, Santoro N, Dixon JE. Roles of Aspartic Acid-181 and Serine-222 in Intermediate Formation and Hydrolysis of the Mammalian Protein-Tyrosine-Phosphatase PTP1 \dagger . *Biochemistry (Mosc)*. 1997 Apr 1;36(15):4568–75.
83. Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, et al. The Inactivation Mechanism of Low Molecular Weight Phosphotyrosine-protein Phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32554–60.
84. Tanner JJ, Parsons ZD, Cummings AH, Zhou H, Gates KS. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jul 1;15(1):77–97.
85. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng T-C, Hinks JA, Tonks NK, et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*. 2003;423(6941):769–73.
86. Jeong W, Jung Y, Kim H, Park SJ, Rhee SG. Thioredoxin-related protein 14, a new member of the thioredoxin family with disulfide reductase activity: Implication in the redox regulation of TNF- α signaling. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1294–303.
87. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Sep;10(9):1527–48.
88. Roussel X. Enzymologie moléculaire d'une sulfinyl réductase, la sulfirédoxine: Caractérisation du mécanisme catalytique [Thèse de doctorat]. [France]: Université de Nancy I; 2009.
89. Kato S, Ueno T, Fukuzumi S, Watanabe Y. Catalase Reaction by Myoglobin Mutants and Native Catalase MECHANISTIC INVESTIGATION BY KINETIC ISOTOPE

EFFECT. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52376–81.

90. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jul;38(7):995–1014.

91. Ogusucu R, Rettori D, Munhoz DC, Soares Netto LE, Augusto O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med.* 2007 Feb;42(3):326–34.

92. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973 May 15;32(1):132–4.

93. Flohé L. Changing Paradigms in Thiology. *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2014 Apr 14]. p. 1–39. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910730019>

94. Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Aug 1;15(3):763–80.

95. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2009 Nov;1790(11):1486–500.

96. Hofmann B, Hecht H-J, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 2002 Apr;383(3-4):347–64.

97. Wood ZA. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science.* 2003 Apr 25;300(5619):650–3.

98. Koh CS, Didierjean C, Navrot N, Panjikar S, Mulliert G, Rouhier N, et al. Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol.* 2007 Jul 13;370(3):512–29.

99. Schlecker T, Comini MA, Melchers J, Ruppert T, Krauth-Siegel RL. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 2007 Aug 1;405(3):445–54.

100. Flohé L, Harris JR. Peroxiredoxin systems structures and functions [Internet]. New York: Springer; 2007 [cited 2014 Apr 14]. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10181989>

101. Ellis HR, Poole LB. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry (Mosc).* 1997;36(43):13349–56.

102. Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the

catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(3):795–815.

103. Hall A, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power Is Based on Transition-State Stabilization. *J Mol Biol*. 2010 Sep;402(1):194–209.

104. Roos G, Messens J. Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul;51(2):314–26.

105. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(1):32–40.

106. Rabilloud T. Proteomics Analysis of Cellular Response to Oxidative Stress. EVIDENCE FOR IN VIVO OXIDATION OF PEROXIREDOXINS AT THEIR ACTIVE SITE. *J Biol Chem*. 2002 Mar 19;277(22):19396–401.

107. Lim JC, Choi H-I, Park YS, Nam HW, Woo HA, Kwon K-S, et al. Irreversible Oxidation of the Active-site Cysteine of Peroxiredoxin to Cysteine Sulfonic Acid for Enhanced Molecular Chaperone Activity. *J Biol Chem*. 2008 Aug 20;283(43):28873–80.

108. Boileau C, Eme L, Brochier-Armanet C, Janicki A, Zhang C-C, Latifi A. A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in the reduction of the sulfenic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *New Phytol*. 2011 Sep;191(4):1108–18.

109. Koo KH, Lee S, Jeong SY, Kim ET, Kim HJ, Kim K, et al. Regulation of Thioredoxin Peroxidase Activity by C-terminal Truncation. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Jan;397(2):312–8.

110. Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 2003 Oct 30;425(6961):980–4.

111. Dietz K-J. Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 15;15(4):1129–59.

112. Moon JC, Hah Y-S, Kim WY, Jung BG, Jang HH, Lee JR, et al. Oxidative Stress-dependent Structural and Functional Switching of a Human 2-Cys Peroxiredoxin Isotype II That Enhances HeLa Cell Resistance to H₂O₂-induced Cell Death. *J Biol Chem*. 2005 Aug 5;280(31):28775–84.

113. Angelucci F, Saccoccia F, Ardini M, Boumis G, Brunori M, Di Leandro L, et al. Switching between the Alternative Structures and Functions of a 2-Cys Peroxiredoxin, by Site-Directed Mutagenesis. *J Mol Biol*. 2013 Nov;425(22):4556–68.

114. Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu M-C, Bae SH, et al. Feedback Control

of Adrenal Steroidogenesis via H₂O₂-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. *Mol Cell*. 2012 Jun 8;46(5):584–94.

115. Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, et al. Moonlighting by Different Stressors: Crystal Structure of the Chaperone Species of a 2-Cys Peroxiredoxin. *Structure*. 2012 Mar;20(3):429–39.

116. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* [Internet]. 2012 May 16 [cited 2014 Apr 17]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11088>

117. Stangherlin A, Reddy AB. Regulation of Circadian Clocks by Redox Homeostasis. *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26505–11.

118. Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, Nyström T. Life Span Extension and H₂O₂ Resistance Elicited by Caloric Restriction Require the Peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. 2011 Sep;43(5):823–33.

119. McMurray MA, Gottschling DE. An Age-Induced Switch to a Hyper-Recombinational State. *Science*. 2003 Sep 26;301(5641):1908–11.

120. Woo HA. Reversing the Inactivation of Peroxiredoxins Caused by Cysteine Sulfenic Acid Formation. *Science*. 2003 Apr 25;300(5619):653–6.

121. Chevallet M, Wagner E, Luche S, Dorsselaer A van, 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 Sep 26;278(39):37146–53.

122. Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang K-S, Chae HZ, Rhee SG. Reversible Oxidation of the Active Site Cysteine of Peroxiredoxins to Cysteine Sulfenic Acid IMMUNOBLOT DETECTION WITH ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE HYPEROXIDIZED CYSTEINE-CONTAINING SEQUENCE. *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):47361–4.

123. Chang T-S, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG. Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfenic Acid in the Active Site to Cysteine. *J Biol Chem*. 2004 Dec 3;279(49):50994–1001.

124. Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, et al. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Res*. 2006;16(3):287–96.

125. Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Poole LB, Lowther WT. Structural Basis

for the Retroreduction of Inactivated Peroxiredoxins by Human Sulfiredoxin [†] · [‡]. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Jun;44(24):8634–42.

126. Lee D-Y, Park SJ, Jeong W, Sung HJ, Oho T, Wu X, et al. Mutagenesis and Modeling of the Peroxiredoxin (Prx) Complex with the NMR Structure of ATP-Bound Human Sulfiredoxin Implicate Aspartate 187 of Prx I as the Catalytic Residue in ATP Hydrolysis [‡]. *Biochemistry (Mosc)*. 2006 Dec;45(51):15301–9.

127. Jonsson TJ, Johnson LC, Lowther WT. Protein Engineering of the Quaternary Sulfiredoxin{middle dot}Peroxiredoxin Enzyme{middle dot}Substrate Complex Reveals the Molecular Basis for Cysteine Sulfinic Acid Phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009 Oct 6;284(48):33305–10.

128. Roussel X, Kriznik A, Richard C, Rahuel-Clermont S, Branlant G. Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* Passes through an Oxidized Disulfide Sulfiredoxin Intermediate That Is Reduced by Thioredoxin. *J Biol Chem*. 2009 Sep 30;284(48):33048–55.

129. Roussel X, Boukhenouna S, Rahuel-Clermont S, Branlant G. The rate-limiting step of sulfiredoxin is associated with the transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid of overoxidized typical 2-Cys peroxiredoxins. *FEBS Lett*. 2011 Feb;585(3):574–8.

130. Bloemink M, Deacon J, Langer S, Vera C, Combs A, Leinwand L, et al. The Hypertrophic Cardiomyopathy Myosin Mutation R453C Alters ATP Binding and Hydrolysis of Human Cardiac β -Myosin. *J Biol Chem*. 2014 Feb 21;289(8):5158–67.

131. Jeong W. Molecular Mechanism of the Reduction of Cysteine Sulfinic Acid of Peroxiredoxin to Cysteine by Mammalian Sulfiredoxin. *J Biol Chem*. 2006 Feb 17;281(20):14400–7.

132. Wei Q, Jiang H, Xiao Z, Baker A, Young MR, Veenstra TD, et al. Sulfiredoxin-Peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Apr 12;108(17):7004–9.

133. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Sep;43(6):883–98.

134. Findlay VJ. A Novel Role for Human Sulfiredoxin in the Reversal of Glutathionylation. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6800–6.

135. Park JW, Mieyal JJ, Rhee SG, Chock PB. Deglutathionylation of 2-Cys Peroxiredoxin Is Specifically Catalyzed by Sulfiredoxin. *J Biol Chem*. 2009 Aug 28;284(35):23364–74.

136. Bowers RR, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD. Sulfiredoxin Redox-Sensitive Interaction with S100A4 and Non-Muscle Myosin IIA Regulates Cancer Cell Motility. *Biochemistry (Mosc)*. 2012 Oct 2;51(39):7740–54.
137. Chi YH, Kim SY, Jung IJ, Shin MR, Jung YJ, Park JH, et al. Dual functions of Arabidopsis sulfiredoxin: Acting as a redox-dependent sulfinic acid reductase and as a redox-independent nuclease enzyme. *FEBS Lett*. 2012 Sep;586(19):3493–9.
138. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*. 2004 Apr 23;304:596–600.
139. Woo HA, Bae SH, Park S, Rhee SG. Sestrin 2 is not a reductase for cysteine sulfinic acid of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(4):739–45.
140. Kuzmic P. DynaFit--a software package for enzymology. *Methods Enzymol*. 2009;467:247–80.
141. Ma L-H, Takanishi CL, Wood MJ. Molecular Mechanism of Oxidative Stress Perception by the Orp1 Protein. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31429–36.
142. Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, Paton LN, Pace PE, Hampton MB, et al. Hydroxylation of Peroxiredoxins 2 and 3 RATE CONSTANTS FOR THE REACTIONS OF THE SULFENIC ACID OF THE PEROXIDATIC CYSTEINE. *J Biol Chem*. 2013 May 17;288(20):14170–7.
143. Haynes AC, Qian J, Reisz JA, Furdai CM, Lowther WT. Molecular Basis for the Resistance of Human Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin 3 to Hydroxylation. *J Biol Chem*. 2013 Sep 3;jbc.M113.473470.
144. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003 Apr 25;300(5619):650–3.
145. Jonsson TJ, Tsang AW, Lowther WT, Furdai CM. Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *J Biol Chem*. 2008;283(34):22890–4.
146. Patai's Chemistry of Functional Groups [Internet]. [cited 2014 Sep 20]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470682531/homepage/Order.html>
147. Madhusudan, Akamine P, Xuong N-H, Taylor SS. Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nat Struct Mol Biol*. 2002 Apr;9(4):273–7.
148. Davies DR, Hol WGJ. The power of vanadate in crystallographic

investigations of phosphoryl transfer enzymes. *FEBS Lett.* 2004 Nov;577(3):315–21.

149. Jönsson TJ, Johnson LC, Lowther WT. Structure of the sulphiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. *Nature.* 2008 Jan 3;451(7174):98–101.

150. Moan NL, Clement G, Maout SL, Tacnet F, Toledano MB. The *Saccharomyces cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols CONTRASTED FUNCTIONS FOR THE THIOREDOXIN AND GLUTATHIONE PATHWAYS. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):10420–30.

151. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005 May;41(1):207–34.

152. Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem.* 1992 Jan;200(1):74–80.

153. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989 Nov 1;182(2):319–26.

Enzymologie des étapes clés de régulation du système Peroxyrédoxine / Sulfirédoxine dans le contexte de la signalisation cellulaire redox.

Les peroxyrédoxines (Prx) sont des peroxydases à thiol, ubiquitaires, qui jouent un rôle central dans la physiologie du peroxyde d'hydrogène. Une famille de Prx dite "2-Cys-Prx typique" possède une propriété unique de suroxydation de la Cys catalytique sous forme acide sulfinique, qui constitue un mécanisme de régulation des fonctions des 2-Cys-Prx typiques en tant que peroxydase, capteur de peroxyde ou protéine chaperon. La réduction des 2-Cys-Prx typiques suroxydées est catalysée par la Sulfirédoxine (Srx), une sulfinyl réductase ATP-dépendante dont la constante catalytique est de l'ordre de $1-2 \text{ min}^{-1}$, une valeur faible qui doit être corrélée au rôle de Srx dans la régulation redox. L'objectif de ce travail était d'analyser l'enzymologie de la régulation du système Prx/Srx au niveau, du processus de suroxydation des 2-Cys-Prx typiques, de l'étape limitante de la Srx, et de son recyclage par les systèmes redox cellulaires.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les deux étapes du cycle catalytique de la 2-Cys-Prx typique majeure de *S. cerevisiae* Tsa1, dont la compétition contrôle la sensibilité à la suroxydation, par une stratégie combinant cinétiques rapides, système enzymatique couplé et modélisation cinétique. Ces travaux suggèrent que cette compétition est contrôlée par une réorganisation conformationnelle au cours du cycle catalytique de la Tsa1. Dans un second temps, l'étude de la première étape du mécanisme catalytique de Srx, qui consiste en l'activation ATP-dépendante du groupement acide sulfinique de la 2 Cys-Prx a permis, i) de montrer que l'étape limitante de la réaction catalysée par Srx était associée au processus chimique de transfert de phosphate, et ii) de proposer un modèle d'assemblage du complexe Michaelien Prx/Srx/ATP formé lors de ce processus. Enfin, par une approche combinant cinétiques enzymatiques *in vitro* et génétique de la levure *in vivo*, nous avons établi que le mécanisme de recyclage des Srx à 1 Cys existant chez les plantes ou les mammifères implique le rôle du glutathion comme réducteur cellulaire, contrairement à la Srx de *S. cerevisiae* qui est recyclée par le système thiorédoxine. De façon inattendue, la spécificité du glutathion dans ce mécanisme est assurée par un événement de reconnaissance au sein du complexe Prx/Srx.

Mots clés : Sulfirédoxine, Peroxyrédoxine, acides sulfinique, régulation redox, glutathion.

Enzymology of the key steps regulating Peroxiredoxin / Sulfiredoxin system in the context of redox cell signaling.

The peroxiredoxins (Prx) are ubiquitous thiol peroxidases, which play a central role in the physiology of hydrogen peroxide. A subclass of Prx called "typical 2-Cys-Prx" has a unique property to hyperoxidize the catalytic Cys into the sulfinic acid form, which acts as a regulation mechanism of their functions, as peroxidase, peroxide sensor or protein chaperone. The reduction of the overoxidized form is catalyzed by sulfiredoxin (Srx), an ATP-dependent sulfinyl reductase whose catalytic constant is about $1-2 \text{ min}^{-1}$, a low value that must be correlated to the role of Srx in redox regulation. The aim of this study was to analyze the enzymology of the regulation of the Prx/Srx system at three different points of control: the hyper-oxidation process of typical 2-Cys-Prx, the rate-limiting step of the Srx mechanism and the recycling step of Srx by the cellular thiol redox systems.

We have first characterized the competition mechanism between the two steps of the catalytic mechanism of the major typical 2-Cys-Prx of *S. cerevisiae*, Tsa1, through a strategy combining rapid kinetics, coupled enzyme system and kinetic modelling analysis. This work suggests that the sensitivity to hyper-oxidation is controlled by a conformational reorganization during the catalytic cycle of Tsa1. Next, the study of the first step of Srx catalytic mechanism, which involves the ATP-dependent activation of the sulfinic acid form of typical 2-Cys Prx i) has shown that the rate-limiting step is associated with the chemical phosphate transfer process, and ii) provided an assembly model of the Michaelien complex Prx/Srx/ATP, formed during this process. Finally, through the combination of *in vitro* enzyme kinetics and *in vivo* yeast genetic tools, we established that the recycling mechanism of one Cys Srx, existing in plants or mammals, involves the glutathione (GSH) as reducer in cells, contrary to the Srx from *S. cerevisiae*, which is recycled by the Thioredoxin system. Unexpectedly, our study suggests that GSH binds the thiol-sulfinate complex, confirming the role of GSH as the primary reducing system of 1-Cys-Srx.

Key words : Sulfiredoxin, Peroxiredoxin, sulfinic acid, redox regulation, glutathion.