



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>



U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole doctorale Biologie Santé Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université

en Enzymologie moléculaire et Biologie structurale

par RANAIVOSON Fanomezana Moutsé

Caractérisation cristallographique d'intermédiaires réactionnels de méthionine sulfoxyde réductases en vue de la compréhension de leur mécanisme catalytique.

Les trois domaines de la protéine multifonctionnelle PilB de *Neisseria meningitidis*
et la MsrB de *Xanthomonas campestris*

Thèse dirigée par Monsieur André AUBRY et Madame Frédérique FAVIER

Soutenue le 23 Novembre 2007

Président du jury :

Monsieur Pierre MUTZENHARDT Professeur, FST, UHP Nancy-Université

Rapporteurs :

Monsieur Jean CAVARELLI Professeur, Institut de Génétique et de Biologie
Moléculaire et Cellulaire, ULP Strasbourg

Monsieur Joël JANIN Professeur, Institut de Biochimie et Biophysique
Moléculaire et Cellulaire, Université Paris-Sud

Examineurs :

Monsieur Vincent MIKOL Directeur de Recherche, Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine

Monsieur Guy BRANLANT Professeur, FST, UHP Nancy-Université

Monsieur André AUBRY Directeur de Recherche CNRS, INPL Nancy-Université

Madame Frédérique FAVIER Maître de conférences, FST, UHP Nancy-Université

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Professeur Claude Lecomte de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et de m'avoir ainsi permis de développer ces travaux dans un excellent confort de travail.

Merci sincèrement à Monsieur le Docteur André Aubry d'avoir accepté sans réserve de diriger cette thèse, et de s'être ainsi beaucoup investi pour m'aider à en venir à bout tout au long de ces trois années, y compris dans des aspects moins "professionnels".

J'adresse mes plus vifs remerciements à Messieurs les Professeurs Jean Cavarelli et Joël Janin pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci également à Monsieur le Docteur Vincent Mikol et Messieurs les Professeurs Guy Branlant et Pierre Mutzenhardt pour leur évaluation.

Je remercie également Monsieur le Professeur Guy Branlant pour l'étroite collaboration, très riche à tout point de vue, qu'il a su instaurer entre Madame le Docteur Frédérique Favier et moi-même pour la partie cristallographie, et les personnes de son équipe pour la partie biochimie et enzymologie ; j'ai nommé Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller, Messieurs les Docteurs Alexandre Olry, Mathias Antoine et Fabrice Neiers, avec qui j'ai eu de fait de nombreux échanges d'idées (et d'échantillons), sans oublier toutes les autres personnes qui, par leur travail, ont contribué à développer ce projet, comme Adeline Gand ou encore Laure Selme.

Je remercie le Ministère de la Recherche pour le financement de ces travaux de thèse dans le cadre de l'Action Concertée Incitative (ACI) BCMS047, ainsi que Monsieur le Professeur Guy Branlant pour son engagement dans l'allocation de ce financement.

Bien évidemment, je remercie avec ferveur toutes les personnes du groupe biocristallographie du LCM3B :

Frédérique Favier, qui a su guider mes pas chancelants dans le monde de la cristallographie des protéines, et ce, depuis mon DEA, déjà. Frédérique n'a pas hésité à s'investir énormément dans la supervision de toutes les étapes de cette aventure. Elle a particulièrement su s'y prendre pour me faire redescendre sur terre chaque fois que je divaguais trop, et ceci, toujours délicatement, mais fermement tout de même. (Je soupçonne très fortement Frédérique de m'avoir bien mieux cerné qu'elle ne veut bien le laisser paraître). Bref, merci, Chef ! (Allez, pour une fois...)

Claude Didierjean, notre vénéré chef de groupe, qui a déployé énormément d'énergie pour nous permettre de nous développer en tant que scientifiques, mes collègues doctorants et moi-même. J'ose espérer que, dans mon cas, ses efforts n'auront pas été complètement vains. Claude n'a pas hésité, en outre, à nous faire partager son expérience à de nombreuses reprises, et nous a ainsi permis de prendre des décisions un peu dures sur le coup pour nous autres novices, par exemple concernant les cristaux de sels ("poubelle !").

Guillermo Mulliert, sans qui, à coup sûr, j'aurais perdu au moins la moitié de mes données. Heureusement qu'il était là pour nous rappeler aussi souvent que faire se peut la phrase "faites des sauvegardes !"

Sébastien Moniot, mon compère depuis le début. "Alors, Msr ou E4PDH ? " Question fondamentale, s'il en est !

Cha San Koh, sans qui, c'est sûr, les choses n'auraient pas été pareilles. Qu'ils sont importants, les "social events" !

Hélène Dubourg, et Brice Kauffmann, même s'ils ne font plus partie du groupe, étant donné qu'ils sont devenus docteurs avant nous et qu'ils s'en sont allés vers d'autres horizons, mais qui m'ont rendu bien des services, concernant divers aspects de ces travaux (Brice, bien sûr pour m'avoir mis sur les rails de la Msr), mais également des aspects annexes.

Mikael Elias (qui, lui aussi s'en est allé vers d'autres horizons depuis peu mais pour d'autres raisons) avec qui j'ai le souvenir de certaines anecdotes mémorables ; je pense notamment à l'épisode du congrès de l'AFC de Toulouse.

Merci à Catherine Corbier (qui s'en est allée à l'IUT Nancy Brabois où elle est maintenant Madame le Professeur) pour beaucoup, beaucoup de choses, et en particulier d'avoir pris l'énorme risque de nous avoir confié le Kjeldahl, à Sébastien et moi-même.

Et bien sûr Sandrine, Dorothée, et toutes ces personnes qui n'ont fait que de brefs passages au sein du groupe, comme Marie-Laure, mais qui m'ont apporté énormément.

J'étends mes remerciements à toutes les autres personnes du laboratoire, en particulier toutes celles qui ne sont pas forcément intervenues directement au niveau du sujet, mais qui ont tout de même contribué, sur le plan technique notamment, à son bon déroulement (Alex, Manu, Fabien...) ; mais je n'oublie pas tous ceux qui ont œuvré pour les aspects administratifs ou pour maintenir une excellente ambiance dans la vie du laboratoire (très important !), notamment au niveau de la salle café : Anne, Valérie, Benoît, William, Pilar, Nicolas, Sébastien...et les autres.

Je tiens absolument à remercier ici les personnes, qui, de par leur simple présence à mes côtés, ont toute leur place dans ces lignes.

Mes frères Gnamou (et, bien évidemment Dahalia, puisqu'ils font Un maintenant), Samuel et Benjamin, même si je sais que ce n'est pas la peine de les remercier, vu l'union sacrée qui nous caractérise : ce qui arrive dans la vie de l'un d'entre nous affecte automatiquement tous les quatre. Une mention spéciale tout de même pour Gnamou, qui s'est investi pour les fautes de virgules de ces pages.

Mes parents, qui suivent attentivement tout ceci de très loin (et, de temps en temps, avec anxiété, il faut bien le dire) : j'espère mériter quelque peu la fierté qu'ils me portent.

Tous mes potes, qui ont su être patients surtout ces derniers temps, avec une mention spéciale pour Baigneur : il sait décidément s'y prendre pour réunir et garder en contact tous les anciens de l'Agro 123 dispersés de par la France – que dis-je, de par le monde !

Et, bien sûr la personne que je cite en dernier, non pas parce qu'elle est la moins importante d'entre tous, bien au contraire : celle qui, un beau jour a décidé avec moi de partager un bout de chemin, chemin qui continue à se dérouler devant nous sans qu'on en voie le bout, ma fois, et qui, je l'espère n'aura pas de bout. Je parle, bien sûr, de Verlaine, qui a su me soutenir et me supporter, malgré ma tête dure !

Je dédie ces pages à Neny

SOMMAIRE

PARTIE A : Introduction

1.	FORMATION DES ERO ET ERN, LES CIBLES BIOLOGIQUES ET LES SYSTEMES DE PROTECTION.....	5
2.	BIOLOGIE DE LA METSO ET DE LA MSR.....	31
3.	RELATION STRUCTURE-FONCTION DES MSRA ET MSRB	43
4.	LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	71

PARTIE B : Etudes structurales de la protéine PilB et d'une MsrB

SECTION I : Procédures expérimentales

1.	GENERALITES	75
2.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE N-TERMINAL DE LA PROTEINE PILB.....	80
3.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE MSRA DE LA PROTEINE PILB	87
4.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE MSRB DE LA PROTEINE PILB	96
5.	ETUDE STRUCTURALE DE LA MSRB DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS103	

SECTION II : Le domaine N-terminal de PilB

1.	DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DU DOMAINE N-TERMINAL DE PILB	109
2.	DISCUSSION : ANALYSE FONCTIONNELLE.....	121

SECTION III : Le domaine MsrA de PilB

1.	DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DE LA MSRA DE PILB	127
2.	DISCUSSION.....	137

SECTION IV : Les MsrB de PilB et de *Xanthomonas campestris*

1.	DESCRIPTION DU DOMAINE MSRB DE PILB	147
2.	DESCRIPTION DE LA MSRB DE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i>	158
3.	DISCUSSION : ANALYSE DES STRUCTURES EN REGARD DU MECANISME CATALYTIQUE	168

PARTIE C : Bilan et perspectives

1.	RELATIONS STRUCTURE-FONCTION AU SEIN DES MSR DE TYPES A ET B.....	177
2.	LA PROTÉINE PILB	184
3.	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	187

PARTIE D : Annexes

PARTIE E : Bibliographie

TABLE DES MATIERES

PARTIE A : Introduction

1.	FORMATION DES ERO ET ERN, LES CIBLES BIOLOGIQUES ET LES SYSTEMES DE PROTECTION	5
1.1.	APPARITIONS DES ERO ET ERN	5
1.1.1.	<i>Fuites au niveau de la chaîne respiratoire</i>	5
1.1.2.	<i>Diverses activités enzymatiques pro-oxydantes</i>	6
1.1.3.	<i>Réactions photochimiques ou spontanées.....</i>	9
1.1.3.1.	Production de l'oxygène singulet par photo-sensibilisation.....	9
1.1.3.2.	ERO ou ERN issus de réactions spontanées	10
1.1.4.	<i>Bilan : de la diversité dans la nature des ERO et ERN, de la diversité dans leurs réactivités.....</i>	11
1.2.	OXYDATION DES MOLECULES BIOLOGIQUES ET CONSEQUENCES	12
1.2.1.	<i>Oxydation des lipides.....</i>	14
1.2.2.	<i>Les glucides.....</i>	15
1.2.3.	<i>Les protéines.....</i>	17
1.2.4.	<i>Les acides nucléiques.....</i>	19
1.3.	LES SYSTEMES ANTI-OXYDANTS ET LES REPONSES CELLULAIRES AU STRESS OXYDANT.....	22
1.3.1.	<i>Les systèmes anti-oxydants</i>	22
1.3.1.1.	Les molécules "pièges".....	23
1.3.1.2.	Les enzymes de détoxification	23
1.3.1.3.	La préservation des composants cellulaires	24
1.3.1.4.	Les systèmes de réparation et dégradation.....	25
1.3.2.	<i>La vie cellulaire et les espèces oxydantes.....</i>	26
1.3.3.	<i>Le cas des résidus soufrés.....</i>	28
2.	BIOLOGIE DE LA METSO ET DE LA MSR.....	31
2.1.	PRESENTATION DE LA METSO ET DE L'ACTIVITE MSR	31
2.2.	EFFETS DE L'OXYDATION DES METHIONINES	33
2.2.1.	<i>Inactivation.....</i>	33
2.2.2.	<i>Anti-oxydant.....</i>	35
2.2.3.	<i>Signalisation et transduction du signal.....</i>	37
2.3.	LA MSRA ET LA MSRB	38
2.3.1.	<i>Importance physiologique.....</i>	38
2.3.1.1.	La durée de vie et le vieillissement.....	38
2.3.1.2.	Les maladies neuro-dégénératives	39
2.3.1.3.	Autres pathologies pouvant être liées au vieillissement.....	40
2.3.1.4.	Pathogénicité bactérienne	41
2.3.2.	<i>Données génomiques</i>	41
2.3.2.1.	Organisations génomiques.....	41
2.3.2.2.	Multipllicité des gènes et des produits des gènes.....	42
3.	RELATION STRUCTURE-FONCTION DES MSRA ET MSRB.....	43
3.1.	SELECTIVITE DE SUBSTRAT	43
3.2.	MÉCANISME CATALYTIQUE	44
3.3.	CLASSIFICATION	45
3.3.1.	<i>Les différentes sous-classes de MsrA.....</i>	45
3.3.2.	<i>Les différentes sous-classes de MsrB.....</i>	47
3.4.	ETUDES STRUCTURALES DE LA MSRA	49
3.4.1.	<i>La MsrA d'Escherichia coli (structure cristallographique).....</i>	49

3.4.2.	<i>La MsrA de Bos taurus</i>	52
3.4.3.	<i>La MsrA de Mycobacterium tuberculosis</i>	54
3.4.4.	<i>La MsrA de Populus trichocarpa</i>	56
3.4.5.	<i>Etude par RMN de la MsrA d'E. coli</i>	59
3.5.	ETUDE STRUCTURALE DE LA MSRB	61
3.6.	LA PROTEINE PILB DE NEISSERIA MENINGITIDIS.....	65
3.6.1.	<i>Présentation de la protéine et rôle cellulaire</i>	65
3.6.2.	<i>Le domaine N-terminal</i>	66
3.6.3.	<i>Le domaine MsrA</i>	68
3.6.4.	<i>Le domaine MsrB</i>	69
4.	LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	71

PARTIE B : Etudes structurales de la protéine PilB et d'une MsrB

SECTION I : Procédures expérimentales

1.	GENERALITES	75
1.1.	LES ECHANTILLONS PROTEIQUES	75
1.2.	LES ESSAIS DE CRISTALLISATION	76
1.3.	LES DONNEES DE DIFFRACTION	78
1.4.	LA RESOLUTION ET L'AFFINEMENT DES STRUCTURES	79
2.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE N-TERMINAL DE LA PROTEINE PILB	80
2.1.	LA FORME REDUITE	80
2.1.1.	<i>Cristallisations et collecte des données</i>	81
2.1.2.	<i>Résolution de la structure et procédure d'affinement</i>	83
2.2.	LA FORME OXYDEE	85
2.2.1.	<i>Cristallisations et collecte des données</i>	85
2.2.2.	<i>Remplacement moléculaire et procédure d'affinement</i>	86
3.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE MSRA DE LA PROTEINE PILB. 87	
3.1.	LES FORMES REDUITES ET OXYDEES	87
3.1.1.	<i>Cristaux obtenus et données de diffraction</i>	88
3.1.2.	<i>Résolution et affinement des structures</i>	89
3.2.	LE COMPLEXE AVEC LE SUBSTRAT	90
3.2.1.	<i>Cristallisations et collecte des données</i>	90
3.2.2.	<i>Remplacement moléculaire et procédure d'affinement</i>	92
3.3.	LA FORME ACIDE SULFENIQUE	93
3.3.1.	<i>Cristallisations et collecte des données</i>	93
3.3.2.	<i>Remplacement moléculaire et procédure d'affinement</i>	95
4.	ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE MSRB DE LA PROTEINE PILB. 96	
4.1.	LES FORMES REDUITES ET OXYDEES	96
4.1.1.	<i>La forme réduite</i>	96
4.1.2.	<i>La forme oxydée</i>	98
4.2.	LE COMPLEXE AVEC LE SUBSTRAT	100
4.2.1.	<i>Cristallisation et collecte des données</i>	100
4.2.2.	<i>Remplacement moléculaire et procédure d'affinement</i>	101
5.	ETUDE STRUCTURALE DE LA MSRB DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS	103

5.1.	LA FORME OXYDEE	103
5.1.1.	<i>Cristallisation et collecte des données</i>	103
5.1.2.	<i>Résolution de la structure et procédure d'affinement</i>	103
5.2.	LE COMPLEXE AVEC LE SUBSTRAT	105
5.2.1.	<i>Cristallisation et collecte des données</i>	105
5.2.2.	<i>Remplacement moléculaire et procédure d'affinement</i>	106

SECTION II : Le domaine N-terminal de PilB

1.	DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DU DOMAINE N-TERMINAL DE PILB	109
1.1.	BILAN DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	109
1.2.	LE REPLIEMENT GLOBAL.....	110
1.3.	LES VOISINS STRUCTURAUX.....	113
1.4.	LE SITE ACTIF.	117
2.	DISCUSSION : ANALYSE FONCTIONNELLE	121
2.1.	LA STRUCTURE GLOBALE ET SES VOISINS STRUCTURAUX	121
2.2.	LE SITE ACTIF ET LA REACTIVITE DES CYS67 ET CYS70.....	122
2.3.	ROLES PROBABLES DES RESIDUS ⁹⁹ FLHE ₁₀₂	124

SECTION III : Le domaine MsrA de PilB

1.	DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DE LA MSRA DE PILB	127
1.1.	BILAN DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	127
1.2.	LA FORME REDUITE DE LA MSRA DE PILB	129
1.2.1.	<i>La structure globale</i>	129
1.2.2.	<i>Le site actif</i>	130
1.3.	LE COMPLEXE MSRA-SUBSTRAT	131
1.4.	L'INTERMEDIAIRE REACTIONNEL ACIDE SULFENIQUE DE LA MSRA	133
1.5.	LA FORME OXYDEE DE LA MSRA	134
1.5.1.	<i>La structure globale</i>	134
1.5.2.	<i>Le site actif</i>	135
2.	DISCUSSION	137
2.1.	LE MECANISME CATALYTIQUE	137
2.1.1.	<i>La fixation du substrat</i>	137
2.1.2.	<i>Le déroulement de l'étape réductase</i>	139
2.1.3.	<i>La formation du pont disulfure Cys51-Cys198</i>	141
2.2.	ANALYSE CONFORMATIONNELLE	142

SECTION IV : Le domaine MsrB de PilB et la MsrB de *Xanthomonas campestris*

1.	DESCRIPTION DU DOMAINE MSRB DE PILB	147
1.1.	BILAN DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	147
1.2.	LA STRUCTURE DE LA FORME REDUITE	148
1.2.1.	<i>La structure globale</i>	148
1.2.2.	<i>Sites actifs et interactions entre monomères</i>	149
1.3.	LA STRUCTURE DU COMPLEXE AVEC LE SUBSTRAT	152
1.3.1.	<i>Structure globale et empilement cristallin</i>	152
1.3.2.	<i>Analyse de la fixation du substrat</i>	153
1.4.	LA STRUCTURE DE LA FORME OXYDEE.....	155
1.4.1.	<i>Comparaison avec la forme réduite</i>	155
1.4.2.	<i>L'espèce hétérogène présente dans le site actif</i>	156

2.	DESCRIPTION DE LA MSRB DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS	158
2.1.	BILAN DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	158
2.2.	LA STRUCTURE DU COMPLEXE AVEC LE SUBSTRAT	159
2.2.1.	<i>Le repliement global</i>	159
2.2.2.	<i>Interactions au sein du site actif.....</i>	161
2.3.	LA STRUCTURE DE LA FORME OXYDEE.....	163
2.3.1.	<i>Le repliement global et le pont disulfure</i>	163
2.3.2.	<i>Conformation du site actif comparativement à la structure du complexe MsrB-substrat</i>	166
3.	DISCUSSION : ANALYSE DES STRUCTURES EN REGARD DU MECANISME CATALYTIQUE.....	168
3.1.	LE REPLIEMENT MSRB.....	169
3.2.	INTERACTIONS ENTRE LE SUBSTRAT ET LES RESIDUS DU SITE ACTIF	170
3.3.	FORMATION DU PONT DISULFURE	173

PARTIE C : Conclusions et perspectives

1.	RELATIONS STRUCTURE-FONCTION AU SEIN DES MSR DE TYPES A ET B	177
1.1.	L'ETAPE REDUCTASE.....	178
1.2.	LE OU LES PONT(S) DISULFURE(S) INTRA-MOLECULAIRE(S)	179
1.3.	INTERVENTION DU PARTENAIRE DE RECYCLAGE DE TYPE THIOREDOXINE	181
1.4.	LES MECANISMES ALTERNATIFS	183
2.	LA PROTEINE PILB.....	184
3.	CONCLUSION GENERALE	187

PARTIE D : Annexes

Annexe 1: Publication 1
Annexe 2: Publication 2

PARTIE E : Bibliographie

Abréviations

Å	angström
AGE	(Advanced glycooxidation products) Produits finaux de glycoxydation avancée
ALE	(Advanced lipoxidation products) Produits finaux de lipoxydation avancée
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CMP	(cytochrome maturation protein) Protéine de maturation du cytochrome
DESY	(Deutsches Elektronen-Synchrotron) Synchrotron électronique allemand
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
Dom1_{PilB}	Domaine N-terminal de la protéine PilB de <i>N. meningitidis</i>
DsbE	(Disulfide bond oxidoreductase, type E) Réductase de type E des ponts disulfures
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	(European Molecular Biology Laboratory) Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire
ERC	Espèces réactives carbonylées
ERN	Espèces réactives nitrées
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESRF	(European Synchrotron Radiation Facility) Equipement européen de radiations synchrotron
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Forme oxydée du glutathion
L-Met-R-SO	L-méthionine-R-sulfoxyde
L-Met-S-SO	L-méthionine-S-sulfoxyde
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. pulmonis</i>	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
MAD	(Multi-wavelength Anomalous Diffraction) Diffraction anormale à plusieurs longueurs d'onde
MetSO	Méthionine sulfoxyde
MetSO₂	Méthionine sulfone
Msr	Méthionine sulfoxyde réductase
MsrA	L-méthionine-S-sulfoxyde réductase
MsrB	L-méthionine-R-sulfoxyde réductase
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) sous forme réduite
NOS	(nitric oxide synthase) oxyde nitrique synthase
ORF	(Open Reading Frame) Cadre de lecture ouvert
PDB	(Protein Data Bank) Banque de données des structures de protéines
PDT	(Photodynamic therapy) Thérapie photodynamique
Prx	Peroxyrédoxine
r.m.s.d.	(Root mean square deviation) Déviation quadratique moyenne de la distance
RMN	Résonance magnétique nucléaire
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAD	(Single-wavelength Anomalous Diffraction) Diffraction anormale à une longueur d'onde
SIRAS	(Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering) Remplacement isomorphe simple avec diffraction anormale
SOD	Superoxyde dismutase
TlpA	(Thioredoxin-like protein, type A) Protéine A de type thioredoxine
TRIS	N-tris(hydroxyméthyle)éthyle-2-aminométhanesulfonate
Trx	Thioredoxine
<i>X. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>

Partie A

Introduction

Les réactions d'oxydation mettant en jeu des espèces chimiques très réactives au sein des systèmes biologiques constituent un champ d'investigation qui a donné lieu à beaucoup de travaux, bien que l'énorme intérêt qu'a suscité le domaine soit relativement récent. Encore aujourd'hui, de plus en plus de résultats s'accumulent dont les portées donnent un éclairage nouveau, tant sur le fonctionnement normal des organismes que sur les mécanismes moléculaires associés à diverses pathologies. Un jalon important pour le développement de ces études se situe sans doute au moment où la communauté scientifique a acquis le fait que des radicaux libres apparaissent effectivement au sein des organismes et interagissent avec les molécules biologiques – événement associé à la caractérisation de l'activité superoxyde dismutase (SOD) (McCord et Fridovich 1969).

Aujourd'hui, la nature, la formation et la réactivité des espèces oxydantes en biologie sont de mieux en mieux caractérisées (pour revues (Pryor *et al.* 2006 ; Valko *et al.* 2007)), ainsi que l'adaptation des organismes à leur présence. Deux grandes catégories d'espèces oxydantes initiales sont définies, suivant leur nature chimique : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives nitrées (ERN). Leur apparition dans les cellules tient notamment à la présence de l'oxygène dans la biosphère et de l'utilisation de celui-ci, en particulier dans la respiration des organismes aérobies. On peut ainsi se référer à la réduction pas à pas de l'oxygène en molécule d'eau pour décrire la formation de nombreux ERO et ERN (Figure 1).

Si la chaîne respiratoire constitue effectivement un site majeur de production (ou d'initiation de la production) d'ERO et ERN *in vivo*, d'autres chaînes de réactions métaboliques ou d'autres processus physico-chimiques liés à l'environnement des organismes peuvent également donner lieu à leur apparition en tant que produits initiaux, intermédiaires, dérivés ou finaux. Les cellules sont ainsi inévitablement confrontées à la présence de ces espèces oxydantes et leur fonctionnement en est affecté. Comme tous les types de macromolécules biologiques sont susceptibles de réagir avec ces espèces, de multiples systèmes moléculaires de protection, de réparation et d'élimination ont évolué afin de garantir aux cellules un fonctionnement optimal, compte tenu de leur environnement. Dès lors, un équilibre, "une homéostasie redox", s'instaure où les effets des processus pro-oxydants sont efficacement contrecarrés par les systèmes anti-oxydants. Par ailleurs, l'adaptation des

organismes aux ERO et ERN est telle qu'ils sont intégrés dans certaines fonctionnalités biologiques : certains sont spécifiquement produits lors de certains processus comme les systèmes de défense ou de signalisation. Lorsque l'homéostasie redox est rompue en faveur d'une surproduction d'ERO ou ERN, un stress oxydant s'établit auquel l'organisme peut répondre, notamment *via* des voies spécifiques de transduction du signal. Les systèmes anti-oxydants étant moins efficaces dans les cellules vieillissantes, il en résulte que le vieillissement des organismes est souvent accompagné d'un stress oxydant chronique.

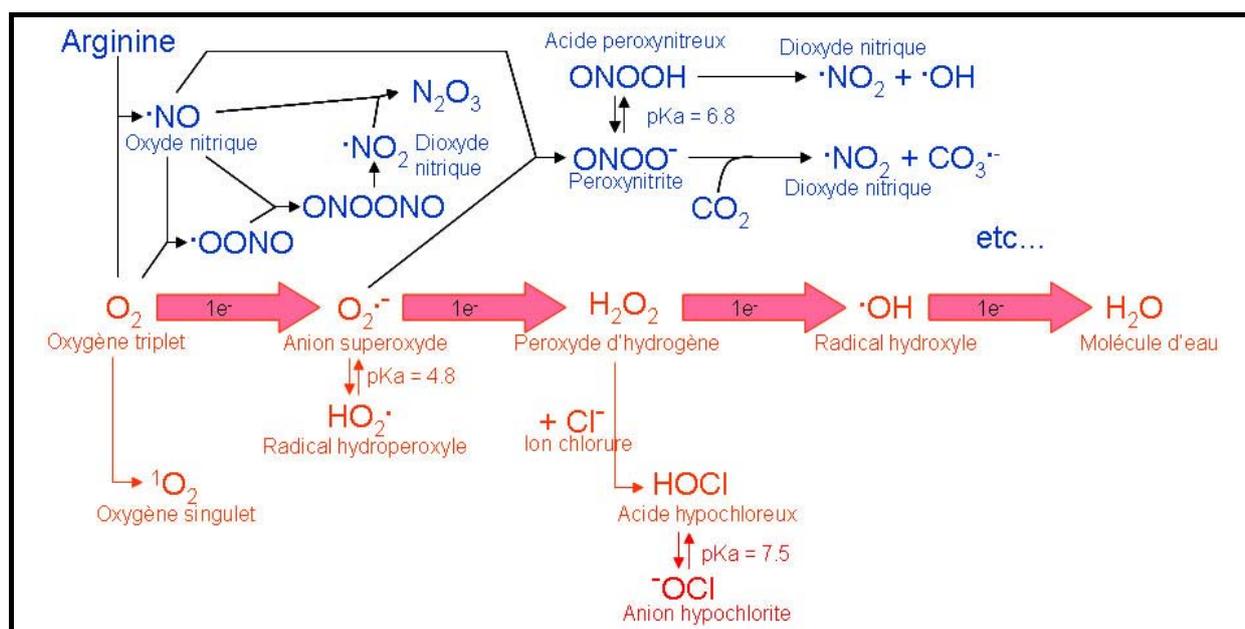


Figure 1 Formation des ERO et ERN sur la base des étapes de la réduction de O_2 en H_2O

Le travail présenté dans ces pages traite d'une activité enzymatique qui s'inscrit dans ce contexte biologique : la méthionine sulfoxyde réductase (Msr). Cet enzyme est décrit comme faisant partie des systèmes anti-oxydants, puisqu'il catalyse la réduction des résidus méthionine oxydés sur leur chaîne latérale en sulfoxyde. Il constitue ainsi une possibilité de réparation des protéines endommagées par les ERO ou ERN.

Dans la suite de cette partie introductive sera présentée l'intégration de la Msr dans le fonctionnement cellulaire en l'état actuel des connaissances, et en fonction des organismes modèles utilisés. Pour ce faire, il convient tout d'abord de décrire les mécanismes de formation et de réactivité des ERO et ERN vis-à-vis des macromolécules biologiques. Il sera alors aisé d'appréhender le fonctionnement des différents systèmes anti-oxydants et, en

particulier, d'expliquer l'importance et l'implication de la Msr dans les cellules en homéostasie redox ou en situation de stress oxydant.

Enfin, le mécanisme enzymatique, puis les structures tridimensionnelles de Msr publiées seront décrits. Cette partie introductive sera achevée avec la description de la protéine PilB de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) qui possède trois domaines dont deux manifestent une activité Msr ; une présentation notamment des données biochimiques et enzymologiques disponibles sera effectuée.

1. Formation des ERO et ERN, les cibles biologiques et les systèmes de protection

1.1. Apparitions des ERO et ERN

1.1.1. Fuites au niveau de la chaîne respiratoire

Les espèces intermédiaires de la réduction en quatre étapes de l'oxygène en molécule d'eau (Figure 1) sont susceptibles de "s'échapper" de la chaîne respiratoire, constituant ainsi autant d'apparitions possibles d'ERO au sein de la cellule. En particulier, cette chaîne de réactions est considérée comme la source cellulaire majeure du radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), notamment au niveau des complexes I et III (Muller *et al.* 2004). Les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) produits par cette voie seraient tellement réactifs qu'ils ne pourraient diffuser suffisamment loin dans la cellule pour réagir avec des cibles moléculaires critiques. A l'inverse, le radical $O_2^{\cdot-}$ n'est pas suffisamment réactif en tant que tel pour directement modifier chimiquement les macromolécules biologiques. Sa forme protonée (le radical hydroperoxyde HO_2^{\cdot}) est beaucoup plus réactive, mais au vu de la faible valeur du pKa du couple acido-basique (4.8), on estime qu'une très infime proportion seulement de ce radical est formée (environ 0.3%) dans les conditions physiologiques. $O_2^{\cdot-}$ peut ainsi diffuser dans la cellule et initier indirectement la formation d'espèces plus réactives. Un ion métallique, notamment, à proximité de cette espèce peut être réduit et, avec l'intervention d'un peroxyde d'hydrogène, conduire à la formation d'un radical hydroxyle par une réaction du type Fenton (Figure 2). Ce processus global porte le nom d'Haber-Weiss. De par sa forte réactivité, le radical hydroxyle ainsi formé peut perturber fortement les environs immédiats.

Il existe cependant une controverse sur la réalité physiologique de la catalyse métallique qui interviendrait dans la réaction d'Haber-Weiss. En effet, la réaction de transfert d'électron à partir de $O_2^{\cdot-}$ semble être trop lente pour se dérouler effectivement *in vivo* (Walling 1975) ; des donneurs d'électrons tels que l'acide ascorbique ou les groupements thiols des protéines sont plus efficaces pour réduire les ions ferriques et initier ainsi la

réaction de Fenton au sein des organismes. L'anion superoxyde n'en est pas moins cytotoxique, *via* d'autres types de réactivité, comme celui de pouvoir former le peroxy-nitrite par exemple (voir Figure 1 et paragraphe 1.1.3.2). C'est ainsi que l'une des caractéristiques des cellules vieillissantes est une altération des fonctions mitochondriales, notamment due à des dommages par oxydation du génome de cet organite (Lee *et al.* 1998).

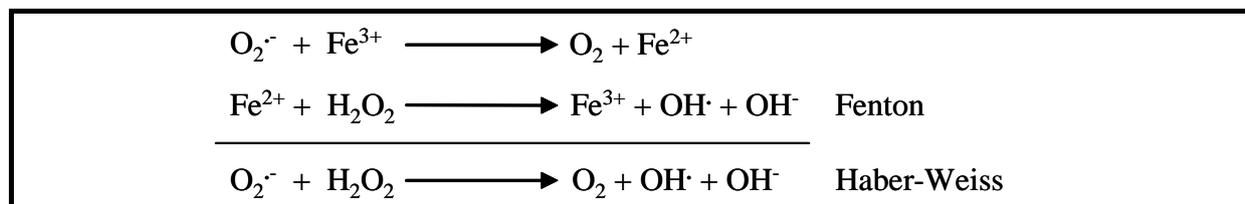


Figure 2 Formation du radical hydroxyle à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par la réaction d'Haber-Weiss, catalysée par un ion Fe^{3+} .

D'autres sites cellulaires peuvent donner lieu à la formation d'ERO et ERN d'une manière plus ou moins ponctuelle, considérant entre autres les processus autres que la respiration qui utilisent l'oxygène moléculaire. Ainsi, plusieurs activités enzymatiques catalysent la formation d'espèces oxydantes, radicalaires ou non.

1.1.2. Diverses activités enzymatiques pro-oxydantes

La prise en charge cellulaire d'ERO ou ERN peut faire apparaître de nouveaux ERO ou ERN, qui sont ainsi à considérer comme des intermédiaires dans l'élimination multi-enzymatique des espèces oxydantes, et peuvent s'accumuler. Ceci s'illustre par le cas de l'anion superoxyde. $O_2^{\cdot-}$ est le substrat de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), mais la dismutation produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nécessitant ainsi l'intervention d'une catalase pour que la détoxification soit complète (Figure 3).

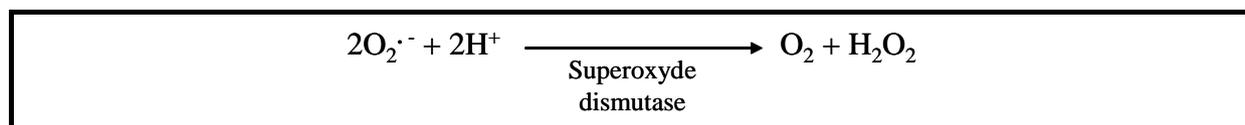


Figure 3 Dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, catalysée par la superoxyde dismutase.

Plus généralement, des formations d'ERO et ERN sont observées dans diverses réactions de détoxification ou de métabolisation. Par exemple, la xanthine oxydase, intervenant dans le catabolisme des purines, utilise l'oxygène moléculaire et forme ainsi un radical $O_2^{\cdot-}$. Il

Il y a aussi l'exemple des oxydases peroxysomales qui, lors du déroulement de leurs actions enzymatiques de métabolisation, produisent du H_2O_2 , lequel est utile, dans le cadre du rôle de l'organite, pour oxyder divers composés. On peut aussi citer l'exemple des cytochromes P450, qui ont été reportés comme sources potentielles d'ERO, notamment l'oxygène singulet (1O_2), une forme excitée, très réactive, de l'oxygène moléculaire (voir paragraphe 1.1.3.1) (Yasui *et al.* 2005).

Une stratégie de lutte contre les organismes pathogènes consiste, pour l'hôte, à produire tout un "cocktail" d'ERO et d'ERN en mettant à contribution plusieurs activités enzymatiques. Ce phénomène que les anglo-saxons dénomment "oxidative burst" ou "respiratory burst" vise donc à détruire l'organisme pathogène en le soumettant à un très fort stress oxydant. Ainsi, au sein des phagocytes activés (macrophages et neutrophiles), mais également au sein des éosinophiles, une myéloperoxydase conduit à la formation de l'acide hypochlorique (HOCl) ou hypobromique (HOBr) en présence de H_2O_2 et d'ions halogénures (Teixeira *et al.* 1999 ; Winterbourn 2002). Ces espèces sont de très puissants oxydants (HOCl est notamment rencontré dans l'eau de Javel). En outre, en réagissant avec H_2O_2 , ils peuvent conduire à la formation de 1O_2 (voir paragraphe 1.1.3.2). Les membranes des phagosomes contiennent également des NAD(P)H oxydases catalysant la production massive de radicaux $O_2^{\cdot-}$. Ces derniers vont contribuer à la production en H_2O_2 *via* l'activité SOD, mais également, ils se combinent avec des radicaux oxyde nitrique (NO^{\cdot}) – produits en grande quantité *via* une activité oxyde nitrique synthase (NOS) – pour donner le peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot}$), un autre oxydant très puissant (voir paragraphe 1.1.3.2).

L'activité NOS catalyse la formation du NO^{\cdot} à partir de la L-Arginine et de l'oxygène moléculaire, avec consommation de NADPH (Figure 4). En se condensant à d'autres espèces – radicalaires ou non – le radical NO^{\cdot} est à l'origine de nombreuses modifications chimiques, et en particulier l'apparition de nombreux ERN, comme le $ONOO^{\cdot}$ (voir Figure 1). Or, de par sa nature gazeuse, il peut diffuser très facilement. Chez les eucaryotes supérieurs, le NO^{\cdot} est utilisé non seulement dans la défense contre les organismes pathogènes mais également dans la signalisation intercellulaire ou intracellulaire. Ainsi, il est produit spécifiquement dans le système nerveux central où il agit comme neurotransmetteur, mais également dans le tissu endothélial où il intervient dans la régulation de la pression artérielle (vasodilatateur) ou encore dans la relaxation du muscle lisse du tube digestif. Enfin, NO^{\cdot} intervient au sein des cellules dans les processus apoptotiques ou anti-apoptotiques, suivant le cas (Kim *et al.* 1999).

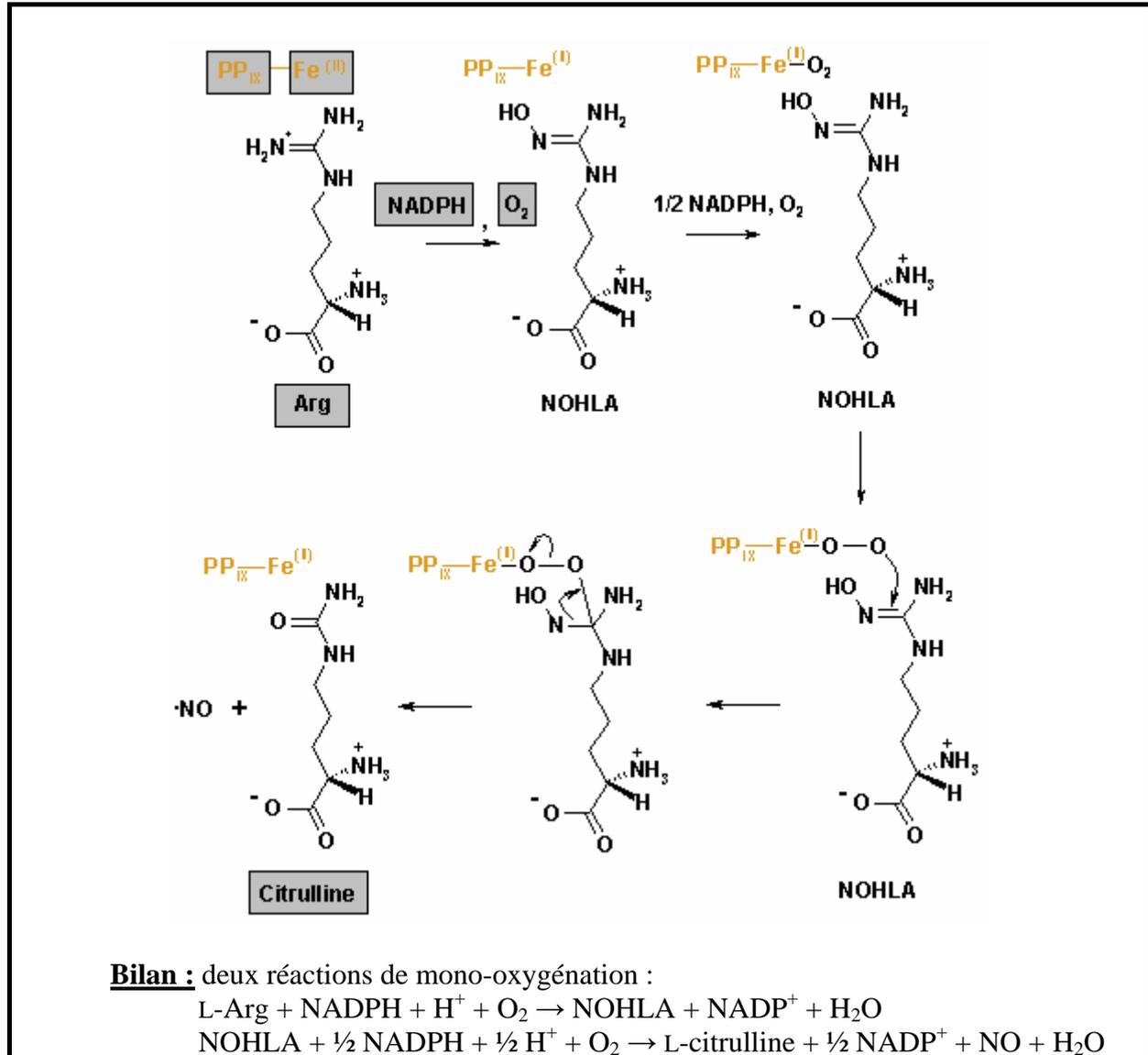
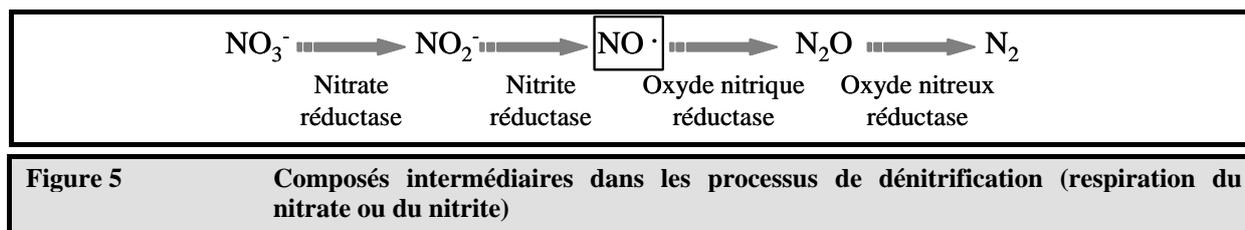


Figure 4 Mécanisme de l'activité oxyde nitrique synthase (pour revue, voir (Marletta 1993)). NOHLA : N-Hydroxyl-L-Arg ; PP_{IX} : protoporphyrine IX ; (tiré de http://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide_synthase).

En outre, on peut noter l'existence d'autres activités enzymatiques catalysant la formation du NO[•], comme par exemple la nitrite réductase des micro-organismes dénitrifiants. En effet, dans la chaîne de réactions correspondant à la respiration du nitrate ou du nitrite (Figure 5), le NO[•] apparaît comme un intermédiaire, nécessitant l'intervention d'une oxyde nitrique réductase (pour revues, (Zumft 1997 ; Tavares *et al.* 2006)).



Cependant, bien souvent, une catalyse enzymatique n'est pas nécessaire pour la formation *in vivo* des ERO et ERN : d'autres facteurs physico-chimiques, comme l'exposition à la lumière, par exemple, peuvent la favoriser. En outre la réactivité intrinsèque de ces espèces fait qu'elles peuvent évoluer spontanément vers de nouvelles espèces réactives.

1.1.3. Réactions photochimiques ou spontanées

1.1.3.1. Production de l'oxygène singlet par photosensibilisation

Un composé particulier, appelé photosensibilisant, est excité par un photon à une longueur d'onde particulière et passe de son niveau d'énergie le plus bas vers un état excité singlet. Il peut revenir directement à son état fondamental en émettant de l'énergie sous forme de chaleur ou par fluorescence, mais il peut également, par réorganisation de son état de spin électronique, transitoirement passer à un état dit triplet. Sous cette forme, il peut induire la production de divers radicaux libres, mais, surtout, il peut revenir à l'état fondamental en transférant de l'énergie à l'oxygène moléculaire, qui devient alors excité à son tour vers l'état singlet ($^1\text{O}_2$). Sous cette forme, les deux électrons π^* de l'oxygène s'apparient. La molécule passe donc d'une forme bi-radicalaire (triplet) paramagnétique à une forme non radicalaire diamagnétique ; elle devient très réactive et est considérée comme étant l'agent cytotoxique majeur produit lors du processus de photosensibilisation. Ce phénomène s'observe notamment dans les sites photosynthétiques surexposés à la lumière, le photosensibilisant étant la chlorophylle. Il constitue, dans ce cas, un des mécanismes d'inactivation du photosystème II (Durrant *et al.* 1990 ; Telfer *et al.* 1994 ; Keren *et al.* 2000). Une thérapie anticancéreuse, la thérapie photodynamique (PDT), repose sur ce principe. Après l'injection d'un photosensibilisant qui se fixe préférentiellement dans les cellules cancéreuses, la tumeur est exposée à un laser dont la longueur d'onde est adéquate pour exciter le photosensibilisant. Le but de la PDT est donc de détruire de manière ciblée les cellules tumorales en y provoquant un fort stress oxydant dû à la production massive de $^1\text{O}_2$ (pour revue, (Triesscheijn *et al.* 2006)).

1.1.3.2. ERO ou ERN issues de réactions spontanées

Les possibilités de réactions spontanées entre les ERO et ERN sont très nombreuses et contribuent à la multiplication des espèces réactives pouvant apparaître au sein des cellules. La chimie radicalaire des composés en question est notamment très largement mise à contribution dans ces processus. Un exemple a déjà été mentionné précédemment : la formation du ONOO^- par la condensation des radicaux de NO^\cdot et du $\text{O}_2^{\cdot-}$ (voir paragraphe 1.1.2). De la même manière, le peroxyxynitrate (O_2NOO^-), très réactif également, est issu de la condensation des radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ et dioxyde nitrique (NO_2^\cdot) (Figure 6).

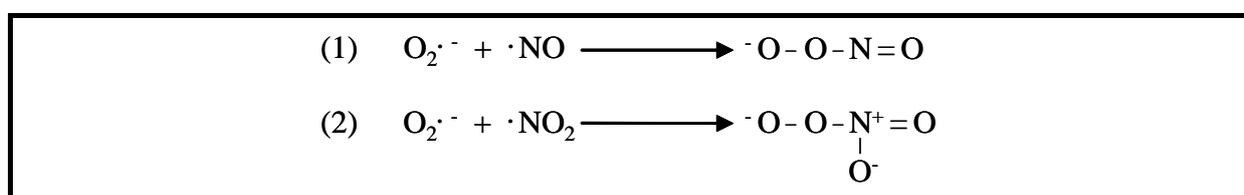


Figure 6 Formation du peroxyxynitrite (1) et du peroxyxynitrate (2) à partir de l'anion superoxyde et de l'oxyde nitrique ou du dioxyde nitrique, respectivement.

NO_2^\cdot peut être issu lui-même de plusieurs réactions spontanées successives faisant intervenir à l'origine la condensation de NO^\cdot et O_2 (voir Figure 1). Outre les différentes condensations possibles, des dissociations homolytiques sont également observées. La Figure 1 montre la dissociation de ONOONO en deux radicaux NO_2^\cdot , mais également celle de l'acide peroxyxynitrique (ONOOH) en NO_2^\cdot et OH^\cdot . Ce dernier processus est décrit comme constituant l'un des mécanismes possibles sous-jacents à la forte réactivité observée du peroxyxynitrite (via l'équilibre acido-basique $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$) (Merenyi *et al.* 2000 ; Dixon *et al.* 2002). Mais cette voie semble être cinétiquement défavorable *in vivo*, où il est connu que la présence du dioxyde de carbone accélère grandement la réactivité (Lyman et Hurst 1995 ; Denicola *et al.* 1996 ; Pryor *et al.* 2006). Le mécanisme proposé aboutit à l'apparition d'un radical carbonate ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) en plus du NO_2^\cdot (Figure 7).

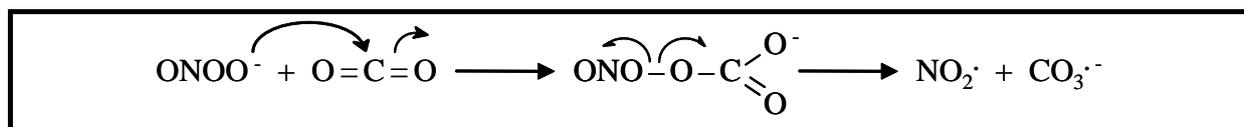


Figure 7 La forte réactivité du peroxyxynitrite en présence de dioxyde de carbone est liée à l'apparition de deux radicaux, le dioxyde nitrique et le carbonate.

Quant à O_2NOO^- , sa réactivité semblerait plutôt impliquer un mécanisme de dissociation hétérolytique, avec la production de 1O_2 et NO_2^- (Olson *et al.* 2003). On peut citer ici une autre voie de formation chimique spontanée de 1O_2 , à partir de HOCl ou HOBr, en présence de H_2O_2 (mentionnée dans le paragraphe 1.1.2) (Figure 8). Cette réaction est utilisée par les chimistes pour produire cette forme réactive de l'oxygène.



Figure 8 Formation de l'oxygène singulet à partir du peroxyde d'hydrogène et de l'acide hypochlorique.

Ainsi, les premiers ERO ou ERN apparaissant dans la cellule conduisent à la formation de nouvelles espèces réactives. Evidemment, ceci inclut également les produits de réactions avec les macromolécules biologiques. En effet, un radical libre, par exemple, en réagissant avec une molécule biologique peut y faire apparaître un site radicalaire, de fait très réactif. Mais d'autres produits de réactions comme des chloramines (produits par la réaction entre un groupement amine et HOCl), des époxydes, ou encore des carbonyles, peuvent également apporter une forte réactivité sur la molécule cible.

1.1.4. Bilan : de la diversité dans la nature des ERO et ERN, de la diversité dans leur réactivité

Les exemples traités ci-dessus visent uniquement à mettre en lumière les différentes possibilités de former des ERO ou ERN *in vivo* à partir de nombreux processus biochimiques ou physico-chimiques. C'est ainsi que chez les eucaryotes, par exemple, certains organites intracellulaires constituent des sites préférentiels pour leur production : il s'agit des mitochondries, des peroxysomes, des phagosomes ou encore des chloroplastes, notamment. L'ensemble des cas n'a pas été décrit ici :

- diverses espèces n'ont pas été mentionnées (le monoxyde de carbone, l'ozone, le sulfure d'hydrogène et d'autres radicaux libres...), pouvant être biosynthétisées ou apportées par l'environnement (pollution, médicaments, rayonnements UV ou ionisants...).
- les mécanismes de formation et de réactivité de plusieurs espèces dans le contexte physiologique ne sont pas toujours bien caractérisés à ce jour, et il n'est pas à exclure que la nature chimique même de certaines espèces réactives ne soit pas encore connue.

Il paraît évident que cette multiplicité dans la nature des ERO et ERN s'accompagne d'autant de différences entre leurs réactivités : des différences sur le plan thermodynamique (potentiels redox) mais aussi sur le plan cinétique. Dans les faits, ces différences ne sont pas forcément corrélées à leur nature radicalaire ou non. Ceci s'illustre d'une manière "extrême" par le cas de l'oxygène moléculaire : c'est un bi-radical sous son état triplet, et il est relativement inerte sous cette forme, alors que sous l'état singulet, non radicalaire, il devient extrêmement réactif. Ces différences entre les réactivités des ERO et ERN se répercutent forcément sur leurs cytotoxicités relatives. La vitesse des réactions de ces espèces, comparativement à celle de leur diffusion dans la cellule à partir de leur site de formation est notamment en cause. Ainsi, les vitesses des réactions mettant en jeu le radical OH^\cdot sont du même ordre de grandeur voire supérieures à sa vitesse de diffusion : il a donc peu de chances d'atteindre une cible critique. Comme mentionné auparavant, en comparaison, le radical O_2^\cdot peut diffuser assez loin de son site de formation et réagir seulement au contact d'une cible sensible ; il est, de ce point de vue, plus toxique que le radical OH^\cdot . Dans le même ordre d'idée, le radical NO^\cdot est très réactif, tandis que le radical NO_2^\cdot est assez peu réactif et peut donc diffuser très loin dans la cellule. Par ailleurs, la nature du groupement réagissant sur la cible est à prendre en compte, car elle est à l'origine d'une sélectivité plus ou moins prononcée dans les réactions effectivement observées en fonction de l'espèce oxydante mise en jeu. Enfin, une catalyse par un métal de transition est très souvent impliquée, à l'instar de la réaction de Fenton.

1.2. Oxydation des molécules biologiques et conséquences

Les ERO et ERN vont réagir avec divers groupements chimiques, suivant la nature de la macromolécule biologique cible. Cependant, une caractéristique commune à tous – lipides, glucides, protéines et acides nucléiques – est l'existence de chaînes carbonées (aliphatiques ou aromatiques), qui vont donc présenter une réactivité similaire vis-à-vis des espèces oxydantes. Les réactions d'oxydation sur ces sites suivent notamment un processus radicalaire (suite au départ par homolyse d'un hydrogène, par exemple) et, répondant aux mécanismes en cascade caractérisant ce type de réactions, vont affecter d'autres sites, voire d'autres molécules (Wolff et Dean 1987 ; Stadtman et Levine 2003 ; Uchida 2003 ; Evans *et al.* 2004). La Figure

schématise le déroulement de ces réactions d'une manière synthétique. Elle met en lumière les principaux radicaux qui peuvent apparaître sur la molécule cible : radicaux alkyles ($R\cdot$), peroxydes ($ROO\cdot$) et alcoyles ($RO\cdot$). Il y est également indiqué l'importance des métaux de transition dans la catalyse des transferts monoélectroniques. Enfin, ce processus contribue à fournir le milieu en de nouveaux ERO ou ERN (noté ici $XO\cdot$), et donc peut contribuer à l'établissement ou l'amplification d'un stress oxydant.

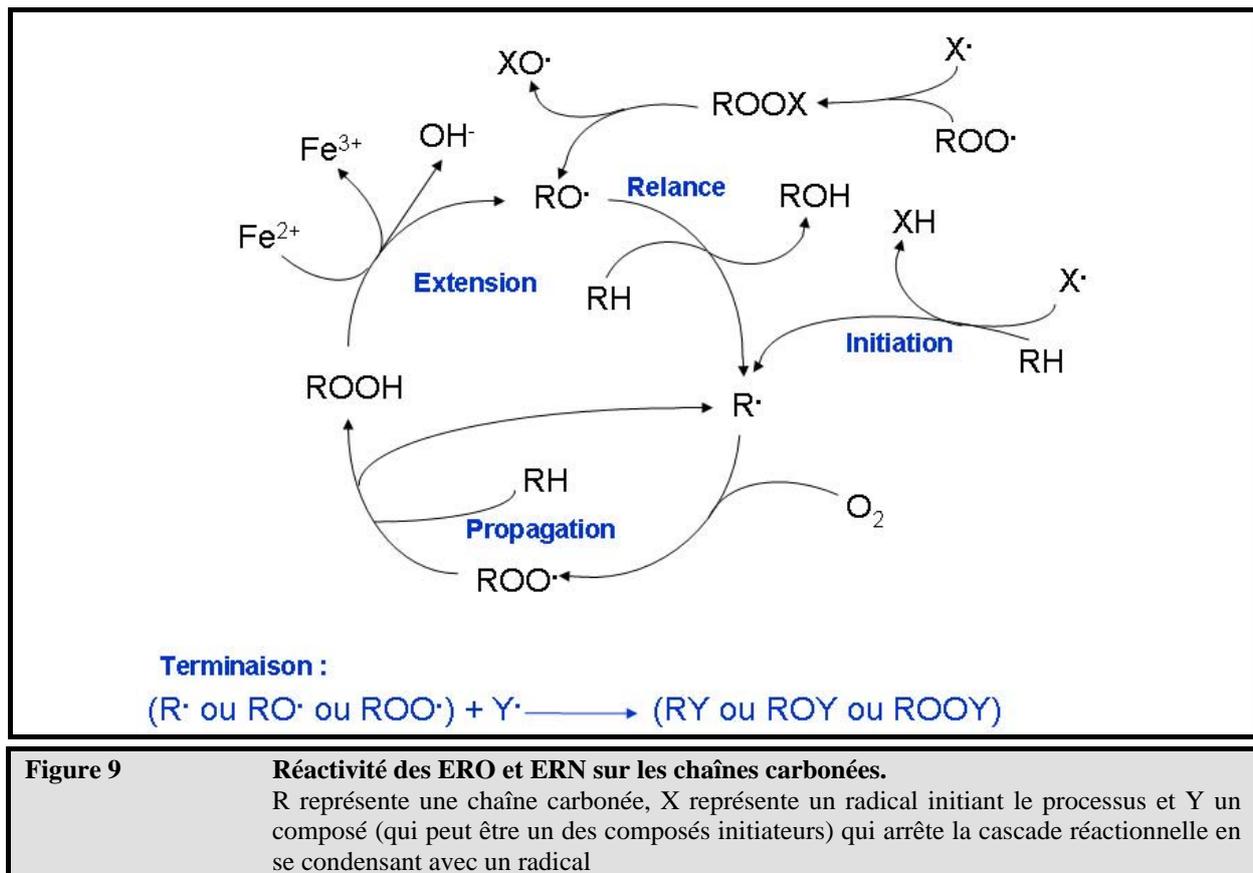


Figure 9

Réactivité des ERO et ERN sur les chaînes carbonées.

R représente une chaîne carbonée, X représente un radical initiant le processus et Y un composé (qui peut être un des composés initiateurs) qui arrête la cascade réactionnelle en se condensant avec un radical

Les radicaux intermédiaires ou les peroxydes formés ainsi peuvent évoluer suivant un mécanisme intramoléculaire qui aboutit à la rupture des chaînes carbonées qui les portent. Les liaisons rompues se retrouvent sous la forme de fonctions carbonylées. Ces dernières sont elles-mêmes souvent réactives vis-à-vis de nucléophiles divers, et vont être à l'origine de réactions ultérieures et modifier plus avant la macromolécule qui les porte ou toucher d'autres composants cellulaires. Ces fonctions carbonylées sont notamment au cœur des problématiques liées à l'oxydation des lipides et des glucides.

1.2.1. Oxydation des lipides

Les liaisons multiples sont particulièrement sensibles aux oxydations. C'est ainsi que les chaînes d'acides gras polyinsaturés ou encore les stérols sont des cibles préférentielles des ERO et ERN qui y induisent la formation de radicaux alkyles (voir Figure 9). Ces radicaux peuvent se délocaliser le long de la chaîne, s'ils apparaissent au sein de systèmes π conjugués. Des réactions radicalaires se déroulent alors dans les structures lipidiques, s'y propagent et affectent les autres composants de la structure globale, comme les protéines membranaires ou celles des lipoprotéines.

Par ailleurs, comme mentionné plus haut, l'oxydation des chaînes carbonées des lipides (appelée également peroxydation lipidique) conduit à la fragmentation de l'acide gras polyinsaturé en de plus petites molécules carbonylées, qui vont réagir covalamment avec d'autres composants contenant un groupement nucléophile. Le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) (Figure 10) sont les produits carbonylés majeurs formés à partir de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (pour revue, (Uchida 2003)). Ces carbonyles sont ainsi à l'origine de nombreux adduits ou pontages inter-moléculaires notamment sur les protéines, lesquels vont porter l'appellation d'ALE ("Advanced Lipoxidation End-products").

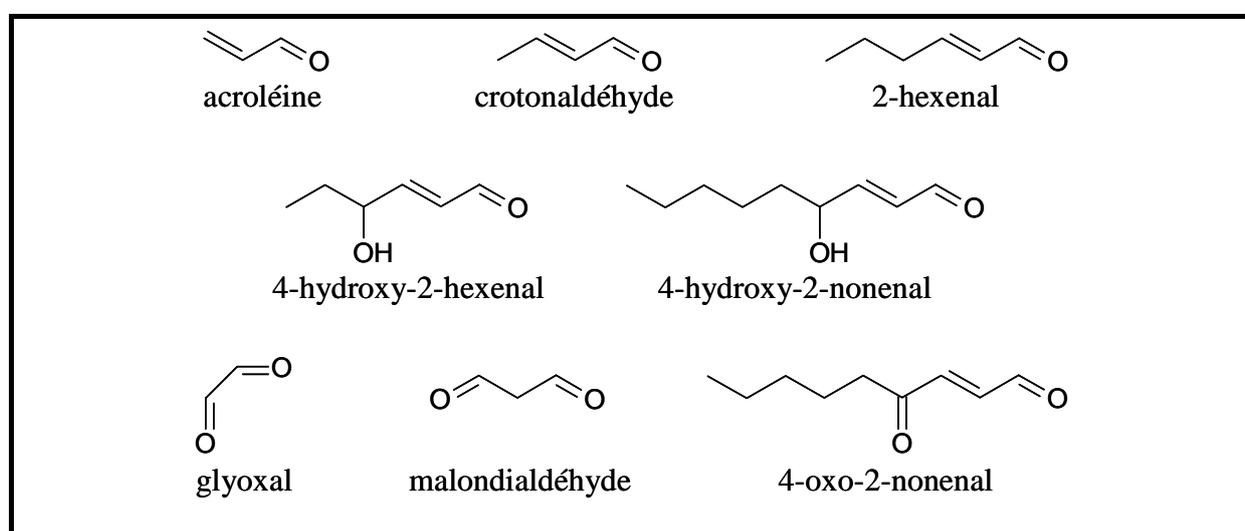


Figure 10 Carbonyles issus de la peroxydaytion lipidique (tiré de (Uchida 2003)).

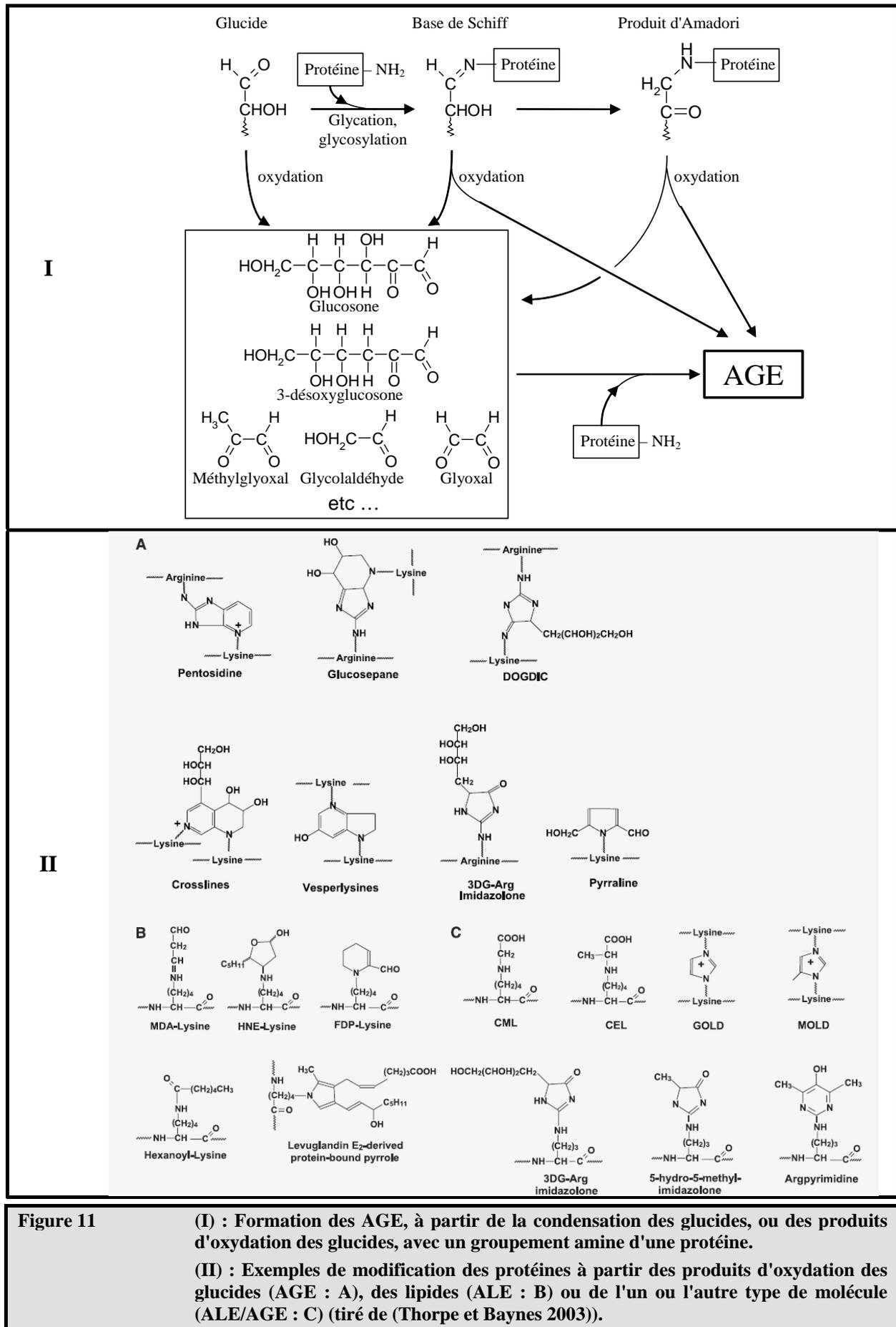
De tels composés carbonylés peuvent être également formés à partir de voies différentes. La réactivité des glucides en milieu oxydant, en particulier, donne lieu à la formation de nombreuses molécules carbonylées similaires.

1.2.2. Les glucides

De par leur fonction carbonyle intrinsèque, les glucides réducteurs peuvent réagir covalamment avec les autres molécules biologiques, sans l'intervention d'oxydants. Ces réactions sont parfois assistées par des enzymes (glycosylations), mais elles se déroulent souvent spontanément, notamment dans des situations d'hyperglycémie (glycations). En conditions oxydantes, les glucides – libres ou préalablement fixés par une macromolécule – sont fragmentés et de nouvelles fonctions carbonylées apparaissent (glycoxydations) ; les nouvelles molécules apparaissant ainsi sont par exemple le glyoxal ou le méthyl-glyoxal (Figure 11.I). Par ailleurs, le métabolisme "normal" non oxydatif (glycolyse ou autre...), en remaniant la nature chimique des glucides de départ, contribue à diversifier la nature des carbonyles réactifs.

La réaction classiquement citée impliquant une fonction carbonyle est celle de sa condensation avec un groupement amine (celle d'un résidu lysine, par exemple), conduisant à la formation d'une base de Schiff et de son tautomère cétoamine (produit d'Amadori) (pour revue, (Thorpe et Baynes 2003)). La caractérisation des produits de glycation et glycoxydation a été essentiellement faite sur les protéines (réaction de Maillard), initialement dans les études concernant le brunissement des protéines alimentaires. Pour une distinction avec les ALE issus d'une lipoxydation, les modifications apportées spécifiquement par l'oxydation des glucides sur les protéines sont regroupées sous la dénomination d'AGE ("Advanced Glycoxydation End-products"), bien que certaines structures chimiques soient identiques entre les deux catégories (Figure 11.II). Outre la lysine, d'autres chaînes latérales nucléophiles vont réagir avec les carbonyles : l'arginine, l'histidine ou encore la cystéine.

Ainsi, soit à partir de l'oxydation des lipides, soit à partir de celle des glucides, de nombreuses espèces carbonylées cytotoxiques peuvent apparaître au sein des cellules. Ceci justifie la définition d'une troisième catégorie d'espèces réactives : les ERC (Espèces Réactives Carbonylées). A titre d'illustration, deux pathologies caractéristiques, l'athérosclérose et le diabète, qui se manifestent par l'augmentation du taux plasmatique de lipides dans le premier cas et de glucides dans le second, représentent des situations comparables, quant aux conséquences, puisque dans les deux cas, les complications pathologiques sont associées à la formation d'ERC et donc à l'augmentation du taux d'ALE ou d'AGE.



D'autres voies que les deux majeures citées ci-dessus peuvent conduire à formation d'ERC, comme celle de l'oxydation de certains acides aminés, par exemple. D'un point de vue général, la présence d'un fort stress oxydant est caractérisée par la présence de nombreux AGE et/ou ALE, dont la détection sert d'indicateur de l'ampleur du stress. Le processus de vieillissement et les pathologies associées sont ainsi corrélés à une augmentation du taux de protéines modifiées covalamment, correspondant tout aussi bien à des ALE qu'à des AGE.

1.2.3. Les protéines

Outre des ALE et AGE, de nombreuses autres modifications peuvent survenir sur les protéines dans un contexte oxydant. En effet, tous les résidus d'acides aminés (chaînes latérales, comme chaîne principale) sont virtuellement sujets à oxydation (pour revue, voir (Stadtman et Levine 2003)).

Au niveau de la chaîne principale, une des modifications possibles est le départ de l'hydrogène en α sous forme de radical hydrure. En présence d'O₂, la chaîne polypeptidique entre alors dans un processus radicalaire répondant au schéma de la Figure 9. D'une manière similaire à ce qui est décrit pour les lipides et les glucides, il peut s'ensuivre alors un processus de fragmentation du polypeptide, avec formation de fonctions carbonylées. Dans ce cas, deux types de ruptures sont possibles, l'une aboutissant à un diamide et un isocyanate, et l'autre un amide et un α -céto-amide. Un clivage de la chaîne polypeptidique particulièrement au niveau du cycle pyrrolidine du résidu proline fait apparaître un pyrrolidone qui s'hydrolyse en un acide 4-amino-butirique. Enfin, l'oxydation de chaînes latérales particulières, comme celle de l'acide aspartique ou l'acide glutamique, peut mener à une rupture avec l'apparition d'un dérivé pyrulyl (Figure 12).

Au niveau des chaînes latérales, un départ d'hydrure est possible, comme dans le cas des deux résidus acides mentionnés ci-dessus, mais aussi au niveau d'autres résidus, comme ceux ayant une chaîne latérale aliphatique ou aromatique. En addition, suivant la nature de l'oxydant et celle de la chaîne latérale, divers produits d'oxydation sont rencontrés. Les résidus soufrés et aromatiques sont particulièrement sensibles aux divers oxydants. Par exemple, au niveau des noyaux aromatiques, un radical OH \cdot peut conduire à la formation de dérivés hydroxylés, dont une tyrosine (4-hydroxy-phénylalanine) à partir d'une phénylalanine, qui apparaît alors en tant que modification post-traductionnelle. Une tyrosine peut être oxydée en son dérivé 3,4-dihydroxylé (dérivé dopa). La réactivité des ERN va faire apparaître des

adduits nitrés. D'autres modifications font apparaître des carbonyles, comme dans le cas de la lysine ou celui de l'arginine, qui, suite à un départ, respectivement du groupement ammonium et guanidinium, aboutissent à des dérivés acide α -amino-adipoyique semi-aldéhyde et glutamyl semi-aldéhyde.

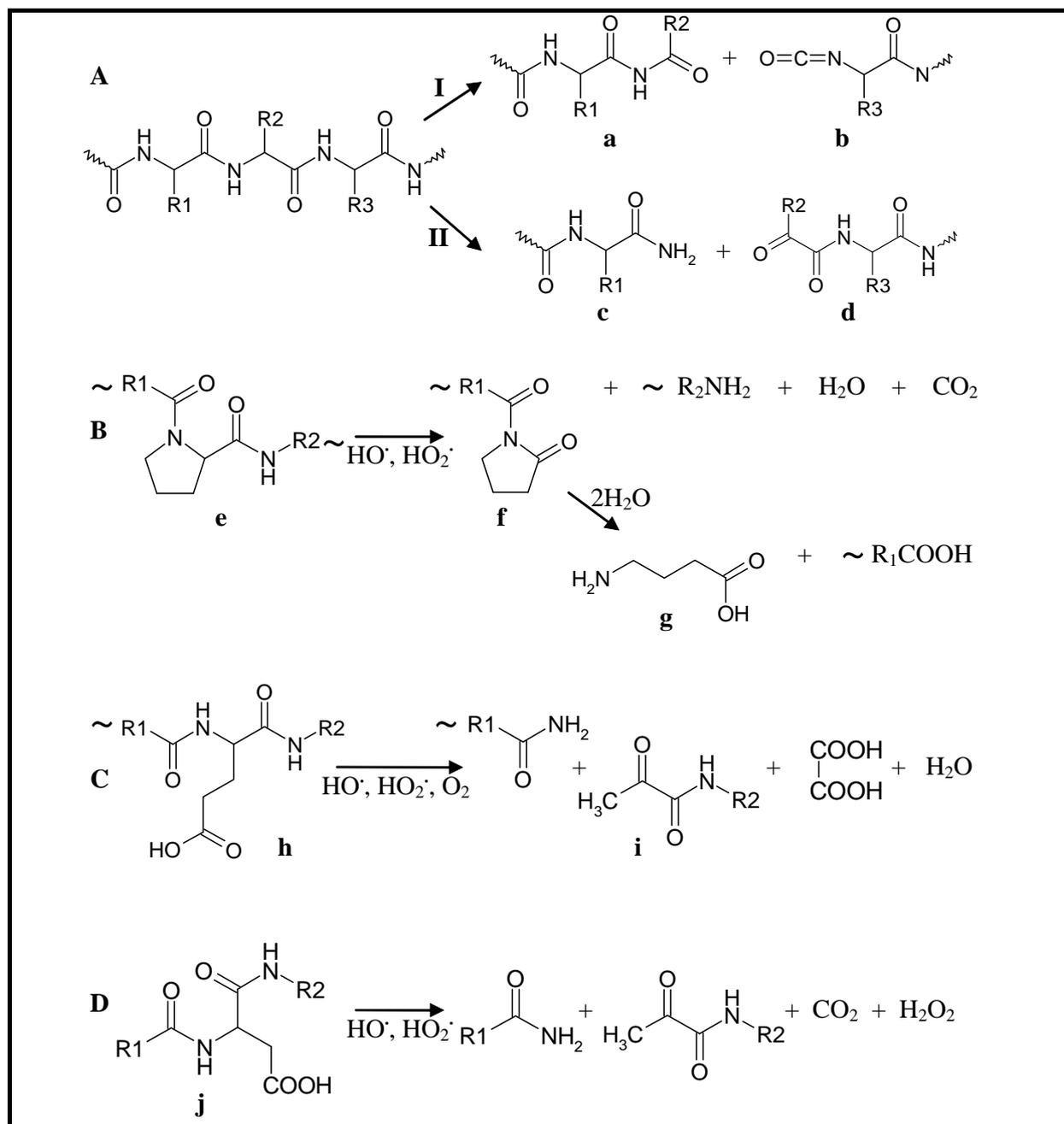


Figure 12

Clivage de la chaîne polypeptidique par le biais de radicaux libres (d'après (Stadtman et Levine 2003)).

A : Clivage par voie diamide (I) ou α -amidation (II) ; **a** : dérivé diamide; **b** : dérivé isocyanate; **c** : dérivé amide; **d** : dérivé α -céto-acyl. **B** : Clivage par oxydation des résidus prolyl; **e** : prolyl peptide; **f** : 2-pyrrolidone peptide ; **g** : acide 4-amino butyrique. **C** : Clivage par oxydation des résidus glutamyl; **h** : glutamyl peptide; **i** : pyrunyl peptide. **D** : Clivage par oxydation des résidus aspartyl; **j** : aspartyl peptide.

Le Tableau 1 reprend certains des produits majeurs des réactions d'oxydation des chaînes latérales.

Entre autres conséquences, différents produits ou intermédiaires de l'oxydation d'une protéine peuvent réagir avec les molécules voisines en effectuant des pontages intermoléculaires (illustrés dans le Tableau 1 par le pont disulfure, ou par un pontage entre tyrosines) et aboutir à des oligomérisations voire des agrégations au sein de la cellule. Ce pontage peut être le produit d'une condensation entre un carbonyle issu de l'oxydation directe des chaînes latérales et une lysine d'une autre protéine, ou encore, un pontage *via* un adduit carbonylé issu de l'oxydation des glucides ou des lipides (voir précédemment). En outre les changements conformationnels locaux induits par les différentes oxydations ayant tendance à exposer des portions hydrophobes, les protéines oxydées forment des collapsés non covalents, ce qui participe également au processus d'agrégation.

1.2.4. Les acides nucléiques

Les modifications par oxydation sur les acides nucléiques font l'objet d'une intense investigation, essentiellement sur l'ADN, notamment à cause d'une forte potentialité mutagène et carcinogène des variations de la structure chimique de cette molécule. D'un point de vue physiologique, l'étude particulière des dommages occasionnés par les ERO et ERN sur l'ADN est d'autant plus importante que les autres composants cellulaires endommagés peuvent être dirigés vers une voie de dégradation pour limiter leur cytotoxicité (voir paragraphe 1.3.1), tandis que l'intégrité de l'ADN est – et doit être – maintenue dans les cellules, au moins dans une certaine mesure, pour leur assurer un phénotype correct.

Ainsi, de très nombreux types de modifications de l'ADN dues à une oxydation ont été mis à jour, que ce soit à partir de la réactivité des bases azotées ou de celle du squelette désoxyribose (pour revue, (Evans *et al.* 2004)). Les mécanismes de formation de ces modifications ne pourront pas être tous relatés ici. A titre d'illustration, la Figure 13 reprend les produits majeurs reportés, issus de l'oxydation des bases azotées. Parmi ces composés, le 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) constitue un des biomarqueurs les plus utilisés pour évaluer et caractériser les dégâts apportés par les espèces oxydantes spécifiquement sur l'ADN.

Les mutations induites par ces différents composés peuvent avoir diverses origines moléculaires, allant d'une substitution du nucléotide endommagé par un nucléotide différent

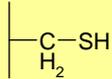
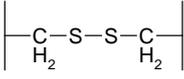
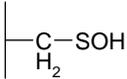
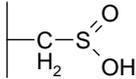
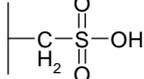
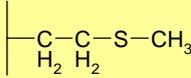
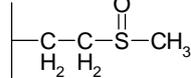
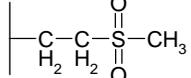
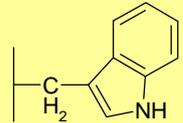
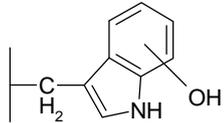
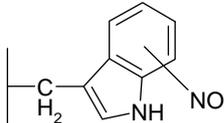
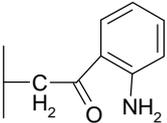
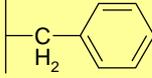
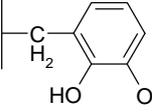
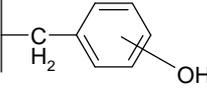
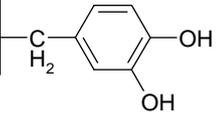
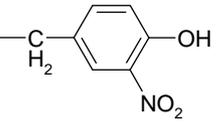
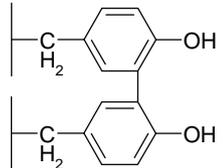
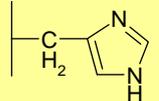
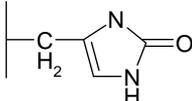
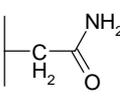
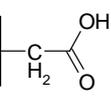
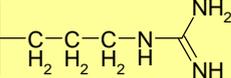
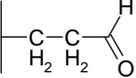
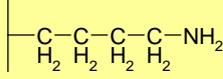
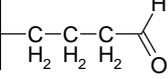
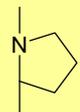
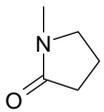
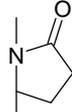
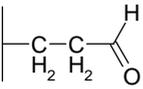
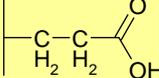
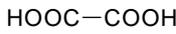
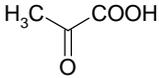
				
Cystéine	Pont disulfure	Acide sulfénique	Acide sulfinique	Acide sulfonique
				
Méthionine	Méthionine sulfoxyde	Méthionine sulfone		
				
Tryptophane	2-, 4-, 5-, 6-, ou 7-hydroxytryptophane	2-, 4-, 5-, 6-, ou 7-nitrotryptophane	Kynurénine	
				
Phénylalanine	2,3-dihydroxyphénylalanine	2-, 3-, ou 4- hydroxyphénylalanine		
				
Tyrosine	3,4-dihydroxy phénylalanine	3-nitrotyrosine	pontages entre résidus tyrosine...	
				
Histidine	2-oxohistidine	Asparagine	Acide aspartique	
				
Arginine	Acide glutamique semialdéhyde			
				
Lysine	Acide α-amino-adipique semialdéhyde			
				
Proline	2-pyrrolidone	5-oxoproline	Acide glutamique semialdéhyde	
				
Thrénine	Acide 2-amino-3-cétobutirique			
				
Acide Glutamique	Acide oxalique	Acide pyruvique		

Tableau 1 Oxydations de chaînes latérales d'acides aminés (d'après (Berlett et Stadtman 1997))

de l'original à l'incorporation d'un nucléotide différent en vis-à-vis du site endommagé lors de la réplication ; l'oxydation initiale pouvant survenir *in situ* sur l'ADN ou à partir de l'incorporation d'un nucléotide triphosphate déjà modifié. L'induction de mutations sur des sites adjacents à celui endommagé est également observée. Les types de mutation et leur persistance vont varier en fonction de la nature de la modification mais également des systèmes enzymatiques impliqués dans la réplication ou la réparation du site endommagé. Dans le cas du 8-OH-Gua, par exemple, l'oxydation *in situ* d'une guanine aboutit en sa substitution en thymine (substitution G→T), mais du 8-OH-dGTP peut être incorporé en face d'une adénine, lequel, à terme est alors substitué en cytosine (substitution A→C) (Cheng *et al.* 1992). Il a été montré avec des cellules de mammifères que les paires 8-OH-Gua:C (à partir des substitutions A→C) sont bien mieux réparées que les paires 8-OH-Gua:A (donnant les substitutions G→T) (Le Page *et al.* 1998 ; Dherin *et al.* 1999). Enfin, dans une expérience utilisant un oligonucléotide simple brin, l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli* (*E. coli*) aboutit à l'incorporation de mauvais nucléotides, non seulement en vis-à-vis du 8-OH-Gua, mais également en vis-à-vis des bases pyrimidiques adjacents (Kuchino *et al.* 1987).

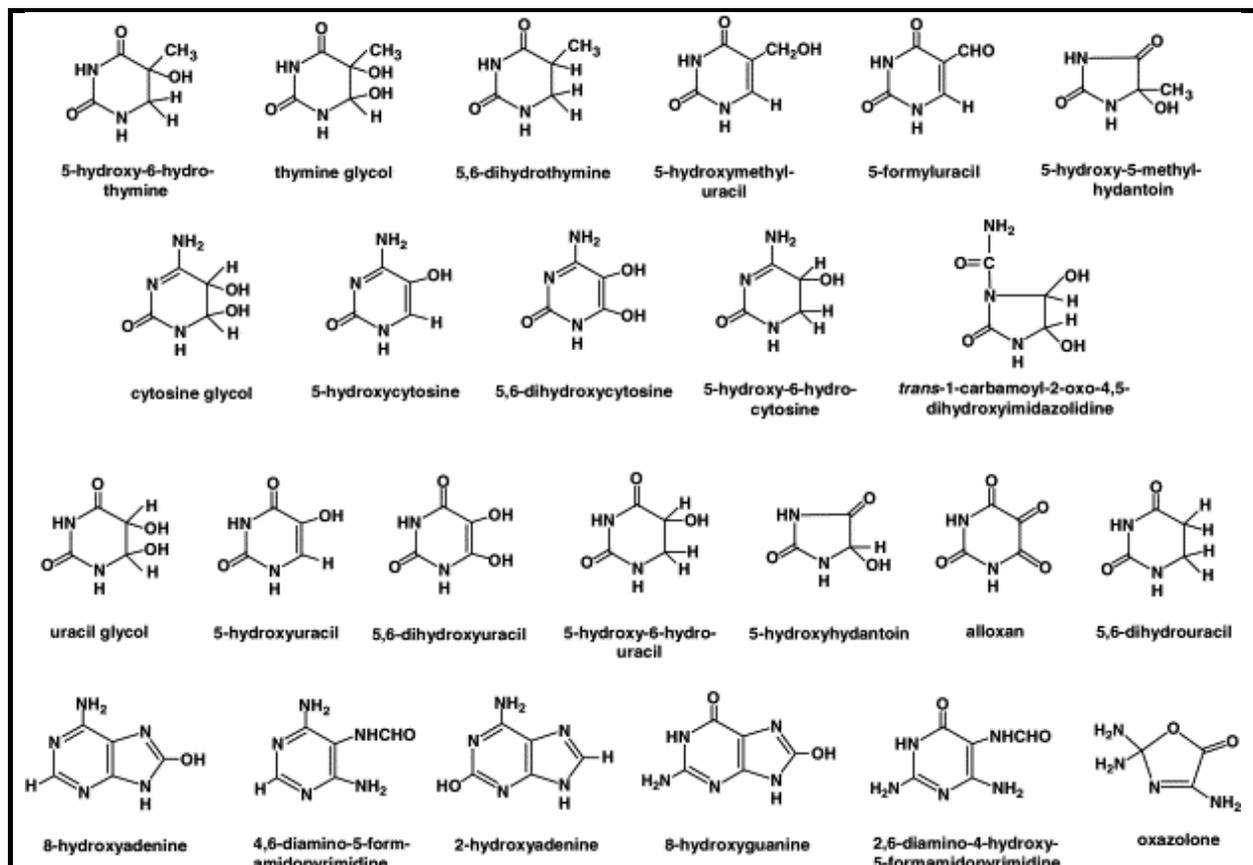


Figure 13

Produits majeurs d'oxydation des bases puriques et pyrimidiques (tiré de (Evans *et al.* 2004)).

Cette mutagénicité des lésions de l'ADN par oxydation peut se répercuter dans les processus de formation des cancers. En effet, plusieurs des composés cancérigènes connus induisent des oxydations sur l'ADN (Floyd 1990). C'est ainsi que des études cliniques et épidémiologiques attribuent un rôle aux espèces oxydantes dans l'induction des cancers (Guyton et Kensler 1993). Dans plusieurs exemples de tumeurs, une corrélation nette entre l'oxydation de l'ADN (révélé notamment par le taux de 8-OH-Gua) et l'initiation et la promotion des tumeurs est clairement établie. *In vivo*, des transversions GC→TA dans l'oncogène *ras* (Bos 1988) et le gène suppresseur de tumeurs *p53* dans les cancers du poumon et du foie (Takahashi *et al.* 1989 ; Hsu *et al.* 1991) sont reportées comme indiquant une possible oxydation initiale de ces sites en 8-OH-Gua. Cependant, outre sa tendance à provoquer des mutations, l'oxydation de l'ADN en tant que cause d'un processus de carcinogénèse reste à être clairement établie.

Par ailleurs, une oxydation de l'ADN n'est pas systématiquement associée à une carcinogénèse ; d'autres pathologies associées à la présence d'un stress oxydant voient également une augmentation du taux d'oxydation des molécules d'ADN. Le vieillissement, les infections ou inflammations, les maladies neurodégénératives, les maladies cardio-vasculaires ou encore l'ischémie/reperfusion après une transplantation sont autant de situations qui voient le taux d'oxydation de l'ADN des cellules augmenter.

Ainsi, la réactivité des ERO et ERN sur les composants cellulaires fait apparaître de nombreuses modifications, de nature à perturber la fonction des différentes molécules cibles. Aussi, au sein des cellules se trouvent des systèmes de protection contre ces espèces oxydantes, dont la complexité et l'efficacité sont à la mesure de celles des ERO et ERN.

1.3. Les systèmes anti-oxydants et les réponses cellulaires au stress oxydant

1.3.1. Les systèmes anti-oxydants

Le terme "anti-oxydant" est employé ici pour désigner l'ensemble des processus cellulaires contribuant à lutter contre les ERO et les ERN, mais également contre leurs effets sur les fonctions biologiques des macromolécules. Plusieurs mécanismes sont ainsi déployés.

Ce paragraphe présente ces divers processus, et sont relevés quelques exemples de molécules y intervenant, sans toutefois entrer dans les détails des mécanismes employés.

1.3.1.1. Les molécules "pièges"

Des composés divers réagissent directement avec les ERO et les ERN, servant ainsi de "piège" pour ces espèces oxydantes, et limitant leur réactivité sur des sites sensibles des macromolécules biologiques. Ces composés peuvent être de petites molécules d'origine exogène comme les vitamines C ou E, ou d'origine endogène comme le glutathion (voir paragraphe 1.3.3). Pour illustration, la Figure 14 montre la vitamine C (acide ascorbique) et son oxydo-réduction par deux transferts mono-électroniques : des électrons qui peuvent provenir d'un radical libre, par exemple.

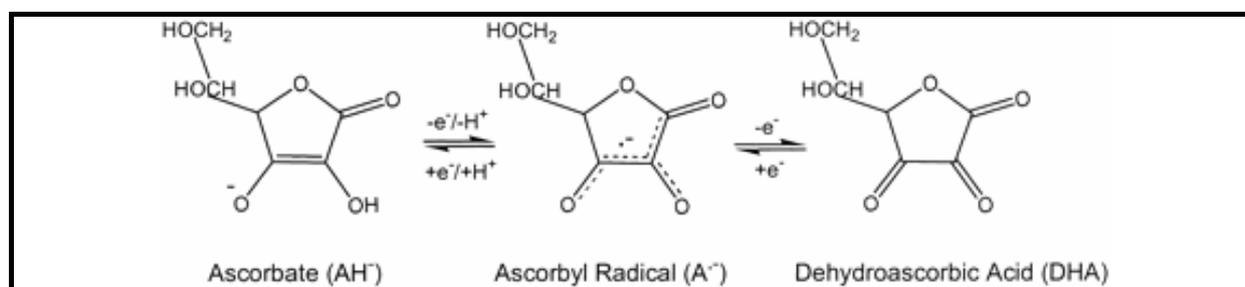


Figure 14 Oxydo-réduction de l'acide ascorbique (vitamine C).

Parmi les macromolécules, celles possédant un groupement chimique aisément oxydable contribuent à diminuer le taux d'ERO et ERN et vont donc être intégrées parmi ces molécules servant de piège, dès lors que l'oxydation en question ne porte pas à conséquence sur la fonction cellulaire. Au niveau des protéines, la chaîne latérale des acides aminés soufrés peut ainsi jouer un tel rôle. Ce rempart contre les ERO et les ERN apporté par les résidus cystéine et méthionine est d'autant plus efficace qu'ils sont continuellement régénérés par des systèmes enzymatiques spécifiques (du moins certaines de leurs formes d'oxydation) (voir paragraphe 1.3.3 pour la cystéine et paragraphe 2 pour la méthionine).

1.3.1.2. Les enzymes de détoxification

Des systèmes enzymatiques ont pour rôle de détoxifier, soit directement les espèces oxydantes, soit leurs premiers produits de réactions avec les macromolécules. Ces enzymes sont bien connus et de nombreuses formes ont été caractérisées. Le cas du couple catalase-SOD a déjà été mentionné dans le paragraphe 1.1.2, dans le cadre de la détoxification de $O_2^{\cdot -}$ en

H_2O_2 puis en H_2O . Ces deux enzymes sont aujourd'hui bien caractérisés (pour revues, voir (Mates *et al.* 1999 ; Landis et Tower 2005)). L'activité SOD utilise un ion métallique dans sa catalyse. Ce métal peut être le Cu^{2+} , le Zn^{2+} , le Mn^{2+} , le Fe^{3+} ou le Ni^{2+} , apportés aux organismes sous forme d'oligo-éléments. La catalase est l'un des enzymes catalysant la réduction des groupements peroxydes – hautement réactifs notamment lors des phases d'"extension" des processus radicalaires en présence d'oxygène (voir Figure 9) – en hydroxyles : les peroxydases (EC 1.11.1). En regard de la multiplicité des peroxydes possibles, une grande variété fonctionnelle est rencontrée concernant ces enzymes, que ce soit en terme de spécificité du substrat, de mécanisme utilisé pour catalyser la réduction du peroxyde ou encore de la nature et du mode d'action du donneur d'électrons. Certaines d'entre elles, comme la catalase, sont des hémoprotéines et utilisent ainsi un ion métallique dans leur mécanisme catalytique. D'autres utilisent, à la place, un résidu sélénocystéine (comme le glutathion peroxydase des mammifères) ou un résidu cystéine catalytique (comme dans le cas des peroxyredoxines). Du glutathion est utilisé par certaines comme donneur d'électrons, et d'autres utilisent du NADH ou encore du NADPH ; cet électron transite parfois par une flavine du type FAD fixée par la protéine.

Plusieurs autres activités enzymatiques participent à la détoxification des ERO et ERN ou de leurs produits réactifs, ou encore des composés divers qui initient leur formation. On peut ainsi considérer les enzymes de métabolisation des xénobiotiques au sens large, comme les cytochromes P450 ou les glutathion S-transférases comme faisant partie de cette catégorie. Les aldéhyde déshydrogénases vont, quant à elles, limiter la toxicité des ERC, en catalysant la conversion des carbonyles en carboxyles.

1.3.1.3. La préservation des composants cellulaires

Il a été plusieurs fois mentionné auparavant que les ions métalliques tels que le Fe^{3+} favorisent la réactivité des ERO et ERN, et peuvent ainsi promouvoir l'instauration d'un stress oxydant. Aussi, au-delà d'une certaine quantité de ces ions circulant au sein des organismes, ils deviennent extrêmement cytotoxiques. Différents mécanismes sont déployés au sein des organismes pour maintenir le taux de ces composés circulant au minimum. La ferritine, par exemple, est une protéine dont le rôle est de fixer et de stocker le fer disponible, limitant ainsi sa toxicité tout en permettant sa disponibilité pour les besoins de l'organisme.

Des systèmes moléculaires interviennent, quant à eux, en protégeant les composants cellulaires quand le taux d'ERO et/ou d'ERN vient à augmenter. L'un d'entre eux est

représenté par les protéines chaperons ou d'autres comme les protéines disulfures isomérases, qui jouent un rôle dans la préservation des repliements des protéines dans un contexte oxydant. En effet, le rôle de ces protéines est d'accompagner le repliement de certains polypeptides naissants ou en cours d'adressage vers un compartiment particulier, mais ils jouent également un rôle dans le maintien du repliement des protéines matures. Une forte induction de leur expression est observée lors de situations de divers stress (pour revue, voir (Pirkkala *et al.* 2001)), en particulier un choc thermique, d'où leur regroupement sous l'appellation de "Hsp" ("Heat shock protein").

1.3.1.4. Les systèmes de réparation et dégradation

Un autre mode de protection de la cellule contre les effets des ERO et ERN est la prise en charge des macromolécules oxydées vers une voie de dégradation ou de réparation. En effet, outre leur propre réactivité éventuellement acquise lors des premières réactions avec les espèces oxydantes, les différentes modifications des macromolécules biologiques peuvent apporter des dérégulations des fonctions cellulaires. Au niveau des protéines, cela peut être une activation permanente d'une fonction qui peut perturber le fonctionnement d'un type cellulaire donné, ou bien une oligomérisation aboutissant à une agrégation et un dépôt au sein de la cellule, qui peut être néfaste pour son intégrité (voir paragraphe 1.2.3). Au niveau de l'ADN, l'effet est évidemment une perturbation de l'expression génétique et de son contrôle, notamment due à l'induction de mutations (paragraphe 1.2.4).

Des systèmes de dégradation performants existent au sein des cellules, dont certains sont particulièrement affins des molécules endommagées par oxydation. Par exemple, le protéasome 20 S, contrairement au protéasome 26 S plutôt dirigé vers la dégradation des protéines marquées par ubiquitinylation, reconnaît les portions hydrophobes des protéines exposées suite à leur oxydation (Davies 2001 ; Shringarpure *et al.* 2003) ; il est ainsi considéré comme une voie de dégradation particulièrement adaptée pour ce type de dommage (Friguet 2006 ; Jung *et al.* 2007). D'autres systèmes protéolytiques sont également mis à contribution pour dégrader les protéines oxydées, comme la protéase Lon dépendant de l'ATP dans les mitochondries (Wang *et al.* 1993). La performance de ces systèmes de dégradation des protéines oxydées trouve cependant ses limites, quand le niveau d'oxydation est trop élevé, avec la mise en place d'oligomérisations et d'agrégations ; la protéine devient alors inhibitrice de l'activité protéolytique (Friguet *et al.* 1994 ; Friguet et Szweda 1997).

Un processus de réparation des oxydations sur les protéines n'est à considérer que dans le cas des résidus soufrés (paragraphe 1.3.3). En revanche, comme indiqué dans le paragraphe 1.2.4, la réparation des dommages sur l'ADN est cruciale pour la vie cellulaire. Les deux grands mécanismes essentiellement utilisés par les cellules pour réparer la molécule d'ADN oxydée sont le mécanisme par excision de base (BER : "Base Excision Repair") et un autre, plus complexe, qui fait appel à l'excision de nucléotides appelé NER ("Nucleotide Excision Repair"). Ce sont des systèmes multi-enzymatiques intervenant séquentiellement en mettant en jeu d'abord des protéines chargées de reconnaître et d'ôter les zones endommagées, et d'autres qui remplacent ces zones par des portions saines. Le système BER est celui classiquement cité pour intervenir sur les modifications dues à une oxydation. Il fait intervenir une glycosylase pour ôter la base modifiée, en faisant ainsi apparaître un site abasique. Ce dernier est alors reconnu et enlevé par des activités lyase et endonucléase, et le brin d'ADN est resynthétisé *via* une polymérase et une ligase. En fonction des enzymes intervenant, seul le nucléotide modifié est ainsi remplacé, ou bien plusieurs le sont simultanément (entre 2 et 6) (Fortini *et al.* 1999). Le système NER est présenté comme celui intervenant dans les modifications d'envergure de l'ADN, comme les dimères de thymine ou les pontages avec de grosses molécules. Il peut également intervenir en reconnaissant des fragments présentant de multiples dommages par oxydation. Il fonctionne en ôtant un fragment entier du brin endommagé, suivi d'une resynthèse utilisant le brin sain comme matrice.

1.3.2. La vie cellulaire et les espèces oxydantes

L'adaptation des organismes à l'existence des ERO et ERN est telle que ces espèces sont intégrées dans le fonctionnement des cellules, notamment en milieu aérobie. Elles interviennent particulièrement dans les processus de protection et de signalisation. Parmi les effets des ERO et ERN détaillés auparavant, un exemple illustrant un rôle dans la protection des organismes est la poussée oxydante ("oxidative burst") dans les sites d'inflammation (paragraphe 1.1.2). Un autre exemple illustrant leur implication dans la signalisation est celui du NO[•] pour le contrôle de la pression artérielle et en tant que neuromédiateur (paragraphe 1.1.2). Les ERO et ERN sont ainsi produites et utilisées au niveau cellulaire, du moins certaines d'entre elles, et parfois dans des situations particulières.

Or, pour qu'elle soit viable, la cellule nécessite de maintenir un état et un environnement redox précisément contrôlé de ses constituants. Il y a donc une dualité entre

les processus pro-oxydants et les mécanismes anti-oxydants. C'est ainsi que différentes voies de régulation métaboliques ou biochimiques, mais également certaines contrôlant l'expression génétique sont sensibles aux variations redox du milieu intracellulaire, permettant à la cellule de faire évoluer sa physiologie d'une situation homéostatique vers une situation de stress quand le taux d'ERO et/ou d'ERN augmente. Les espèces oxydantes agissent alors comme des messagers secondaires dans les processus de régulation. La réponse aux grandes quantités d'espèces oxydantes est une direction de la cellule vers une apoptose, sachant que des dégâts dus aux ERO et/ou ERN trop importants conduisent à une mort cellulaire non contrôlée, c'est à dire une nécrose.

Ainsi, des gènes exprimant des protéines anti-oxydantes sont sous le contrôle de facteurs sensibles aux variations redox. Les modèles les plus simples sont retrouvés chez les procaryotes : le facteur de transcription OxyR d'*E. coli* est ainsi activé par une oxydation, ce qui le rend capable de se fixer sur l'ADN et de permettre le recrutement de l'ARN polymérase. OxyR contrôle notamment l'expression de *katG* (une peroxydase), de *gorZ* (une glutathion réductase) et de *oxyS* (un petit ARN non transcrit impliqué dans la réparation du génome oxydé). Chez *E. coli*, également, SoxR s'oxyde et est ainsi activé, induisant l'expression de SoxS, lequel induit à son tour l'expression de plusieurs protéines anti-oxydantes, dont des enzymes impliqués dans la réparation de l'ADN, comme l'endonucléase produit du gène *nfo* et une SOD produit du gène *sodA*. Chez les eucaryotes, on peut citer l'exemple du facteur Yap1 de *Saccharomyces cerevisiae*, homologue au facteur procaryotique OxyR, en induisant l'expression de plusieurs protéines anti-oxydantes. Dans ce cas, le senseur du signal oxydant serait la peroxydase Gpx3, dont une cystéine s'oxyde en acide sulfénique, oxydant à son tour Yap1 en y induisant la formation de pont disulfure intra-moléculaire : c'est sous cette forme que ce facteur de transcription est activé (Delaunay *et al.* 2002). Chez les mammifères, les réponses cellulaires au stress oxydant sont plus complexes, et font intervenir des voies de régulation génétiques diverses : par exemple les gènes sous la dépendance du facteur Nf-κB (notamment les gènes impliqués dans la réponse inflammatoires), du facteur AP-1 (les gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire) et du facteur p53 (les gènes impliqués dans le cycle cellulaire). Bien d'autres facteurs régulant l'expression génétique sont sensibles aux variations redox (pour revues, voir (Lander 1997 ; Fedoroff 2006)). L'implication de ces facteurs met de nouveau en lumière un rôle des ERO dans le fonctionnement des organismes, éloigné du cadre du stress oxydant (un aspect déjà illustré auparavant par le cas de NO[•]). En effet, les ERO et ERN interviennent dans la signalisation mise en jeu dans divers processus biologiques, comme dans la détection des variations du

taux d'O₂, la régulation de l'adhésion cellulaire, ou encore dans la régulation des réponses immunitaires (pour revue, voir (Valko *et al.* 2007)).

De nouveau dans le cadre d'une réponse cellulaire à un stress oxydant, une réaction à un stimulus impliquant une régulation génétique demande un certain délai avant de se mettre en place, or la viabilité cellulaire nécessite souvent une réponse immédiate aux variations brusques de l'environnement. Parmi les éléments cellulaires agissant dans une réponse rapide (ou immédiate) à un stress oxydant se retrouvent certaines protéines chaperons (voir paragraphe précédent). Par exemple, chez les procaryotes, la protéine Hsp33 est activée *via* une dimérisation provoquée par une oxydation (Vijayalakshmi *et al.* 2001). Chez les eucaryotes, la protéine Hsp70 est activée par oxydation en se condensant avec une molécule de glutathion (Hoppe *et al.* 2004 ; Shelton *et al.* 2005).

1.3.3. Le cas des résidus soufrés

Les résidus soufrés (cystéine et méthionine) représentent les seules oxydations des protéines réversibles relevées *in vivo*. De plus, étant facilement oxydables, ils sont retrouvés au premier plan dans les modifications dues aux oxydoréductions. La conséquence de cela est que plusieurs activités protéiques sont basées sur le cycle d'oxydation et réduction de ces résidus. En particulier, ils constituent des acteurs majeurs dans la détection, la protection et la réponse aux variations redox au sein de la cellule.

Une des oxydations de la cystéine – certainement la plus fréquemment rencontrée – est évidemment le pont disulfure, résultant d'une condensation des deux groupements thiols, avec un départ de deux électrons. Très largement répandue, cette oxydation peut constituer un élément structural indispensable, ou être au centre d'une activité catalytique ou biochimique nécessitant des échanges d'électrons. L'exemple le plus apparent d'une protéine portant une telle activité est sans doute celui de la thiorédoxine (Trx), dont le rôle est de catalyser la réduction d'autres ponts disulfures au sein de la cellule. Des cofacteurs comme le glutathion (GSH), ont également une fonction basée sur l'oxydation du résidu cystéine sous forme de pont disulfure (GSSG dans le cas cité). Le GSH est largement répandu au sein des cellules (plusieurs millimolaires) et y agit comme un tampon redox, ce qui se révèle par un rôle de piège efficace contre les ERO et ERN (voir paragraphe 1.3.1.1). C'est ainsi que les conditions redox au sein d'une cellule (désignées également sous le terme de "potentiel redox cellulaire") sont évaluées en regard du rapport entre la quantité du GSH et celle du GSSG. Son

importance dans le cadre de la lutte contre les effets des ERO et ERN est multiple : outre son rôle de piège, il est un cofacteur essentiel de plusieurs enzymes de détoxification, comme la glutathion peroxydase ou la glutathion S-transférase et il réagit avec les formes oxydées d'autres composés anti-oxydants comme les vitamines C et E, en les régénérant.

Depuis le début des années 90 environ, un autre produit d'oxydation du résidu cystéine a retenu l'attention des biochimistes : l'acide sulfénique (-SOH). En effet, bien que cette fonction chimique soit relativement instable, il est aujourd'hui bien établi que cette oxydation intervient au niveau de plusieurs fonctions protéiques (pour revue, voir (Claiborne *et al.* 1999)). Ci-dessous sont proposés quelques exemples illustrant la variété des processus biologiques impliquant ce produit d'oxydation.

L'acide sulfénique peut apparaître au sein d'un mécanisme catalytique en tant qu'intermédiaire réactionnel. On peut citer l'exemple des peroxyrédoxines (Prx), des peroxydases utilisant un résidu cystéine (voir paragraphe 1.3.1.2) réagissant par attaque nucléophile sur un oxygène du substrat. La régénération de l'intermédiaire acide sulfénique passe par une attaque nucléophile par un deuxième résidu cystéine appartenant à un second monomère (Prx à 2 cystéines dites typiques, formant des homodimères) ou à la même molécule (Prx à 2 cystéines dites atypiques), formant ainsi un pont disulfure, lequel est réduit, dans un deuxième temps, par la Trx. Une troisième classe de Prx ne contient qu'un résidu cystéine, celui qui forme l'acide sulfénique. Le mécanisme de régénération n'est pas clairement établi dans ce cas (pour revue, voir (Rhee *et al.* 2005)).

Cette oxydation est également retrouvée dans des mécanismes de régulation cellulaire et de transduction du signal véhiculées par les espèces oxydantes (voir paragraphe précédent). L'exemple de l'oxydation d'une cystéine de Gpx3 en tant que senseur du signal oxydant pour l'activation du facteur de transcription Yap1 a été déjà mentionné dans le paragraphe 1.3.2. Une oxydation directe d'un résidu cystéine en un acide sulfénique a été relevée chez d'autres facteurs de transcription. Par exemple, pour un des modèles proposés pour l'activation du facteur de transcription procaryotique OxyR, le résidu cystéine identifié comme important dans le rôle de senseur (Cys199) se voit oxydé en acide sulfénique (Kim *et al.* 2002). D'autres types de régulateurs de l'expression génétique voient leur fonction modulée *via* l'apparition de l'acide sulfénique, comme le répresseur bactérien OhrR (Fuangthong et Helmann 2002 ; Panmanee *et al.* 2006), qui, une fois oxydé, se dissocie de la région génomique dont il empêche l'expression, et permet ainsi la production des protéines en réponse à un stress oxydant.

Des états d'oxydation supplémentaires peuvent également survenir sur le résidu cystéine : l'acide sulfinique (-SO₂H) et l'acide sulfonique (-SO₃H) (voir Tableau 1 page 20). Ces deux oxydations étaient considérées irréversibles, jusqu'à récemment dans le cas de l'acide sulfinique, qui a été montré réductible grâce à l'activité sulfirédoxine, avec l'utilisation de l'ATP (Biteau *et al.* 2003). Cette activité ayant été révélée avec une Prx "suroxydée" (dont la cystéine catalytique est passée de -SOH à -SO₂H) inactive, cette dernière est alors considérée comme un interrupteur dans un processus de régulation cellulaire sous la dépendance des espèces oxydantes : en conditions normales, la quantité de H₂O₂ est maintenue au minimum par l'activité Prx, tandis qu'avec une forte augmentation de H₂O₂, l'activité Prx se voit inactivée par suroxydation, et l'excès de H₂O₂ peut jouer son rôle de messenger secondaire pour provoquer une réponse cellulaire au stress oxydant. Quant à l'acide sulfonique, une réversion possible de l'état d'oxydation *in vivo* n'a pas, au jour d'aujourd'hui, été mise en évidence.

Le groupement thioéther du résidu méthionine est aussi aisément oxydable, mais les intérêts portés sur les aspects physiologiques de cette oxydation sont plus récents que dans le cas du résidu cystéine. Deux états d'oxydation sont à considérer : la méthionine sulfoxyde (MetSO) et la méthionine sulfone (MetSO₂). Si aucune réversion de la MetSO₂ n'est constatée *in vivo*, la MetSO est réductible au sein des cellules grâce à l'activité méthionine sulfoxyde réductase (Msr). Aussi, comme dans le cas du pont disulfure ou de l'acide sulfénique pour la cystéine, le cycle d'oxydation/réduction du résidu méthionine peut être intégré au sein de fonctions protéiques ou être associé à leur modulation. La suite de ce manuscrit sera consacrée à l'activité Msr. Il est à noter que, comme dans le cas des Prx, l'activité utilise également la chimie de l'acide sulfénique, constituant un exemple supplémentaire sur l'importance de ce groupement chimique en biologie.

2. Biologie de la MetSO et de la Msr

2.1. Présentation de la MetSO et de l'activité Msr

La chaîne latérale thioéther du résidu méthionine est plutôt flexible et hydrophobe ; c'est ainsi que ce résidu est en général retrouvé enfoui au cœur des protéines repliées. Sous l'oxydation en sulfoxyde (MetSO), cette chaîne latérale devient plus rigide et polaire et aura tendance à s'exposer au solvant. Dans le détail, on observe un remaniement important des propriétés électrostatiques de cette chaîne latérale. Dans la fonction thioéther, l'atome de soufre est plutôt chargé négativement et les groupements méthyle et méthylène qui y sont rattachés portent une charge partielle positive. Dans la fonction sulfoxyde, la situation est inversée puisque l'oxygène fixé apporte un déficit électronique important sur le soufre, qui par là même porte une charge partielle positive. En fait, la fonction sulfoxyde peut être décrite comme un équilibre de résonance du type $S=O \leftrightarrow S^+-O^-$, avec une tendance nette à adopter la forme chargée. En effet les caractères ioniques très prononcés des deux liaisons σ et π entre l'atome d'oxygène et l'atome de soufre entraînent, dans ce cas, un déficit électronique exacerbé au niveau du soufre (Reed et Schleyer 1990 ; Cioslowski et Mixon 1993 ; Dobado *et al.* 1999), d'autant plus si le sulfoxyde est dans un environnement où son atome d'oxygène est impliqué dans des liaisons hydrogène en tant qu'accepteur, ou dans un environnement où il se trouve protoné.

Au sein des protéines, il en résulte des possibilités d'interactions différentes, qui peuvent conduire à des modifications conformationnelles locales. C'est ainsi que des portions hydrophobes enfouies avec un résidu méthionine peuvent s'exposer au solvant une fois ce résidu oxydé, ce qui peut diriger la protéine vers une dégradation par le protéasome 20 S (voir paragraphe 1.3.1.4). Effectivement une plus grande susceptibilité de la calmoduline à une telle dégradation une fois ses résidus méthionine oxydés a été mise en évidence, bien que les auteurs n'aient pas observé une corrélation avec la surface hydrophobe exposée, mais plutôt avec une diminution du taux de structures secondaires (Ferrington *et al.* 2001). Récemment, parmi les neuf résidus méthionine de la calmoduline, le résidu essentiellement impliqué dans cet adressage a été identifié en position 145 (Sacksteder *et al.* 2006).

Par ailleurs, la géométrie du sulfoxyde est tétraédrique, et la présence de l'oxygène introduit une asymétrie dans le cas de la chaîne latérale du résidu MetSO. Ainsi deux stéréoisomères existent, *R* ou *S*, suivant la configuration du soufre (Figure 15). Deux classes d'enzymes ont évolué, chacune spécifique de l'un des deux diastéréoisomères possibles : les *L*-Met-*S*-SO réductases (MsrA) et les *L*-Met-*R*-SO réductases (MsrB).

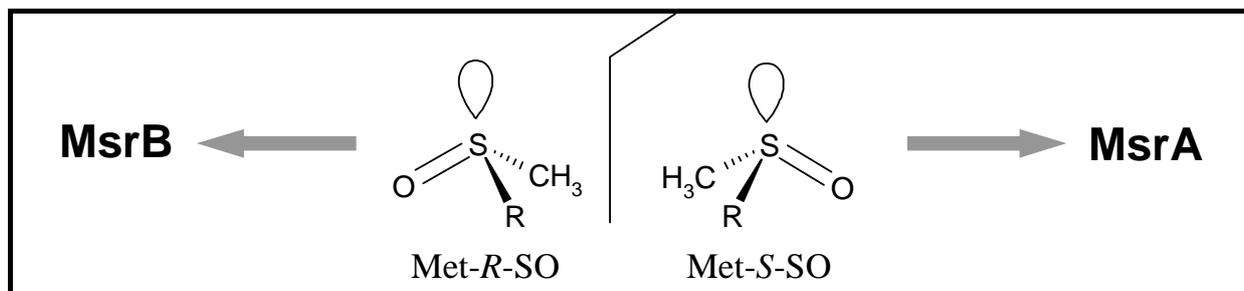


Figure 15 Formules semi-développées des deux diastéréoisomères de la méthionine sulfoxyde, mettant en évidence la configuration *R* ou *S* de l'atome de soufre. Chacun est réduit spécifiquement par l'une des deux classes de méthionine sulfoxyde réductases.

La MsrA et la MsrB ne sont apparentées ni en terme de séquence, ni en terme de structure. Les deux classes d'enzyme ont évolué d'une manière convergente, jusqu'à une similarité dans le mécanisme catalytique (voir paragraphe 3.2).

La MsrA a été la première caractérisée, par Brot et collaborateurs : ils avaient isolé chez *E. coli* une activité enzymatique capable de catalyser la réduction de résidus MetSO de la protéine ribosomique L12 et de la Met-enképhaline (Brot *et al.* 1981). En 1999, Sharov et collaborateurs ont mis en évidence la stéréospécificité de la MsrA de boeuf vis-à-vis de l'isomère *S*-sulfoxyde des résidus méthionine oxydés de la calmoduline (Sharov *et al.* 1999). Cette diastéréospécificité a ensuite été rapidement confirmée avec les enzymes de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *N. meningitidis* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Moskovitz *et al.* 2000 ; Moskovitz *et al.* 2002 ; Olry *et al.* 2002). La mise en évidence de la MsrB, quant à elle, est relativement récente : Grimaud et collaborateurs ont révélé l'activité Msr du produit du gène *yeaA* d'*E. coli*, qui, une fois additionné à la MsrA, permettait d'observer une réduction complète des résidus MetSO de la calmoduline (Grimaud *et al.* 2001). L'année suivante, plusieurs articles ont été publiés confirmant la stéréospécificité des MsrB de la souris, la drosophile, *S. aureus* et *N. meningitidis* vis-à-vis du stéréoisomère *R*-sulfoxyde, (Kryukov *et al.* 2002 ; Kumar *et al.* 2002 ; Lowther *et al.* 2002 ; Moskovitz *et al.* 2002 ; Olry *et al.* 2002). Pour démontrer la stéréospécificité de chaque enzyme, les auteurs cités ci-dessus le mettaient dans une solution contenant soit un mélange Met-*R,S*-SO, soit

uniquement du Met-*R*-SO ou du Met-*S*-SO. La MsrA réduit complètement le Met-*S*-SO, et est inactive dans la solution de Met-*R*-SO. L'inverse est observé pour la MsrB et seulement 50 % du mélange Met-*R,S*-SO est réduit par chaque enzyme.

Les gènes *msr* sont présents chez presque tous les organismes vivants. A partir des déductions faites par Mushegian et Koonin sur les très petits génomes de *Haemophilus influenzae* et de *Mycoplasma genitalium* dont les deux gènes *msrA* et *msrB* font partie, ils peuvent être considérés comme faisant partie des gènes nécessaires et suffisants pour permettre la vie cellulaire (Mushegian et Koonin 1996). Seuls quelques parasites et hyperthermophiles ne contiendraient pas le gène *msrB* (Kryukov *et al.* 2002).

Si les premiers travaux avaient déjà révélé que les Msr peuvent catalyser la réduction des résidus MetSO intégrés dans une protéine mais également celle de l'acide aminé libre, il s'est avéré que les deux classes d'enzymes sont plus efficaces sur des résidus pris dans des liaisons peptidiques. En particulier, les caractéristiques cinétiques de la MsrB semblent indiquer que l'acide aminé *R*-sulfoxyde libre n'est pas réduit *in vivo* (Olry *et al.* 2002).

Divers effets de l'oxydation des résidus méthionine sur l'activité protéique ou sur le fonctionnement cellulaire voire sur celui des organismes ont été relatés. De plus, l'importance physiologique de la Msr est de mieux en mieux documentée, particulièrement dans le processus de vieillissement et les pathologies associées, mais aussi dans le contexte de la pathogénicité de certains micro-organismes.

2.2. Effets de l'oxydation des méthionines

2.2.1. Inactivation

Il y a aujourd'hui un nombre très important de protéines dont on a montré l'inactivation suite à l'oxydation de résidus méthionine et dont l'activité est restaurée par la présence de la Msr. Depuis plus d'une dizaine d'années, un certain nombre a été ainsi révélé, illustrant la diversité des fonctions qui peuvent être inhibées (pour revue, voir (Vogt 1995)). Les quatre exemples ci-dessous illustrent la variabilité des types de fonctions protéiques mises en cause.

La protéine ribosomique L12 – qui avait servi de substrat lors de la première caractérisation de la MsrA – perd sa capacité à s'associer avec les autres composants de la sous-unité 50S, quand un ou plusieurs de ses trois résidus Met est oxydé. Ceci est certainement dû à une perte de sa capacité à dimériser pour donner la protéine L7 et à

interagir avec la protéine L10 (Caldwell *et al.* 1978). Sa fonction est rétablie en présence de la Msr, effet notamment observable grâce à la restauration d'une capacité à être acétylée (Brot *et al.* 1981).

L' α 1-antitrypsine n'est plus capable d'inhiber l'élastase quand ses résidus Met351 ou 358 sont oxydés, fait qui pourrait contribuer à l'installation d'un emphysème pulmonaire chez les fumeurs, par exemple, puisque cela peut provoquer une dégradation continue des protéines de la matrice pulmonaire (Morrison *et al.* 1986 ; Taggart *et al.* 2000).

La protéine chaperon GroEL d'*E. coli* est inactivée quand elle est soumise à l'action d'oxydants, en particulier HOCl. La MsrA/B de *Shewanella* utilisée par les auteurs permet de retrouver 60 % d'activité, révélant que l'essentiel de l'inactivation est dû à l'oxydation de résidus méthionine. Cette inactivation provient notamment d'une perturbation de l'état d'oligomérisation : la protéine active est un dimère d'heptamères, et l'oxydation de ses méthionines (ou du moins certaines d'entre elles) tend à la rendre monomérique. En particulier, les deux résidus méthionine 111 et 114 sont impliqués dans l'interface entre les deux heptamères, et leur oxydation pourrait perturber leur association (Khor *et al.* 2004).

Une intervention de l'activité Msr sur une cible *in vivo* a été récemment mise à jour, sur la protéine Ffh d'*E. coli* (Ezraty *et al.* 2004). Cette protéine, essentielle pour la survie cellulaire, est un composant de la particule SRP, laquelle intervient dans l'adressage des protéines excrétées, en rendant efficace leur intégration dans la membrane interne. Ffh fixe un ARN 4.5S, association sans laquelle elle est instable et est rapidement dégradée *in vivo*. Dans un premier temps, les auteurs ont démontré *in vitro* que Ffh est effectivement un substrat de la MsrA et la MsrB, une fois oxydée sur ses résidus méthionine. Cette oxydation aboutit à une incapacité de la protéine à se lier à l'ARN 4.5S – fonction restaurée par la MsrA et la MsrB. Ensuite, ils ont observé qu'une souche dont les gènes *msrA* et *msrB* sont défectueux présente une dégradation rapide de la Ffh, et qu'une telle mutation semble contraindre la cellule à augmenter son niveau d'expression du gène *ffh*. Enfin, ils ont démontré avec un gène rapporteur que les mutations des deux gènes *msr* compromettent l'adressage du produit du gène vers la membrane interne, à moins de permettre une surproduction de la protéine Ffh. Il est à noter que l'apport en *trans* uniquement de la MsrA ou de la MsrB suffit à retrouver un phénotype d'adressage similaire à celui du sauvage.

2.2.2. Anti-oxydant

D'un côté l'oxydation aisée des résidus Met et de l'autre l'existence de l'activité Msr permettent de considérer le résidu méthionine comme un piège contre les ERO et ERN particulièrement efficace. Il réagirait préférentiellement avec ces derniers et, comme il est recyclé *via* l'activité Msr, il contribuerait à la diminution du taux intra-cellulaire des espèces oxydantes.

Un tel rôle est fortement suggéré *in vivo* par l'expérience de Moskovitz et collaborateurs sur des souris mutantes déficientes en MsrA (Moskovitz *et al.* 2001). Comparativement aux organismes sauvages, ces souris présentaient des dégâts sévères d'oxydation quand elles étaient soumises à une hyperoxie ; dégâts notamment révélés par l'augmentation massive du taux de protéines carbonylées dans divers tissus.

Au sein d'une protéine, cette action anti-oxydante peut se manifester localement, c'est à dire qu'elle pourrait constituer une protection des résidus situés à proximité contre l'action des espèces oxydantes. Cette hypothèse est proposée notamment par Levine et collaborateurs dans leurs études de la glutamine synthétase (Levine *et al.* 1996). Huit des seize résidus Met se positionnent en surface. Une oxydation en conditions douces (H₂O₂) de ces résidus en sulfoxyde a peu d'effet sur l'activité de l'enzyme, mais leur positionnement dans les voisinages du site actif pourrait en faire un rempart, qui, en réagissant au premier plan avec les ERO et ERN, protégerait les résidus du site actif, et donc l'enzyme contre une inactivation par oxydation.

Un autre exemple illustrant cette action anti-oxydante a été relaté récemment : celui de l' α -synucléine, qui contient quatre résidus Met aisément oxydables (Zhu *et al.* 2006). Le rôle physiologique exact de cette protéine n'est pas connu, mais le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson s'accompagne d'une accumulation d'une forme agrégée dans le cytoplasme, des neurones dopaminergiques, en particulier. Par ailleurs, l' α -synucléine peut s'intégrer aux membranes, lesquelles sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés dans les cellules neuronales. Un taux important d' α -synucléine est notamment présent dans les membranes des vésicules présynaptiques des neurones dopaminergiques. En utilisant des petites vésicules unilamellaires (SUV), Zhu et collaborateurs ont démontré que l' α -synucléine – dans sa forme monomérique et non agrégée – inhibe effectivement la peroxydation lipidique, et que ceci s'accompagne de l'oxydation d'un ou plusieurs résidus Met. Ils proposent ainsi que, associé à l'activité Msr, un rôle

physiologique de l' α -synucléine serait de servir d'anti-oxydant inhibant les dégâts dans les membranes des cellules neuronales. Une des causes de la cytotoxicité observée de la forme agrégée serait donc l'appauvrissement des membranes de la forme active en tant qu'anti-oxydant, ce qui favoriserait une peroxydation lipidique fortement prononcée.

On peut envisager une application thérapeutique qui s'inspirerait des propriétés anti-oxydantes du couple MetSO/Msr. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le sulindac possèdent une fonction méthyl-sulfoxyde qui doit être réduite pour être actifs en tant qu'inhibiteurs des cyclo-oxygénases. Or, seule la MsrA est capable de réduire efficacement ces molécules. Weissbach et collaborateurs proposent de les modifier afin d'être efficacement réductibles à la fois par la MsrA et la MsrB, de sorte qu'ils puissent, en plus de leur rôle anti-inflammatoire, agir en tant qu'anti-oxydants catalytiques (Weissbach *et al.* 2005). En effet, les sites d'inflammation sont classiquement le siège d'un fort stress oxydant.

Néanmoins, un rôle de pro-oxydant du résidu Met ne doit pas être négligé, notamment en considérant une voie d'oxydation par transfert d'un électron, au lieu des deux nécessaires pour former le sulfoxyde. Une telle voie fait apparaître un radical cation sur le soufre (Figure 16).

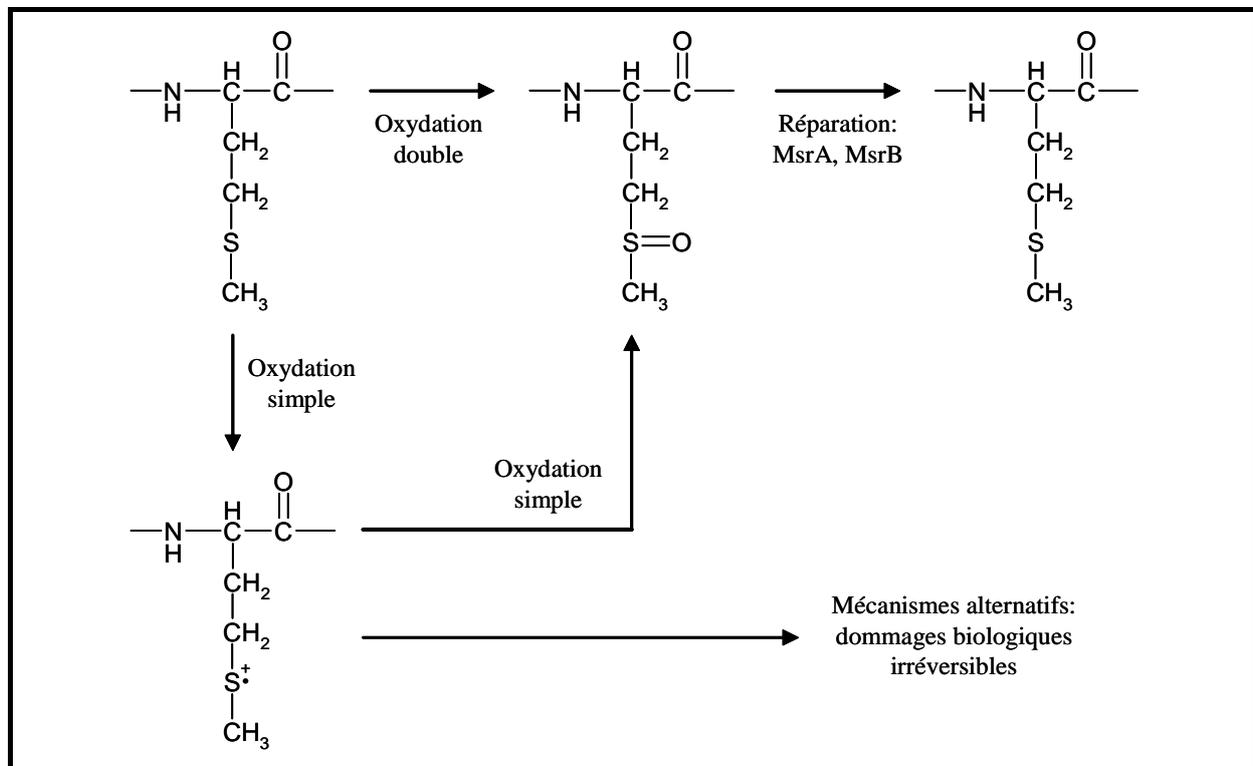


Figure 16

Les oxydations à un ou deux électron(s) du résidu méthionine et leur devenir

Ce radical cation est stabilisé par l'oxygène carbonyle d'une liaison peptidique à proximité. Il évolue ensuite, en faisant intervenir une déprotonation notamment, pour former un radical alkyle sur les positions γ ou ε ou encore, suivant un mécanisme différent, sur la position α du résidu Met ; ces derniers peuvent alors se condenser avec l'oxygène pour former un radical peroxy (voir figure 9) (Schoneich *et al.* 2003 ; Schoneich 2005). Les auteurs proposent que la Met35 du peptide β -amyloïde contribuerait ainsi à l'apparition du stress oxydant observé dans la maladie d'Alzheimer : il réduirait en Cu^{I} un Cu^{II} fixé par le peptide (voir réaction (a), Figure 17). La réaction (a) est endergonique, et donc l'équilibre devrait être fortement déplacé vers la gauche, mais la déprotonation du radical cation qui aboutit aux radicaux alkyles en γ ou en ε (réactions (b) et (c), Figure 17) est fortement exergonique (valeurs de pKa estimées voisines de -6 et -2, respectivement), et rend donc envisageable le déroulement effectif de cette réaction.

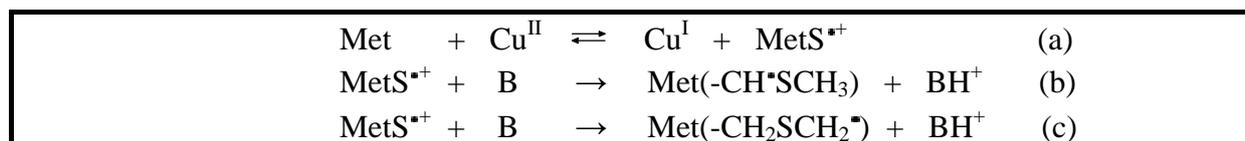


Figure 17 La réduction possible du cuivre II en cuivre I par le résidu méthionine

2.2.3. Signalisation et transduction du signal

La modification post-traductionnelle que constitue l'oxydation des résidus Met en MetSO représente la possibilité d'une voie de signalisation intracellulaire, en particulier si elle s'accompagne d'un changement conformationnel local. L'adressage d'une protéine modifiée vers une dégradation par le protéasome 20 S (voir plus haut) est alors à considérer comme un cas particulier de cet aspect. En addition, la possibilité de réversion grâce à l'activité Msr permet d'envisager cette oxydation, si elle a lieu sur des protéines particulières, comme constitutive de mécanismes de régulation cellulaires, à l'instar d'autres modifications covalentes, comme les phosphorylations, les acétylations ou encore les additions de nucléotides. Cette modification peut être alors envisagée comme une possibilité supplémentaire de moduler la fonction cellulaire en fonction des variations d'ERO et ERN, en addition des modifications des résidus cystéine (paragraphe 1.3.3)

La calmoduline, par exemple, peut très bien être un acteur majeur dans une telle voie de régulation. Cette protéine constitue, chez les eucaryotes, un senseur du signal calcique

(modulation du taux d'ion calcium intracellulaire) permettant de moduler le métabolisme cellulaire, de par une association réversible avec près de 50 protéines différentes (pour revue, voir (Bigelow et Squier 2005)). L'oxydation sélective de Met144 ou 145 de la calmoduline a été montrée conduire à une inactivation par association non productive avec la Ca-ATPase (Gao *et al.* 2001) Celle de Met145, en particulier, est encore retrouvée dans l'inhibition de la protéine, dans son rôle d'activateur de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* (Vougier *et al.* 2004). Ces oxydations sont réversibles de par l'activité Msr. Ainsi, dans ce cas, une variation dans les taux d'ERO et d'ERN peut impliquer les voies de régulation sous la dépendance de la calmoduline, en mettant en jeu l'oxydation/réduction de ses résidus méthionine.

On a également mis en évidence des variations de fonctionnement de canaux potassiques dépendant du voltage qui voient leur temps d'inactivation allongé sous l'oxydation d'un résidu méthionine (Ciorba *et al.* 1997 ; Quinonez *et al.* 1999). De même, l'oxydation de certains résidus Met de canaux potassiques dépendant de la concentration en calcium conduit à l'augmentation du courant les traversant (Tang *et al.* 2001). Le rétablissement du fonctionnement initial de ces canaux est possible grâce à l'activité Msr, qui peut donc aussi être un acteur dans la régulation des messages cellulaires véhiculés par les flux potassiques.

Un autre exemple concerne la protéine I- κ B (inhibiteur de facteur de transcription Nf- κ B), qui, quand elle est oxydée sur un de ses résidus méthionine, ne se dissocie plus de la protéine Nf- κ B (Kanayama *et al.* 2002 ; Mohri *et al.* 2002 ; Ogino *et al.* 2005). Cette dernière ne peut ainsi réguler l'expression des différents gènes sous sa dépendance. Cette oxydation étant également réversible constitue un exemple de modulation de l'expression génétique *via* le couple MetSO/Msr.

2.3. La MsrA et la MsrB

2.3.1. Importance physiologique

2.3.1.1. La durée de vie et le vieillissement

Plusieurs modèles mettent en évidence une corrélation entre le vieillissement et l'augmentation du taux de MetSO dans les tissus, en rapport avec une diminution du taux de Msr (pour revue, voir (Stadtman *et al.* 2005)). Par ailleurs, une approche statistique visant à

distinguer les processus impliqués dans le vieillissement de tous ceux qui peuvent affecter autrement la durée de vie des organismes désigne le gène *msrA* comme faisant partie des gènes pouvant influencer le vieillissement chez la souris (de Magalhaes *et al.* 2005). Ci-dessous sont présentées quelques expériences illustrant l'implication des Msr dans la durée de vie des organismes, et montrant ainsi qu'elles pourraient être associées à un processus de vieillissement.

D'un côté, des expériences sur les mutants de souris déficients en MsrA a montré une diminution de la durée de vie de 40% par rapport à l'organisme sauvage (Moskovitz *et al.* 2001). D'un autre coté, une surexpression de la MsrA chez la drosophile entraîne une augmentation de la durée de vie (Ruan *et al.* 2002).

Chez la levure, Koc et collaborateurs ont montré que MsrA et/ou MsrB ont un effet sur la durée de vie en condition aérobie standard ou hypocalorique (une condition qui voit le taux de production des espèces oxydantes diminuer) : une délétion de l'un ou l'autre gène provoque une diminution de la durée de vie tandis qu'une surexpression en provoque une augmentation (Koc *et al.* 2004). Néanmoins, suivant les conditions auxquelles sont soumises les levures, l'effet n'est pas le même. En effet, la condition aérobie standard ou hypocalorique ne change pas l'effet observé de la MsrA sur la durée de vie, tandis que l'effet de la MsrB n'est observé que dans les conditions hypocaloriques. Il semble donc que, du moins dans ce modèle, il y ait une différence dans l'aspect physiologique des deux classes de Msr.

2.3.1.2. Les maladies neuro-dégénératives

Le développement des maladies neurodégénératives est caractérisé par la présence d'un stress oxydant fortement prononcé (pour revue, voir (Mariani *et al.* 2005)), et mettrait notamment à contribution une défaillance du système MetSO/Msr (Moskovitz 2005).

Pour illustration, dans l'expérience de Moskovitz et collaborateurs citée dans le paragraphe précédent, les souris déficientes en MsrA présentaient un phénotype de démarche typique d'une neuro-dégénérescence (Moskovitz *et al.* 2001). Par ailleurs, une diminution de MsrA est observée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Gabbita *et al.* 1999).

Récemment, une autre étude utilisant des souris déficientes en MsrA ont montré une neuro-dégénérescence de la région de l'hippocampe associée à une perte de l'intégrité des astrocytes, un taux élevé de dépôts du peptide β -amyloïde et une hyperphosphorylation de la

protéine tau : autant de signes d'une pathologie du type de la maladie d'Alzheimer (Pal *et al.* 2007).

Une illustration de l'implication du système dans la maladie de Parkinson a été mentionnée dans le paragraphe 2.1.1.2., avec le rôle potentiel de l' α -synucléine en tant qu'anti-oxydant mais nécessitant, dans ce cas, la présence de l'activité Msr. Une oxydation non réparée des résidus Met de ce peptide est associée à un état oligomérisé et une agrégation cytotoxique (Glaser *et al.* 2005).

2.3.1.3. Autres pathologies pouvant être liées au vieillissement

D'autres pathologies impliquées dans le vieillissement ont été suggérées impliquer une défaillance de l'activité Msr, en particulier au niveau de l'œil.

Il a été mis en évidence que la MsrA est fortement exprimée dans les cellules du cristallin, et que cette dernière est importante dans la préservation de ce type cellulaire contre les effets des espèces oxydantes, en particulier concernant l'intégrité de la mitochondrie (avec l'observation des fonctions mitochondriales après l'inactivation gène *msrA*) (Kantorow *et al.* 2004 ; Marchetti *et al.* 2006). Etant donné que le développement de la cataracte avec l'âge est dû, notamment, à l'instauration d'un stress oxydant dans les cellules du cristallin, ces expériences semblent impliquer le système Msr dans l'empêchement du développement de cette pathologie.

De même, un examen du profil d'expression des gènes de cellules rétinienne de la macula du singe indique une forte présence de la MsrA dans ce type cellulaire. En addition, l'exposition de ce type cellulaire à H_2O_2 provoque l'induction de la MsrA et de la MsrB-2 (voir paragraphe 2.2.2.2.). Ici également, une inactivation du gène *msrA* provoque une plus grande sensibilité des cellules rétinienne étudiées (Sreekumar *et al.* 2005 ; Lee *et al.* 2006). Le développement de la dégénérescence maculaire, une autre pathologie de l'œil qui augmente avec l'âge, semble donc aussi impliquer une défaillance du système Msr.

De plus en plus d'études révèlent ainsi l'importance de l'activité Msr dans la protection anti-oxydante des cellules. D'autres exemples ont été récemment relatés, comme celui de l'implication de cette activité enzymatique dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion, une situation physiologique connue pour être le siège d'un fort stress oxydant (Picot *et al.* 2006), ou encore l'observation de la forte présence de l'activité Msr dans les mélanocytes (Schallreuter *et al.* 2006), des cellules présentes au niveau de sites ayant une forte potentialité d'établir un stress oxydant. L'implication de cette activité enzymatique se révèle donc dans

des situations très variées ; c'est ainsi qu'elle est également retrouvée dans la pathogénicité bactérienne.

2.3.1.4. Pathogénicité bactérienne

Les exemples mettant à jour l'importance de l'activité Msr dans la pathogénicité bactérienne se multiplient, bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents soient encore méconnus.

Plusieurs cas observés semblent impliquer la Msr dans les processus d'adhésion à l'hôte, comme dans les cas de *Mycoplasma genitalium* (Dhandayuthapani *et al.* 2001), de *Streptococcus pneumoniae* et d'*E. coli* (Wizemann *et al.* 1996) ou dans la motilité bactérienne comme dans le cas d'*Erwinia chrysanthemi* (Hassouni *et al.* 1999).

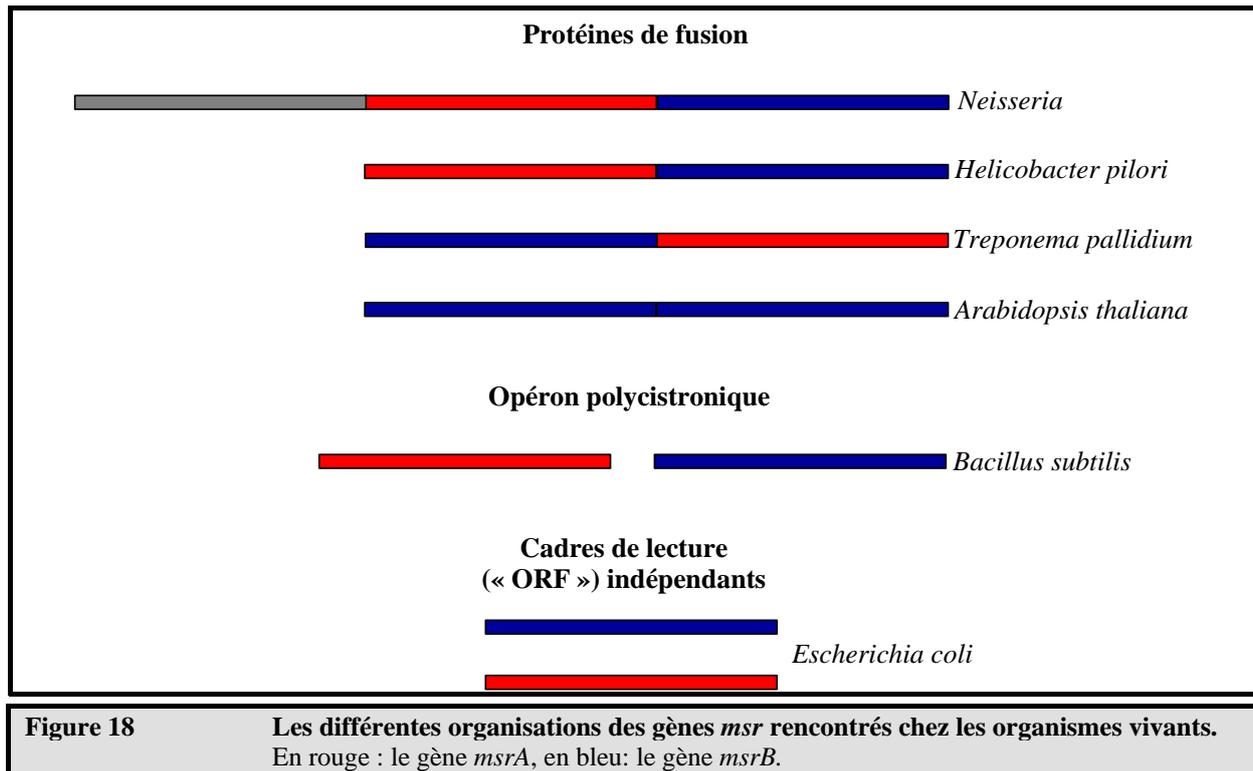
Dans le modèle de *S. aureus*, l'induction de l'opéron *msrA-msrB* par des antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane indiquerait que la Msr est importante dans le maintien de l'intégrité de la paroi bactérienne (Singh et Moskovitz 2003 ; Utaida *et al.* 2003).

L'importance du système en tant qu'anti-oxydant est illustrée *in vivo* par exemple par le fait qu'une déficience en MsrA altère la capacité de *Mycobacterium smegmatis* à survivre dans les phagosomes des macrophages (Douglas *et al.* 2004). On pense que la forme extra-cytoplasmique de la protéine PilB confère une protection anti-oxydante similaire aux bactéries du genre *Neisseria* (Skaar *et al.* 2002).

2.3.2. Données génomiques

2.3.2.1. Organisations génomiques

Le plus souvent, les deux gènes *msrA* et *msrB* sont retrouvés dans les génomes sous formes de cadres de lecture ouverts ("ORF") indépendants, mais il arrive, notamment chez les procaryotes, qu'ils appartiennent à un même opéron. Chez plusieurs organismes, une même protéine possède différentes activités Msr. La Figure 18 illustre les différents cas de figures rencontrés.



2.3.2.2. Multiplicité des gènes et des produits des gènes

Plusieurs copies de gènes *msr* peuvent exister chez un même organisme, qu'il soit procaryote (Ezraty *et al.* 2005) ou eucaryote, des plantes (Rouhier *et al.* 2006) aux mammifères (Kim et Gladyshev 2006). Le Tableau 2 reprend plusieurs exemples d'organismes illustrant cette multiplicité des gènes *msr*.

Organismes	Gènes
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 gène <i>msrA</i> et 2 gènes <i>msrB</i> (chromosome 1) 1 opéron <i>msrA-msrB</i> (chromosome 2)
<i>Rhizobium meliloti</i>	2 gènes <i>msrA</i> et 2 gènes <i>msrB</i> (chromosome) 1 opéron <i>msrA-msrB</i> (plasmide)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5 gènes <i>msrA</i> (3 cytosoliques, 1 chloroplastique et 1 secrété) 9 gènes <i>msrB</i> (6 cytosoliques, 2 chloroplastiques et 1 secrété)
Mammifères	1 gène <i>msrA</i> 3 gènes <i>msrB</i> (1 dans le cytosol et le noyau, 1 dans la mitochondrie et 1 dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique).

Tableau 2 Exemples d'organismes possédant plusieurs copies de gènes *msr*.

Par ailleurs l'expression des gènes *msr* peut conduire à plusieurs protéines produites, issues d'un épissage alternatif chez les eucaryotes supérieurs, par exemple. Ainsi, le premier exon de la MsrA des mammifères subit un épissage alternatif à l'origine de son adressage ou

non vers la mitochondrie. De même, la *msrB-3* des mammifères (voir Tableau 2) donne lieu à deux isoformes par épissage alternatifs des séquences d'adressage vers la mitochondrie ou vers le réticulum endoplasmique (Kim et Gladyshev 2006). Chez les procaryotes, cette multiplication des protéines exprimées est illustrée par le gène *pilB* de *N. meningitidis*, qui contient en son sein un site de réinitiation interne de la traduction à l'origine d'un adressage ou non vers le milieu périplasmique (Skaar *et al.* 2002) (voir paragraphes 2.3.2.1 et 3.6). Il est à signaler qu'une régulation de l'expression du gène *pilB* implique le facteur sigma alternatif Ecf (Gunsekere *et al.* 2006).

3. Relation structure-fonction des MsrA et MsrB

3.1. Sélectivité de substrat

Il a été mentionné plus haut que les MsrA et B manifestent une meilleure affinité vis-à-vis d'un résidu MetSO impliqué dans une chaîne polypeptidique, en comparaison de l'acide aminé libre (paragraphe 2.1). *In vitro*, le fait de protéger les groupements ammonium et carboxylate d'une MetSO sous forme de liaisons amides (mimétiques des liaisons peptidiques) permet d'améliorer l'efficacité catalytique. Le greffage respectivement d'un groupement acétyle et d'une méthyl-amine (Ac-MetSO-NHMe) permet d'obtenir une très bonne efficacité (Olry *et al.* 2002). Par ailleurs, les Msr sont actives sur divers sulfoxydes mais la structure chimique de la chaîne latérale de la MetSO constitue le meilleur substrat ; par exemple, un groupement éthyle à la place du méthyle ϵ de la MetSO conduit à une diminution drastique de l'efficacité catalytique. Enfin, la chaîne latérale de la méthionine n'est pas reconnue par l'enzyme ; aucune inhibition par le produit n'a été observée. De même, l'activité MsrA vis-à-vis du stéréoisomère *S*-sulfoxyde n'est pas affectée par la présence de l'isomère *R*-sulfoxyde, et inversement pour la MsrB en présence de l'isomère *S* : la stéréospécificité des deux classes d'enzyme correspond à une reconnaissance exclusive du stéréoisomère actif.

3.2. Mécanisme catalytique

Les enzymes appartenant aux deux classes de Msr caractérisées sur le plan biochimiques montrent un même mécanisme catalytique basé sur la réactivité de deux ou trois résidus cystéine (pour revue, voir (Boschi-Muller *et al.* 2005)) (Figure 19). Il s'agit d'un mécanisme de type ping-pong, au sein duquel le substrat est reconnu, et un premier résidu cystéine (cystéine catalytique CysA) effectue une attaque nucléophile sur sa fonction sulfoxyde et conduit à sa réduction en thioéther. A la fin de cette étape, le produit est relargué et CysA est oxydé sous forme d'acide sulfénique. Le retour de l'enzyme vers sa forme réduite active nécessite l'intervention d'un deuxième résidu cystéine (cystéine de recyclage CysB) qui forme un pont disulfure intra-moléculaire avec CysA, avec un départ d'une molécule d'eau. Ce pont disulfure est alors réduit grâce à une réaction avec un réducteur externe comme la Trx. Une molécule comme le dithiothréitol (DTT) peut être utilisée *in vitro*. Dans le cas de certaines MsrA comme celle issue d'*E. coli* par exemple, un troisième résidu cystéine (cystéine de recyclage CysC) intervient en formant un pont disulfure avec CysB (rompant ainsi le précédent). Dans ce cas, le pont disulfure CysB-CysC est préférentiellement réduit par la Trx (Figure 19).

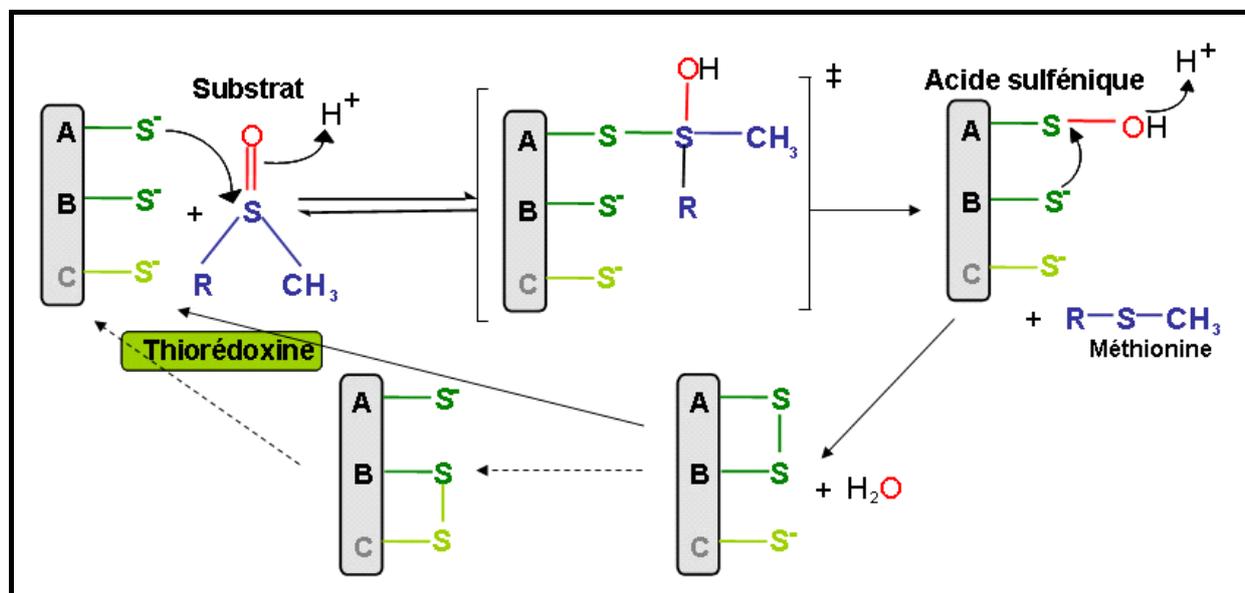


Figure 19

Mécanisme catalytique des Msr (pour revue, voir (Boschi-Muller *et al.* 2005)). A représente le résidu cystéine catalytique et B le résidu cystéine de recyclage; certaines MsrA ont un second résidu cystéine de recyclage, symbolisé par C.

Ce mécanisme a été établi par le groupe du Professeur Guy Branlant, en particulier dans le cas de la MsrA d'*E. coli* (Boschi-Muller *et al.* 2000 ; Boschi-Muller *et al.* 2001), les deux MsrA et B de *N. meningitidis* (Olry *et al.* 2002) et la MsrB de *X. campestris* (Neiers *et al.* 2004). Une caractérisation cinétique plus poussée des différentes sous-étapes a été effectuée dans les cas des MsrA de *N. meningitidis* (Antoine *et al.* 2003), de la MsrB de *N. meningitidis* (Olry *et al.* 2004) et de la MsrB de *X. campestris* (Neiers *et al.* 2004).

Trois étapes majeures sont à considérer : (i) la reconnaissance et la réaction avec le substrat (étape réductase), (ii) la formation du pont disulfure intramoléculaire, et (iii) l'échange de pont disulfure avec le partenaire réducteur. Au sein de ce mécanisme global, l'étape cinétiquement limitante est la troisième.

Dans les deux processus (i) et (ii), le premier est cinétiquement déterminant. En effet, aussi bien dans le cadre de la MsrA que celui de la MsrB, les différentes expériences en enzymologie montrent que l'intermédiaire acide sulfénique ne s'accumule pas : le pont disulfure CysA-CysB s'établit immédiatement après sa formation. Par ailleurs, les données les plus récentes indiquent que l'attaque nucléophile de CysA sur le sulfoxyde aboutit à un état de transition (ou un intermédiaire difficilement caractérisable expérimentalement) de type sulfurane, ayant une géométrie de type bipyramide trigonale au niveau du soufre de la MetSO, avec l'oxygène et l'atome S_γ de CysA en positions apicales (Antoine *et al.* 2006 ; Balta *et al.* 2006).

Quant à la troisième étape, les différentes expériences menées avec l'utilisation de la Trx1 d'*E. coli* indiquent que le processus globalement limitant est associé à la dissociation entre la Msr réduite et la Trx oxydée ; l'association avec la Trx réduite et l'échange de pont disulfure à proprement parler sont rapide.

3.3. Classification

3.3.1. Les différentes sous-classes de MsrA

L'analyse de différentes séquences de MsrA putatives ou caractérisées permet de dégager le motif signature GCFW(G/C). Par exemple, dans l'enzyme issu d'*E. coli*, ce motif se retrouve aux positions 50 à 54. Les résidus le composant appartiennent au site actif, tel qu'il sera présenté en détail au paragraphe 3.4.1. Ainsi, le premier résidu cystéine de ce motif

(Cys51 dans la MsrA d'*E. coli*) correspond à CysA (voir paragraphe 3.2). La position de ce premier résidu est alors conservée au sein des séquences de MsrA alignées entre elles.

En regard du nombre et de la position des résidus cystéine impliqués dans le recyclage de CysA (voir paragraphe 3.2), trois sous-classes de MsrA peuvent être définies. La première (sous-classe 1), incluant la MsrA d'*E. coli*, possède deux autres résidus cystéine : il s'agit de Cys198 (CysB) et Cys206 (CysC) dans le cas de l'enzyme d'*E. coli*. L'insertion d'un résidu en amont de CysC conduit à un décalage dans certaines séquences, la position de CysC étant alors équivalente au résidu en 207 de l'enzyme d'*E. coli*. Au sein de la sous-classe 1, CysC fait partie d'un fragment riche en résidus glycine. Les enzymes de la sous-classe 2 possèdent également une CysB à une position équivalente à Cys198 de l'enzyme d'*E. coli*, mais il n'y existe pas de CysC. Dans ces deux premières sous-classes, CysB est incluse au dans un motif

		1	10	20	30	40	50	60					
I	msra_ecoli	-----	-SLFDK	KHLVSPADALPGRNTPMPVATLHAVNGHSMTNVPD	GMEIAIFAMG	FWG	VERLFWQLPGVYSTA	69					
	msra_bovin	MLSVTRRALQLFHSLFP	IPRMGDSAAKIVSPQ	EALPGRKEPLVVA	AKHHVNGNRTVPEP	PEGTQMAVFGMG	FWGAERKFWTLKGVYSTQ	90					
II	msra_myctu	-----	-----	-----	-----	-----	-----	31					
	msab_neimb	NISVYPSWALIGKSDSDVQR	IVKGSINEAQA	LALIRDPNADL	GLSKHSFYK	PDTQKKDKS	KIMNTRTIYLAGG	225					
III	msra_bacsu	-----	-----	-----	-----	-----	MSEKKEIATFAGG	32					
	msra_staaw	-----	-----	-----	-----	-----	MTKEYATLAGG	30					
		70	80	90	100	110	120	130	140	150			
I	msra_ecoli	AGYTGGYTPNPTY	REVC	SGDTGHA	EAVRIVYDPSVISYE	QLLQVFWENHDP	AQGM	RQGN	DHGTQYRS	AIYPLTPEQDAARASLERFQAA	159		
	msra_bovin	VGFAGGYTPNPTY	KEVCS	GKTGHA	EVVRVVQPEHIS	FEELLKVF	WENHDP	TQGM	RQGN	HGSQYRS	AIYPTSAEHVGAALKSKEDYQKV	180	
II	msra_myctu	VGYSGGNIPNATY	RNHG	---THAE	AVEIIFDPTVTDYR	TLEFFQI	HDPTTKDR	QGNDRG	TSYRS	AIYFDEQKRIALD	TIADVEAS	117	
	msab_neimb	SGYANGNTKNP	SYRHTGHA	EIVKVTYDAD	KLSDLDILQY	FFRVVDP	TSLNK	QGN	DGTQYRS	GVYVYDPAEKAVIAAAL	KREQQK	315	
III	msra_bacsu	SGYTGGHTENPTY	EEVCS	ETTGHRE	AVQITFP	HPDVPFY	EKLEL	FWQQID	PTDAGG	QFADRGSSY	RAAIFYHNDKQKELAEASKRLAES	122	
	msra_staaw	SGYSGGHVDNPTY	EQVCT	NQTHGVE	AVQITFD	PEVTSF	ENILDY	FKTFD	PTD	DQGFDR	GESYQPVIFYHDEHQKKA	EFFKKQQLNEQ	120
		160	170	180	190	200	210						
I	msra_ecoli	MLAADDRHITTEIANAT	PFYAE	DDHQOYLHKNPYGY	CGIGG	IGVCLP	PEA-----	211					
	msra_bovin	LSEHGFGLITTDIREG	QTFY	AEADYHQYLSKDPDGY	CGLGG	TGVSPL	GIKK-----	233					
II	msra_myctu	GLWP---GKVVTEVSP	AGDFWE	AEPHQDYLQRY	PNGYT	CHFVR	PGWRLPRRTAESALRASL	SPELGT	182				
	msab_neimb	YQ---LPLV	VENELK	NFYDAE	EYHQDYLIK	PNGY	CHIDIR	KADEPLPGKTKTAPQ	GKGFDAAT	377			
III	msra_bacsu	GIFK---DP	IVTDIL	KAEPFYEA	EYHQHFYK	KNPAHY	QRYRTG	SGRAGFISE	HWGAK-----	177			
	msra_staaw	GIFK---K	VITPIK	PKNFYPA	EYHQDY	YKKNPVHY	YQYQR	GSGRKAF	IESHW-----	172			

Figure 20

Les trois sous-classes de MsrA, illustrées à travers 6 exemples de séquence.

Sous-classe 1: MsrA d'*E. coli* (noté msra_ecoli); MsrA de boeuf (msra_bovin);
 Sous-classe 2: MsrA de *Mycobacterium tuberculosis* (msra_myctu), domaine MsrA isolé de PilB de *Neisseria meningitidis* (msab_neima);
 Sous-classe 3: MsrA de *Bacillus subtilis* (msra_bacsu), MsrA de *Staphylococcus aureus* (msra_staaw).

Les six séquences ont été alignées avec ClustaW ; la règle au-dessus de l'alignement suit la séquence de l'enzyme d'*E. coli*, les numéros notés à droite des séquences indiquant la position du résidu de fin de ligne selon la numérotation naturelle de chaque séquence. Le résidu cystéine CysA est en rouge, CysB en cyan, et CysC, quand il existe, en magenta (voir paragraphe 3.2). Les résidus colorés en jaune ont été observés constituer le site actif chez certaines MsrA dont les structures ont été résolues (voir paragraphe 3.4).

conservé GYxC, où la notation "x" correspond à un résidu supplémentaire très peu rencontré. La MsrA de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) possède une telle insertion de par la présence d'un résidu thréonine (voir paragraphe 3.4.3). Enfin, la sous-classe 3 inclut les enzymes ayant leur cystéine de recyclage CysB en position équivalente à celle de Gly54 de

l'enzyme d'*E. coli*. Cette dernière sous-classe de MsrA ne possède pas de CysC. La Figure 20 illustre cette classification des MsrA à travers l'alignement de six séquences issues d'organismes différents.

Toutefois, cette classification n'englobe pas tous les types de séquences de MsrA répertoriés. En effet, certaines ne possèdent pas de résidus cystéine de recyclage à des positions équivalentes à Cys198 et Cys206 ou 207, ni à la position 54 comme dans la sous-classe 3. Dans le cas de la MsrA du peuplier, par exemple, dont la structure cristallographique sera présentée plus loin (voir paragraphe 3.4.4), les deux résidus susceptibles de jouer le rôle de CysB et CysC dans un mécanisme Trx-dépendant appartiennent également au fragment C-terminal, mais ne s'alignent pas avec Cys198 et Cys206 de la MsrA d'*E. coli* ; en particulier, le motif GYxC n'est pas retrouvé (Rouhier *et al.* 2007). Par ailleurs certains enzymes possèdent un résidu sélénocystéine à la position équivalente à Cys51 ; il a été montré avec l'enzyme issu de *Chlamydomonas reinhardtii* qu'une telle protéine est fonctionnelle avec l'utilisation du DTT ou de la Trx, bien que le réducteur naturel ne soit pas connu (Kim *et al.* 2006). Enfin, des séquences de MsrA putatives ne possèdent pas de résidu cystéine autre que CysA, par exemple celle issue de *Rhodobacter capsulatus*. L'activité et le mécanisme catalytique propres à ces dernières protéines restent à être caractérisés.

3.3.2. Les différentes sous-classes de MsrB

Chez les MsrB comme chez les MsrA, la position de CysA est conservée : cette cystéine correspond à Cys117 dans l'enzyme d'*E. coli* (Figure 21). La position de CysB, quand ce résidu existe, est variable. Le mécanisme proposé chez les MsrB n'inclut pas l'intervention d'une troisième cystéine (du type CysC).

60 % des séquences possèdent leur CysB à une position équivalente à celle de Cys63 de l'enzyme d'*E. coli*. Les autres séquences répertoriées possèdent leur CysB à une autre position, ou bien ne possèdent pas de résidus cystéine pouvant être un candidat pour former un pont disulfure avec CysA.

La MsrB putative de *Vibrio cholerae* illustre ce dernier cas de figure car sa séquence ne révèle aucun autre résidu cystéine que celle équivalente à Cys117. La MsrB de *Mycoplasma pulmonis* (*M. pulmonis*), également, ne possède pas de deuxième résidu cystéine ; l'enzyme a commencé à être caractérisé par le groupe du Professeur G. Branlant, et il s'avère qu'il est

fonctionnel, en présence de glutathion ou de Trx, bien que la Trx 1 de *M. pulmonis* présente une efficacité modeste de la régénération de l'étape réductase (Neiers, 2007).

CysB – quand il existe – peut être retrouvé en position 60 (si l'on se réfère à la numérotation de la séquence de l'enzyme d'*E. coli*), comme dans le cas de la MsrB-2 humaine. Parfois, CysB – ou bien un résidu cystéine candidat pour jouer ce rôle – se trouve bien plus en amont, vers l'extrémité N-terminale. Dans le cas de la MsrB de *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), CysB est en position 31.

Enfin, des protéines possèdent, comme dans le cas des MsrA, un résidu sélénocystéine en lieu et place de CysA. La MsrB-1 humaine (aussi appelée sélénoprotéine R ou X, en constitue un exemple, et elle a été montrée fonctionnelle, avec l'établissement d'un pont sélénylsulfide lors du processus de recyclage (Kim et Gladyshev 2005). Une telle protéine n'est retrouvée que chez les vertébrés, et présente la particularité de posséder une variabilité au niveau des résidus du site actif, par rapport aux MsrB ayant une cystéine.

		1	10	20	30	40	50	60	70								
I	msrb_ecoli	-----MANKPSAEELKKNLSEM	QFYV	TQNH	TEPP	FTGRLLHNKRDGVYH	CLICD	APLFSHQTKYDSGC	GWPSFYEPVSE	74							
	msrb_pasmu	-----MKKREDMTEMQVHV	LNQGT	EYPT	GKLLDQKKGLYRCV	VCHSPLFVSDTKFDAG	CGWPSFFQAI	SP		68							
	msrb_pseae	-----MSKIDKPLDSWREELTE	EQPHI	RLGGT	ERAFSGEYHATKTPGI	YHCTCCGTALFDSDAKYDS	SGSGWPSYFQ	PVDA		76							
	msrb_synel	-----MTKVVKDAEWAQQLT	PEQYV	TRKKT	ERAF	TGCVYNNKPKGLYS	CVCCGTPLFRSET	KYDSG	TGWPSFWQPLDP	76							
	msrb_drome	DKRYSGPAATMDNKSEK	VTVNKEELRKR	LTPVQYQVTQ	EAGTERP	PTGCVYNNKPKGLYS	CVCCGTPLFRSET	KYDSG	TGWPSFWQPLDP	121							
	msrb_caucr	MTDAATLSTAGFDLTP	PTAERERLEANL	TAEERVLLH	HGTTEAP	FCGGLLGEKSPGVY	GCRLCGLPLFKH	ETKFESG	TGWPSFYAPFAE	90							
II	msab_neigo	GKTKAAPQGGFDAAT	YKPSDAELK	RKRLTEPEQY	QVTQNSAT	EYAFSHEVDHL	FKPGIYVDVVS	GEPLFSSAD	KYDSGC	GWPSFTRPIDA	451						
	msab_vibch	LRQWIDEKNGQAN	KAYVRP	SDQIRAKL	TSLQYKVTQR	DTERPFDNEY	WDNKEEGII	YVDIVS	GEPLFSSAD	KYDSG	TGWPSFTRPIDA	308					
		80	90	100	110	120	130										
I	msrb_ecoli	ESIRYIKDLSHG	-----MQR	IEIRGN	DAHLGHV	FPDGPQPTG	-ERYVNSASL	RF	TDG	ENGEEING	-----	136					
	msrb_pasmu	EAIRYLDYD	TL-----R	PRTEIR	CGQDAHL	GHVFPDGP	PTG-LRYVNS	SVSM	AFED	SETG	ELIEG	-----	130				
	msrb_pseae	EAVRELD	DFSHG-----M	HRIEVR	CGRDAHL	GHVFPDGP	PTG-LRYVNS	SASL	KLV	PRES	-----	132					
	msrb_synel	NNIRMER	DLSHG-----M	VRTEVL	CAVDAHL	GHVFPDGP	PTG-LRYVNS	SAAL	AFV	PE	SAASS	-----	135				
	msrb_drome	GKVTLHR	DASIPGGN	ILLIAHP	ERIRTEVR	CARQNAH	MGHVFPDGP	KPTR-KRYVNS	SASIE	FNAD	PATSS	PPVATPTA	IAQ	207			
	msrb_caucr	DHVVGVR	DTSYG-----M	VRTEVR	CAVDAHL	GHVFPDGP	PTG-LRYVNS	SVLQ	FKAG	APLP	DLHR	GDKIT	-----	159			
II	msab_neigo	KSVTEH	DDFSFN-----M	RRTEVR	SRAAD	SHLGHV	FPDGPDR	KGGLRYVNS	ASL	KFIP	LEQMD	AAGYG	ALKGEVK	----	522		
	msab_vibch	SYIVTK	DDNSLF-----Y	TRTEVR	S	R	FAD	SHLGHV	FPDGP	APTG-LRYVNS	SA	MR	IPKQ	EMAAQYGEY	LALFK	----	378

Figure 21

Deux sous-classes de MsrB déterminées en fonction de leur aptitude à lier ou non un cation zinc, illustrées à travers 8 exemples de séquences.

Sous-classe 1: MsrB d'*E. coli* (noté msrb_ecoli); MsrB de *Pasteurella multocida* (msrb_pasmu); MsrB de *Pseudomonas aeruginosa* (msrb_pasmu); MsrB de *Pasteurella multocida* (msrb_pseae); MsrB de *Synechococcus elongatus* (msrb_synel); MsrB de *Drosophilla melanogaster* (msrb_drome); MsrB de *Caulobacter crescentus* (msrb_caucr).
Sous-classe 2: domaine MsrB de PilB de *Neisseria meningitidis* (msab_neigo), MsrB de *Vibrio cholerae* (msab_vibch).

Les huit séquences ont été alignées avec ClustaW ; la règle au-dessus de l'alignement suit la séquence de l'enzyme d'*E. coli*, les numéros notés à droite des séquences indiquant la position du résidu de fin de ligne selon la numérotation naturelle de chaque séquence. Le résidu cystéine CysA est en rouge, Cys63 jouant le rôle de CysB en cyan. Les positions des cystéines additionnelles qui pourraient éventuellement jouer un rôle dans la catalyse sont en vert. Les cystéines impliquées dans la fixation d'un ion zinc sont en gris. Les résidus colorés en jaune ont été observés constituer le site actif chez certaines MsrB dont les structures ont été résolues (voir paragraphe 3.5).

Une classification des séquences de MsrB conduit à considérer deux grands groupes, en se basant sur le fait que quatre résidus cystéine sont conservés au sein de deux segments

CXXC, dans près de la moitié des séquences répertoriées. Ces résidus ont été montrés fixer un ion Zn^{2+} dans le cas de la MsrB de la drosophile (Kumar *et al.* 2002). Leur présence n'est pas corrélée à celle de la cystéine en position équivalente à Cys63 de l'enzyme d'*E. coli*, comme c'est illustré dans la Figure 21. Cet ion zinc fixé a certainement un rôle structural : la substitution des deux motifs CXXC de l'enzyme d'*E. coli* conduit à une perte totale de l'activité et leur introduction dans l'enzyme de *N. meningitidis* conduit à une activité réductase conservée, mais une perturbation du recyclage par la Trx (Olry *et al.* 2005).

3.4. Etudes structurales de la MsrA

En incluant la MsrA issue de *N. meningitidis* qui fait partie des travaux relatés dans ce manuscrit (présentée en détail dans le paragraphe 3.6.3), cinq structures cristallographiques de MsrA issues d'organismes différents sont disponibles. Suivant l'ordre chronologique des publications des travaux en question, il s'agit de la MsrA d'*E. coli* ((Tete-Favier *et al.* 2000), code PDB : 1FF3), celle de *B. taurus* ((Lowther *et al.* 2000), codes PDB : 1FVA (forme native) et 1FVG (forme sélénée)), celle de *M. tuberculosis* ((Taylor *et al.* 2003), code PDB : 1NWA) de *Populus trichocarpa* ((Rouhier *et al.* 2007), code PDB : 2J89) et celle de *N. meningitidis**. A celles-là s'ajoute une étude structurale par RMN de la MsrA d'*E. coli* ((Coudevylle *et al.* 2007), codes PDB : 2GT3 (forme réduite) et 2IEM (forme oxydée)).

Les différentes structures adoptent évidemment une conformation globale similaire, néanmoins, pour plusieurs d'entre elles, les expériences effectuées ont conduit à des observations inattendues, mais dont l'analyse apporte certains éclairages concernant les éléments structuraux mis en jeu lors du processus catalytique.

3.4.1. La MsrA d'*Escherichia coli* (structure cristallographique)

La structure cristallographique de la MsrA d'*E. coli* (Tete-Favier *et al.* 2000) est la première structure déterminée pour cette protéine. Cet enzyme fait partie de la sous-classe 1

* Une publication de F. M. Ranaivoson et collaborateurs a été soumise à *Journal of Molecular Biology*. Le manuscrit en est présenté en annexe 2.

des MsrA, c'est-à-dire qu'il possède trois résidus cystéine impliqués dans le mécanisme catalytique en positions 51 (CysA), 198 (CysB) et 206 (CysC) (voir paragraphes 3.2 et 3.3.1).

Ce travail a révélé le repliement des MsrA, adopté par toutes les structures résolues ensuite. Il s'agit d'un repliement qui se décrit comme un rouleau α/β constitué d'un feuillet β mixte à six brins ($\beta 1$ à $\beta 6$) entouré de trois hélices α ($\alpha 1$ à $\alpha 3$) (la numérotation des éléments de structures secondaires suit l'ordre de leur apparition dans la séquence) ; viennent s'insérer dans ce rouleau une quatrième hélice α ($\alpha 1'$) et deux petits brins β ($\beta 3'$ et $\beta 3''$) (Tete-Favier *et al.* 2000) (Figure 22). A la base du repliement se définit un feuillet β antiparallèle à quatre brins qui se disposent "en natte" dans l'ordre 4-1-3-2. Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont formées par les fragments connectant respectivement les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ et les brins $\beta 3$ et $\beta 4$. Néanmoins, au-delà de l'hélice $\alpha 2$, la chaîne polypeptidique forme les deux courts brins β ($\beta 3'$ et $\beta 3''$) antiparallèles entre eux, dessinant une petite structure en épingle à cheveux, avant de former le brin $\beta 4$. De même, le fragment connectant les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ se replie pour former l'hélice $\alpha 1'$. Enfin, après le brin $\beta 4$, la chaîne polypeptidique forme l'hélice $\alpha 3$, puis le brin $\beta 5$, parallèle au brin $\beta 4$, et finalement le brin $\beta 6$, antiparallèle au brin $\beta 2$. Ainsi, les deux brins $\beta 5$ et $\beta 6$ sont disposés de part et d'autre du feuillet, et comme un fragment de seulement cinq résidus les connecte l'un à l'autre, il en résulte un feuillet se repliant sur lui-même pour adopter une forme relativement conique dessinant le rouleau β central.

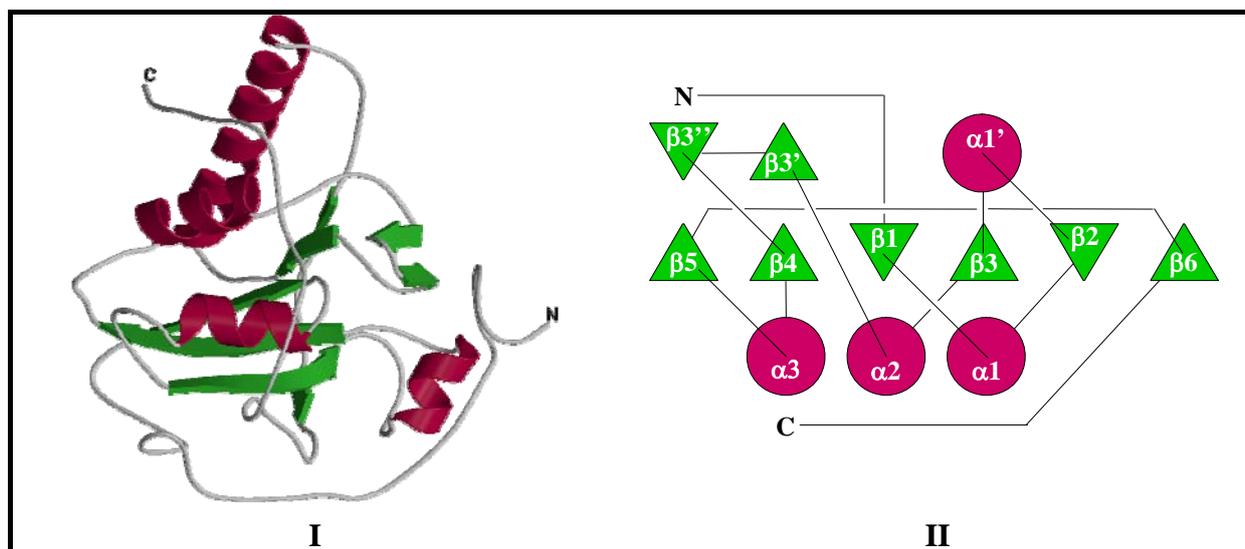


Figure 22

Repliement global de la MsrA d'*E. coli*.

(I) Représentation en flèches et rubans de la structure globale, et (II) schéma représentant la topologie de la protéine (figures tirées de (Tete-Favier *et al.* 2000)).

Une des caractéristiques révélées par cette étude structurale est que les MsrA sont des protéines pauvres en éléments de structure secondaire : dans cette structure de l'enzyme d'*E. coli*, il y a seulement 18.5 % d'hélices α et 16.6 % de brins β . En particulier, les fragments N- et C-terminaux (les 42 premiers résidus et les 29 derniers) y apparaissent sous forme de longues boucles peu structurées et agitées, à tel point que, notamment au sein de la portion C-terminale, les atomes ne sont pas toujours définis en termes de densité électronique (voir ci-après).

Des trois monomères présents dans l'unité asymétrique, l'extrémité C-terminale est représentée uniquement dans le monomère A. Ceci est certainement dû au fait que Cys206 (qui appartient à cette extrémité) établit un pont disulfure inter-moléculaire avec Cys86 du monomère B (une quatrième cystéine présente dans la séquence, non impliquée dans l'activité (Boschi-Muller *et al.* 2000)), apportant donc une certaine stabilisation de cette région de la structure, absente dans les autres monomères. En effet, dans les deux autres monomères, l'extrémité C-terminale est agitée et est absente dans le modèle, à partir du résidu 196 pour le monomère B et à partir du résidu 193 pour le monomère C. Or, les deux cystéines impliquées dans le recyclage de l'enzyme (Cys198 et Cys206) appartiennent à cette extrémité C-terminale. Une première conclusion en rapport avec l'activité qui découle de cette observation est que ces deux résidus cystéine semblent nécessiter d'être dans une portion flexible de l'enzyme. En effet, dans le monomère A où ils sont représentés, les résidus cystéine qui forment un pont disulfure intra-moléculaire lors du processus de recyclage de l'enzyme (voir paragraphe 3.2) sont éloignés l'un de l'autre, de sorte que l'établissement des ponts disulfures en question doit s'accompagner d'un remaniement de la conformation observée dans la structure : Cys198 est distant de 11 Å de Cys51 avec lequel il doit former un pont disulfure, et Cys206 est distant de 20 Å de Cys198 avec lequel il forme un pont disulfure ultérieurement au premier (distances entre C α) (Figure 23). Le fait que cette zone de la séquence soit riche en résidus glycine au sein des MsrA de la sous-classe 1 est certainement une condition nécessaire garantissant une flexibilité du fragment afin de rapprocher Cys206 de Cys198.

Par ailleurs, la structure dessine une cuvette relativement évasée en surface, formée par des résidus conservés, qui constitue le site actif (Figure 23). Le résidu Cys51 se situe au centre de cette cuvette, en N-terminal de l'hélice α 1. Relativement à la position de Cys51, d'un côté les chaînes latérales des résidus Phe52 et Trp53 forment une poche hydrophobe, et de l'autre les chaînes latérales des résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 interagissent avec une

molécule d'eau. Cette dernière est rencontrée dans toutes les structures cristallographiques résolues à ce jour, sauf dans le cas du complexe non covalent avec un substrat de l'enzyme de

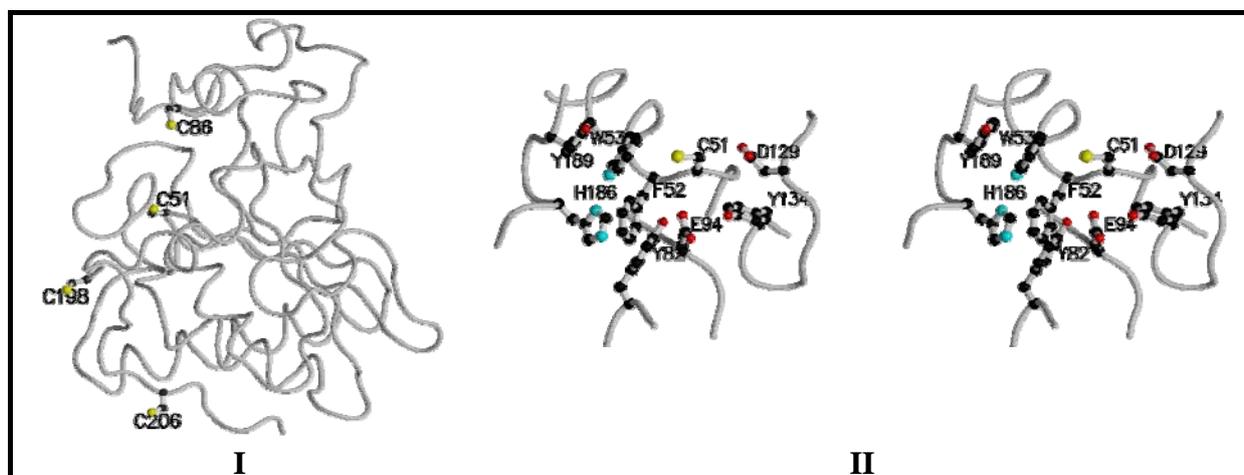


Figure 23

Les résidus cystéine de la MsrA d'*E. coli*.

(I) Représentation schématique en mode ruban de la chaîne principale de la MsrA, avec les 4 résidus cystéine en mode sphères et bâtons. Cys51 = CysA, Cys198 = CysB, Cys206 = CysC, tandis que Cys86 n'est pas impliqué dans le mécanisme (voir paragraphe 3.2).

(II) Représentation stéréo de Cys51 et des résidus avoisinants, formant le site actif (l'aduit diméthyl-arsenate lié à Cys51 n'est pas représenté) (tiré de (Tete-Favier *et al.* 2000)).

N. meningitidis (voir partie B, section III, paragraphe 1.3). Il se trouve que dans cette structure issue d'*E. coli*, le soufre de Cys51 est en liaison covalente avec un diméthyl-arsenate, résultant d'une réaction avec le cacodylate présent dans le tampon de cristallisation. Il est admis aujourd'hui que cette observation reflète la réactivité naturelle de Cys51 et que le groupement diméthyl-arsenate fixé est mimétique de l'état de transition de type sulfurane (voir paragraphe 3.2) (Taylor *et al.* 2003). Dans la structure, un des deux groupements méthyle du diméthyl-arsenate est dirigé vers l'intérieur du site actif, logé dans la poche hydrophobe formée par Phe52 et Trp53 : il mimerait la position du méthyle ϵ du substrat. L'autre groupement méthyle est dirigé vers l'extérieur, également en interaction avec le noyau indole de Trp53 : il marquerait le positionnement pris par le méthylène γ du substrat.

3.4.2. La MsrA de *Bos taurus*

La MsrA de boeuf (Lowther *et al.* 2000) est également un enzyme de la sous-classe 1. Les trois résidus cystéines intervenant dans la catalyse sont, ici, en positions 72 (équivalent à Cys51 de la MsrA d'*E. coli*), 218 (équivalent à Cys198) et 227 (équivalent à Cys206, bien que décalé d'un résidu supplémentaire si l'on se base sur l'alignement des séquences (voir

paragraphe 3.3.1)). Deux structures sont déposées dans la PDB : une forme contenant des résidus sélénométhionine, correspondant à la séquence allant du résidu 21 au résidu 219 de la séquence originale (CT-1, code PDB : 1FVG) et une forme native, correspondant aux résidus allant de la position 13 à la position 229 (CT-2, code PDB : 1FVA) (Lowther *et al.* 2000).

La forme CT-1 contient un adduit au sein du site actif, correspondant à une molécule de dithiothréitol (DTT) dont un des deux groupements thiol a réagi avec Cys72 et l'autre avec Cys218, formant ainsi un pontage covalent entre les deux premières cystéines impliquées dans la catalyse. Les résidus cystéine de la forme CT-2 sont libres, mais le site actif est en interaction avec le fragment 163-166 d'un voisin symétrique, de telle sorte que la chaîne latérale de Ala164 est dirigée vers l'intérieur du site actif. La liaison amide avec le résidu précédent interagit avec les résidus Asp150 et Tyr217 (équivalents à Asp129 et Tyr197 dans la MsrA d'*E. coli*) : l'azote de la chaîne principale établit une liaison hydrogène avec Asp150 et le nuage π interagit avec celui du noyau aromatique de Tyr217. Dans cette structure, ainsi que dans les structures cristallographiques résolues ensuite, les chaînes latérales des résidus équivalents à Asp129 et Tyr197 se positionnent à l'entrée du site actif et interagissent entre elles par liaison hydrogène ; elles sont proposés établir une interaction avec la chaîne principale du substrat lors de la reconnaissance moléculaire. Cette interaction n'est pas observée dans la structure de l'enzyme d'*E. coli*, certainement du fait que dans l'unique monomère où le fragment C-terminal est observé, le pont disulfure intermoléculaire impliquant Cys206 (voir paragraphe 3.4.1) apporte une contrainte à cette région de la structure qui aboutit à une conformation de Tyr197 décalée par rapport aux autres. Seule la structure de la MsrA du peuplier constitue une exception à cela, dans la mesure où la séquence ne contient pas de résidu tyrosine équivalent à Tyr197 ; un autre résidu Tyr joue un rôle similaire (voir paragraphe 3.4.4).

Sur la base de l'observation des deux formes CT-1 et CT-2, les auteurs ont modélisé l'état de transition putatif qui apparaît lors de la réduction du substrat, à savoir un résidu MetSO en position 164 (à la place d'une alanine) dont la structure de la chaîne latérale a évolué de par l'établissement d'une liaison covalente entre le soufre du sulfoxyde et celui de Cys72 (Figure 24). La géométrie au niveau du soufre dans cet état est alors du type bipyramide trigonale. Le méthyle ϵ est logé dans la poche hydrophobe formée par Trp74 et Phe73 (équivalents à Trp53 et Phe52 chez *E. coli*), et l'oxygène du sulfoxyde prend la place de la molécule d'eau interagissant avec Tyr155, Tyr103 et Glu115 (équivalents à Tyr134, Tyr82 et Glu94 chez *E. coli*).

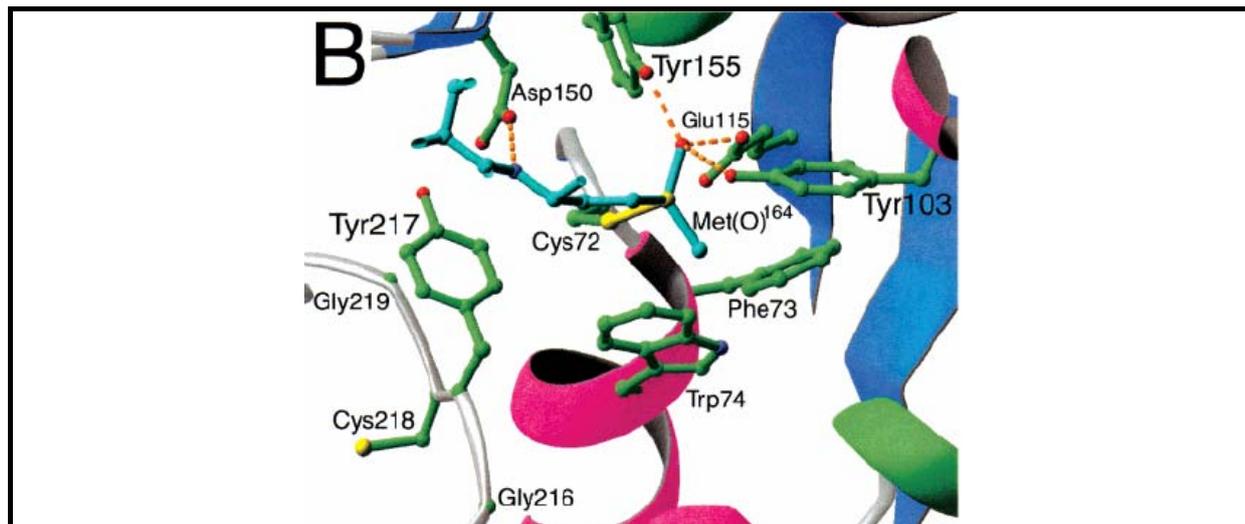


Figure 24

Vue schématique du site actif de la MsrA de boeuf dans lequel l'état de transition de type sulfurane a été modélisé.

Pour la clarté du dessin, la boucle contenant le résidu méthionine sulfoxide du substrat (cyan) a été tronquée (tiré de (Lowther *et al.* 2000)).

3.4.3. La MsrA de *Mycobacterium tuberculosis*

La MsrA de *M. tuberculosis* (Taylor *et al.* 2003) fait partie de la sous-classe 2, c'est à dire que les deux premiers résidus cystéine impliqués dans la catalyse sont présents, mais pas le troisième. Cependant, si Cys13 est à tout point de vue équivalent à Cys51 de l'enzyme d'*E. coli* au sein du motif conservé $_{50}\text{GCFW(G/C)}_{54}$, Cys154 est, ici, à une position décalée d'un résidu supplémentaire par rapport à la position équivalente à Cys198. En effet, un résidu thréonine se trouve entre Tyr152 et Cys154, constituant ainsi un exemple de l'insertion (notée "x") au sein du motif conservé GYxC (voir paragraphe 3.3.1). Il en résulte une orientation différente de cette cystéine de recyclage dans la structure, par rapport aux équivalents chez *E. coli* et *B. taurus*, dirigeant le groupement thiol vers Cys13 avec lequel il forme un pont disulfure lors de la première étape de recyclage (Taylor *et al.* 2003). Ainsi, les remaniements structuraux nécessaires au rapprochement des deux résidus Cys13 et Cys154 ne devraient pas inclure une réorientation du résidu Cys154, comme ce serait *a priori* le cas pour Cys198 de l'enzyme d'*E. coli* ou Cys218 de celui du bœuf.

Par ailleurs, la partie N-terminale de la protéine est plus courte que dans les deux structures résolues auparavant ; il n'existe pas de long fragment peu structuré comme observé dans la structure de la MsrA d'*E. coli*, par exemple. Deux résidus appartenant au fragment

espaçant la protéine de la queue ("Tag") histidine (His0 et Arg1⁻) sont modélisés en amont du résidu Met1. Ce dernier se loge dans le site actif d'un voisin symétrique (voir ci-après). Seize résidus ne sont pas représentés en C-terminal, du fait d'une trop grande agitation ; ici également, l'extrémité C-terminale est très flexible, apportant une indication supplémentaire sur la nécessité pour les différentes formes de MsrA d'avoir une flexibilité au niveau de cette région de la structure.

Les résidus du site actif de cette structure sont en interaction avec le résidu Met1 d'un voisin symétrique. Dans la mesure où il n'établit pas de liaison covalente avec Cys13 (équivalent à Cys51 de l'enzyme d'*E. coli*), contrairement au diméthyl-arsenate ou à l'adduit DTT des deux structures précédentes, Met1, ici, serait plus mimétique de l'association avec le substrat au sein d'un complexe du type michaelien. Les mêmes types d'interactions que ceux décrits auparavant sont observés. En effet, la partie aliphatique de la chaîne latérale de Met1 est en collapse hydrophobe avec Trp15 et Phe14 (équivalents à Trp53 et Phe52 de la MsrA d'*E. coli*) et Tyr92, Tyr44 et Glu52 (équivalents à Tyr134, Tyr82 et Glu94 de l'enzyme d'*E. coli*) interagissent avec une molécule d'eau. La paire Tyr152-Asp87 (équivalents à Tyr197-Asp129 dans l'enzyme d'*E. coli*) interagit avec les atomes constituant la liaison peptidique entre Met1 et His0 : la chaîne latérale de Asp87 forme une liaison hydrogène avec l'atome d'azote, et la liaison peptidique établit une interaction π - π avec le noyau aromatique de Tyr152 (Figure 25).

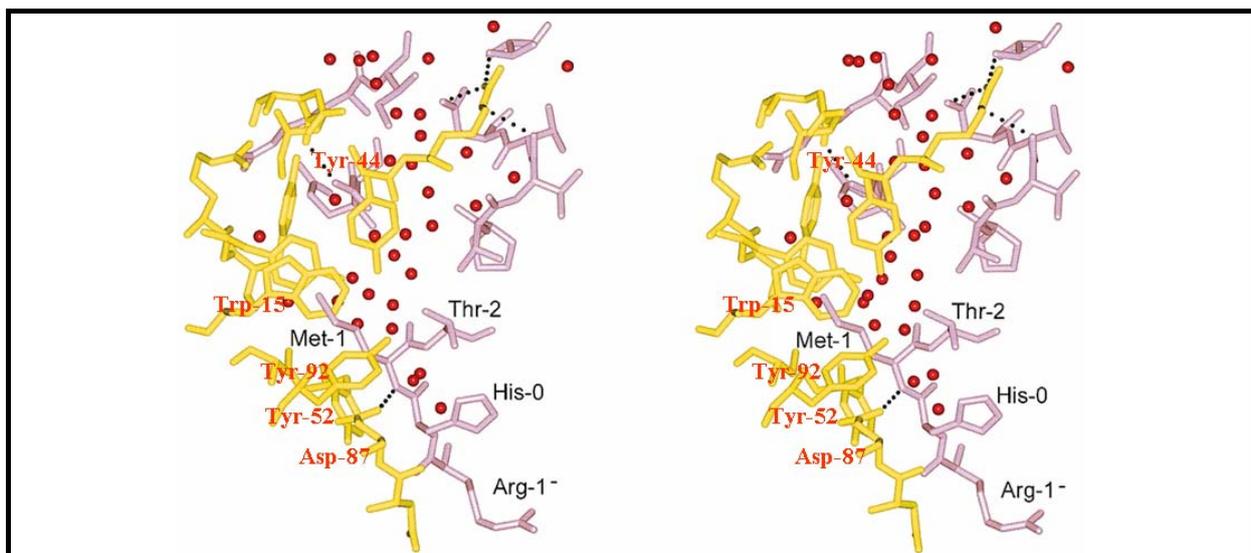


Figure 25

Représentation stéréo du site actif de la MsrA de *M. tuberculosis*.

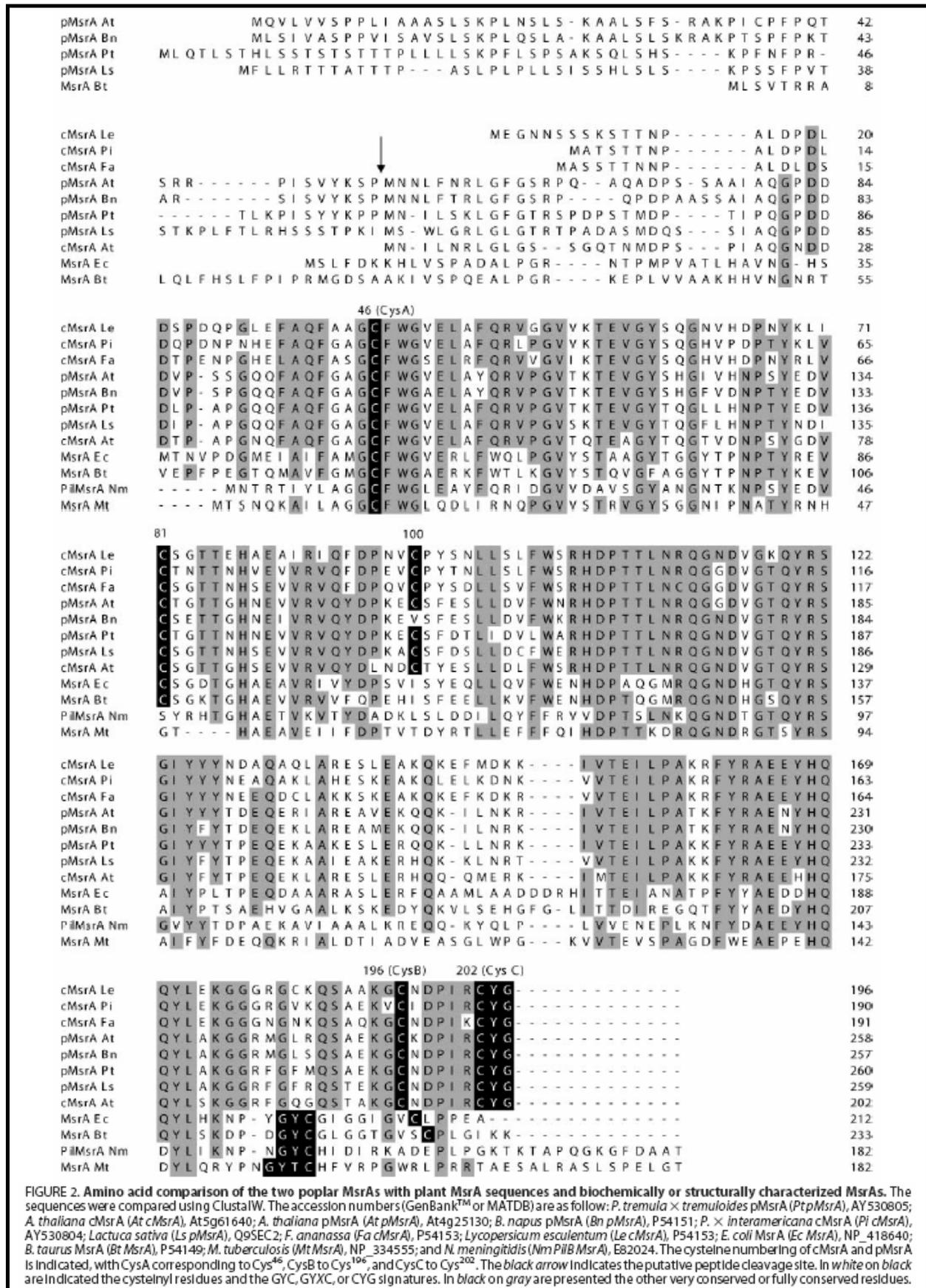
Le site actif contient le résidu Met1 (en mauve) d'un monomère voisin dans le cristal (tiré de (Taylor *et al.* 2003)).

3.4.4. La MsrA de *Populus trichocarpa*

La structure de la MsrA issue du peuplier correspond à l'isoforme chloroplastique (produit de l'un des cinq gènes *msrA* de l'organisme et prédit pour être dirigé vers cet organite, (Rouhier *et al.* 2007)). Si l'on se réfère au nombre de résidus cystéine impliqués dans la catalyse (trois, ici), cet enzyme serait à placer parmi ceux de la sous-classe 1 décrite plus haut (voir paragraphe 3.3.1). Il présente néanmoins certaines différences par rapport aux enzymes issus du bœuf ou d'*E. coli*, tant sur le plan biochimique que structural ; des particularités qui peuvent être généralisées aux MsrA de plantes, si l'on se réfère à l'analyse des séquences (Figure 26). En effet, si Cys46 conserve toutes les caractéristiques de son équivalent Cys51 de l'enzyme d'*E. coli*, les deux autres résidus cystéine (Cys196 et Cys202) ne s'alignent pas avec Cys198 et Cys206, bien qu'ils appartiennent aussi au fragment C-terminal. En outre, le motif GYxC incluant CysB, commun aux MsrA des sous-classes 1 et 2 telles qu'elles sont définies dans le paragraphe 3.3.1 est absent dans cette séquence. En revanche, il s'y dessine un motif ${}_{202}\text{CYG}_{204}$ – où l'ordre des résidus est inversé – retrouvé dans les autres séquences de MsrA issues de plantes (Figure 26).

Les résultats biochimiques indiquent que Cys196 et Cys202 sont tous les deux impliqués dans le recyclage de l'enzyme, mais ils ne permettent pas d'établir sans ambiguïté l'ordre de formation des ponts disulfures apparaissant lors de cette étape, contrairement au cas d'*E. coli* où il paraît clair que Cys198 forme un premier pont disulfure avec Cys51, puis Cys206 établit un deuxième pont disulfure avec Cys198, ce dernier étant celui préférentiellement réduit par la Trx (Boschi-Muller *et al.* 2000) (voir paragraphe 3.2). La structure cristallographique montre que Cys202 est plus proche de Cys46 (7.8 Å) que ne l'est Cys196 (19.9 Å) (distances entre atomes C α) ; une rotation autour de la liaison C α -C β de chacun des deux résidus Cys46 et Cys202 peut amener les deux atomes S γ à 3.3 Å l'un de l'autre. Ainsi, la formation d'un pont disulfure entre ces deux résidus semble plus favorable qu'entre Cys46 et Cys196.

Cette apparente inversion des rôles des deux résidus cystéine C-terminaux est directement liée à un repliement différent du fragment C-terminal dans son ensemble, comparativement aux structures décrites jusqu'ici. En effet, bien que peu structurés, les fragments C-terminaux des structures de MsrA issus d'*E. coli*, du bœuf et de *M. tuberculosis* s'étendent grossièrement vers la même direction dans les structures globales. Au contraire,



dans la structure de la MsrA du peuplier (Rouhier *et al.* 2007), à partir du résidu Lys182, le fragment C-terminal prend une nouvelle direction, à 90° de celles des trois structures précédentes, et prend une conformation totalement différente. Les chaînes principales des résidus du motif $_{202}\text{CYG}_{204}$ y sont ramenées vers la région occupée par le motif GYxC – incluant CysB des enzymes appartenant aux sous-classes 1 et 2 – dans les structures superposées, mais la chaîne polypeptidique de la MsrA du peuplier prend un sens en antiparallèle par rapport aux autres. Il en résulte que Tyr203 se superpose à Tyr217 de la MsrA de boeuf ou Tyr152 de la MsrA de *M. tuberculosis* (équivalents à Tyr197 dans l'enzyme d'*E. coli*), et établit une liaison hydrogène avec Asp124 (équivalent à Asp129 dans l'enzyme d'*E. coli*), constituant une paire tout à fait comparable à celle à l'entrée du site actif des autres structures.

Ici également, le site actif est occupé par une entité externe : une molécule de β -mercaptoéthanol liée covalentement à Cys46, dans ce cas. En ce sens, cet adduit constitue un modèle supplémentaire représentant l'état de transition de type sulfurane. En effet, l'atome de soufre en liaison covalente avec Cys46 prend une position similaire à celui pris par l'atome d'arsenic du diméthyl-arsenate au sein du site actif de la MsrA d'*E. coli*, ou encore l'atome de soufre équivalent de l'adduit DTT dans le site actif de la MsrA de boeuf. Le restant de l'adduit β -mercaptoéthanol s'allonge d'une manière similaire au résidu Met1 présent dans le site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* et le groupement hydroxyle forme une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de Asp124, comme le fait l'azote de la chaîne principale du résidu Met1, avec Asp87 dans la molécule issue de *M. tuberculosis* (Figure 27).

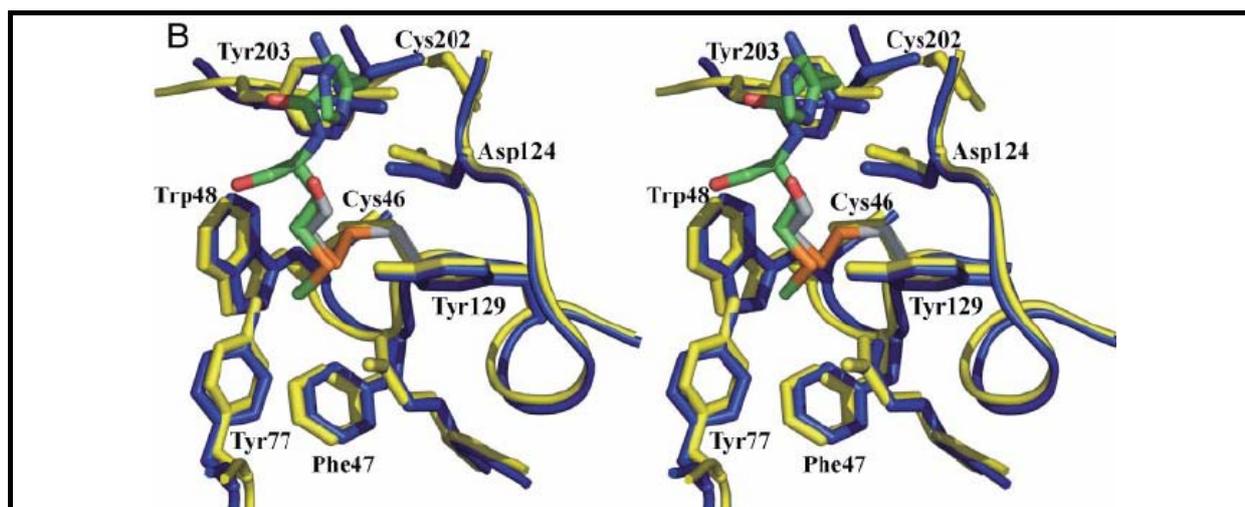


Figure 27

Représentation stéréoscopique du site actif de la MsrA de peuplier (bleu), superposée à celui de la MsrA de *M. tuberculosis* (jaune).

Dans la structure de la MsrA de peuplier, une molécule de β -mercaptoéthanol est liée à la cystéine catalytique Cys46. Dans le site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* vient se loger le résidu Met1 (en vert) d'un monomère voisin dans le cristal.

3.4.5. Etude par RMN de la MsrA d'*E. coli*

L'étude structurale par RMN de la MsrA d'*E. coli* (Coudeville *et al.* 2007) est du même type que celle menée ici avec l'enzyme issue de *N. meningitidis* (voir paragraphe 4) par cristallographie : c'est une caractérisation de différentes étapes du mécanisme à partir d'échantillons de la protéine sous plusieurs formes, représentatives de l'enzyme à un stade particulier de l'acte catalytique.

La structure globale de la forme sauvage réduite a été déterminée, ainsi que celle représentant l'une des formes oxydées de l'enzyme, celle en pont disulfure Cys51-Cys198. L'obtention de cette dernière a utilisé un mutant de substitution C86S/C206S, permettant notamment d'empêcher l'apparition du deuxième pont disulfure Cys198-Cys206. L'oxydation de l'enzyme a été obtenue en incubant la protéine avec un excès de MetSO, puis par une élimination du produit Met et de l'excès de MetSO par filtration sur gel. Enfin, un suivi de la fixation du substrat a été effectué sur un mutant inactif C51A, en observant les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) d'atomes du squelette peptidique (spectres HSQC ^1H - ^{15}N) en fonction de l'augmentation du rapport [Substrat]/[Enzyme] (le substrat utilisé étant Ac-L-Met(*R,S*)-SO-NHMe, présentant une haute affinité, voir paragraphe 3.1).

La forme réduite en solution conserve le même repliement global que celui révélé par la structure cristallographique de la même protéine : une superposition des deux modèles entre les résidus en position 12 et 193 donne un r.m.s.d. de 1.27 Å. En particulier, ici également, les fragments N- et C-terminaux sont observés peu structurés. En conséquence, la conformation du site actif est maintenue telle qu'elle est observée dans la structure cristallographique, résultant notamment du fait que Trp53, Phe52, Tyr82, Tyr134 et Asp129 sont observés sous une conformation similaire à celle qu'ils adoptent dans la structure cristallographique. Au contraire, Glu94 et Cys51 y présentent chacun une conformation différente, correspondant essentiellement à une orientation différente de leurs chaînes latérales. Les conformations observées pour Glu94 et Cys51 sont propres à cette structure en solution. Dans toutes les structures cristallographiques, ces deux résidus prennent chacun une autre conformation, conservée, y compris dans les structures de MsrA de *M. tuberculosis* ou dans celle de la forme native de la MsrA de boeuf où les résidus cystéine équivalents à Cys51 ne sont pas en liaison covalente avec une entité externe. De la même façon, dans la structure RMN de la MsrA d'*E. coli*, Cys198 et Tyr197 présentent une conformation différente, comparativement à la structure cristallographique. Ceci peut s'expliquer par la flexibilité du

fragment C-terminal, additionnée au pont disulfure intermoléculaire impliquant Cys206 formé dans le cristal (voir paragraphe 3.4.1) qui apporte une contrainte dans cette région de la structure. Malgré tout, les conformations des chaînes latérales de Cys198 et Tyr197 diffèrent également de celles observées pour les résidus équivalents dans les structures de MsrA du bœuf et de *M. tuberculosis*. En particulier, dans la structure RMN, il n'existe pas de liaison hydrogène entre Tyr197 et Asp129.

En utilisant le mutant C51A, le suivi des variations des $\Delta\delta$ des atomes ^1H et ^{15}N du squelette peptidique dues à la présence du substrat désigne les résidus impliqués dans la fixation de ce dernier. Il est à mentionner que Glu94 présente un $\Delta\delta$ peu élevé mais significatif, certainement en rapport avec un changement de conformation provoqué par une interaction avec le substrat. De même, les résidus du fragment Tyr195-Cys198 présentent une perturbation due à la fixation du substrat, indiquant une adaptation de la conformation de ce segment. Ces observations pourraient en partie expliquer les différences structurales observées par rapport aux structures cristallographiques, notamment concernant Glu94 et Tyr197 ; dans les cristaux, ces résidus seraient alors sous des conformations adaptées pour interagir avec le substrat.

La structure de la forme oxydée (Coudeville *et al.* 2007) présentant un pont disulfure 51-198 dévoile une modification inattendue de la conformation du fragment Gln122-Thr132, contenant le résidu Asp129 (dont un rôle présumé est d'interagir avec la chaîne principale du substrat : voir précédemment). En effet, ce fragment ne se trouve plus stabilisé contre la partie centrale de la protéine (où il forme les deux petits brins $\beta 3'$ et $\beta 3''$) mais s'étend vers l'extérieur de la structure globulaire où il est beaucoup plus agité (Figure 28). Il s'ensuit une exposition accrue des résidus du site actif, en particulier des résidus hydrophobes le constituant. Les auteurs proposent que cette conformation "ouverte", associée à une augmentation de l'hydrophobicité en surface, favorise la fixation de la Trx, le partenaire de recyclage qui catalyse la réduction du pont disulfure intra-moléculaire.

Une situation similaire est observée dans l'enzyme issu de *N. meningitidis* : l'oxydation de la protéine correspondant à la formation du pont disulfure équivalent à Cys51-Cys198 est associée à un changement de la conformation du fragment équivalent à Gln122-Thr132, de sorte que les résidus du site actif sont plus exposés au solvant (résultat développé dans la partie B, section III).

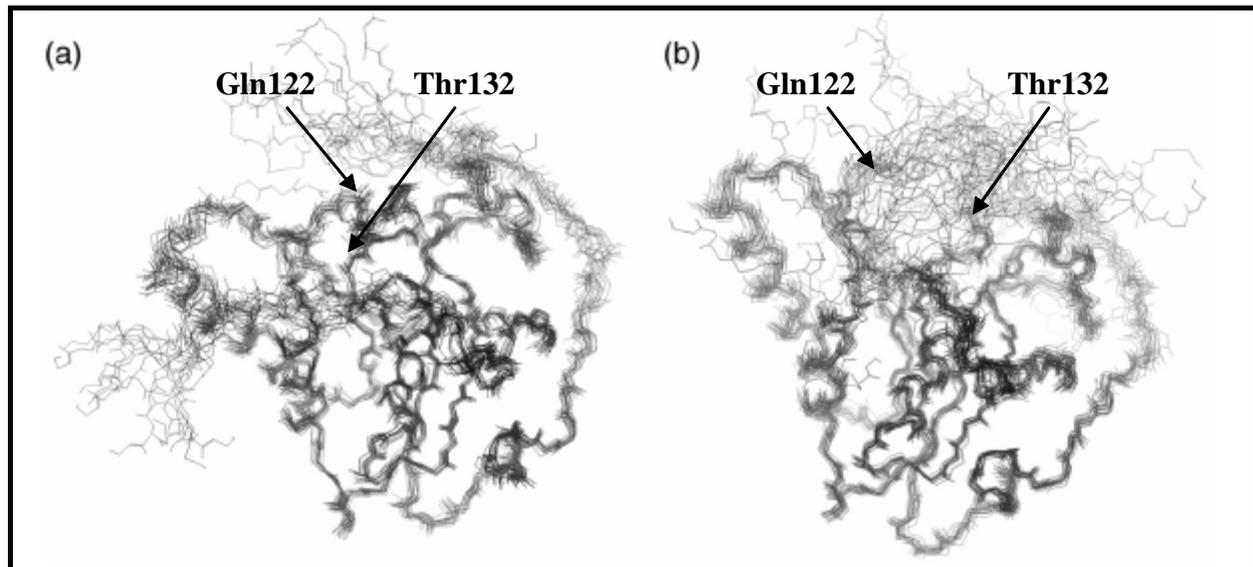


Figure 28 Représentation des squelettes carbonés superposés des 20 modèles finaux déterminés par RMN pour la MsrA d'*E. coli* sous forme réduite (a) et oxydée (b) (tiré de (Coudeville *et al.* 2007)).

Ainsi, plusieurs études structurales ont été menées sur les MsrA, certaines des conclusions effectuées avec les unes sont confirmées avec les autres, mais chacune présente des particularités qui contribuent à la compréhension du fonctionnement structural de ces enzymes. En comparaison, une seule structure de MsrB a été publiée.

3.5. Etude structurale de la MsrB

Lowther et collaborateurs ont déterminé la structure cristallographique du domaine MsrB de la protéine PilB de *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) (résidus 375-522 produits isolément de la séquence originale, sous forme de protéine recombinante utilisant *E. coli*) ((Lowther *et al.* 2002), code PDB : 1L1D ; voir paragraphes 2.3.2.1 et 3.6). Cette structure constitue la seule structure cristallographique de MsrB disponible, si l'on exclut les structures de MsrB issues de *N. meningitidis* et de *X. campestris* traitées plus loin dans ce manuscrit.

Le repliement de la protéine s'organise autour de deux feuillets β antiparallèles respectivement de trois et six brins, se faisant approximativement face l'un à l'autre (Figure 29). Trois hélices α et cinq courtes hélices 3_{10} se forment autour de ces deux feuillets β de cœur. En numérotant les éléments de structures secondaires en suivant la séquence, les hélices

$\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont formées en N-terminal, en amont du premier brin $\beta 1$, tandis que l'hélice $\alpha 3$ est formée en C-terminal, en aval du dernier brin $\beta 9$. Les deux feuillets β antiparallèles du cœur sont formés respectivement par les brins $\beta 1, \beta 2$ et $\beta 9$ et les brins $\beta 3$ à $\beta 8$. Il est à noter que les deux brins $\beta 3$ et $\beta 4$ sont particulièrement courts et que la boucle qui les joint est bien plus ouverte qu'un coude classique reliant deux brins β antiparallèles. La cystéine de recyclage Cys440 appartient à cette boucle, au sein d'un segment relativement bien conservé ${}_{438}\text{SGCGWPS}_{444}$ (Figure 29).

La cystéine catalytique Cys495 (Cys117 dans la MsrB d'*E. coli*, voir paragraphe 3.3.2) est située au sein du brin $\beta 7$, dans le fond d'une cavité plus étroite que celle du site actif de la MsrA. De part et d'autre de cette cavité par rapport à Cys495 se situent respectivement Trp442 et His480. Enfin, les chaînes latérales des résidus His477, Asn497 et Thr403 stabilisent une molécule d'eau, proposée interagir avec l'oxygène du groupement sulfoxyde du substrat en même temps que la chaîne latérale de His480 (voir ci-après).

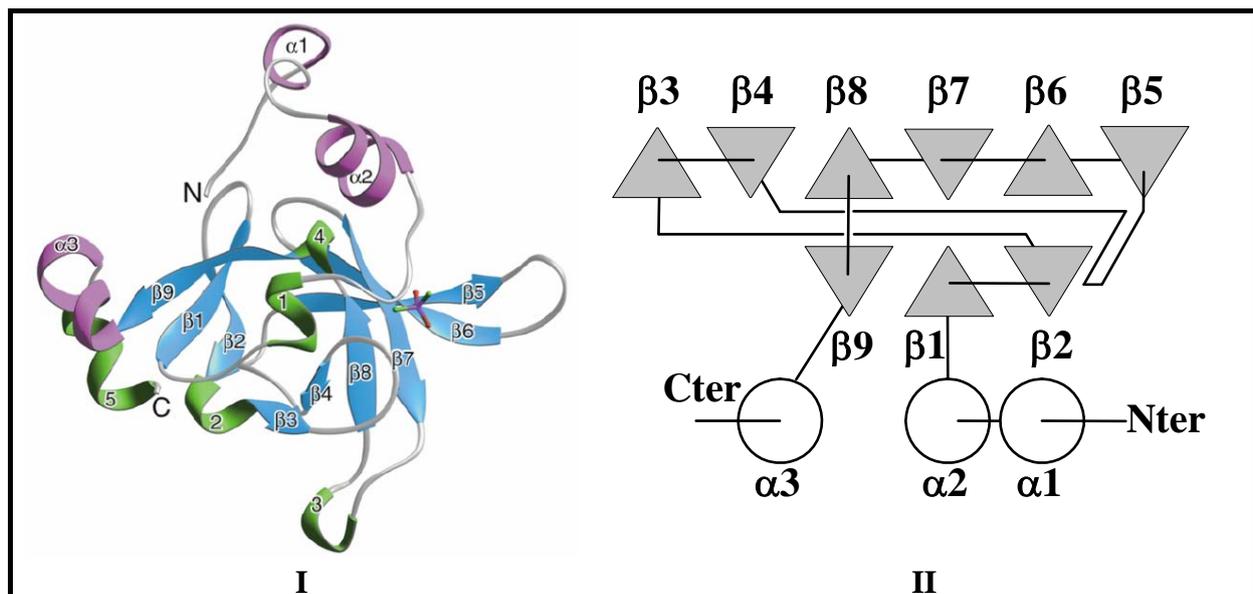


Figure 29

Repliement du domaine MsrB de *N. gonorrhoeae*.

(I) Représentation en flèches et rubans de la structure globale (tirée de (Lowther *et al.* 2002)) et (II) schéma topologique représentant l'organisation des hélices α et des feuillets β . Les hélices 3_{10} de petite longueur n'ont pas été représentées.

Une molécule de cacodylate issue du milieu de cristallisation est stabilisée de manière non covalente au sein du site actif de l'un des deux monomères présents dans l'unité asymétrique (monomère A). Un de ses atomes d'oxygène forme deux liaisons hydrogène, l'une avec l'azote N δ 1 de His480 et l'autre avec la molécule d'eau stabilisée par His477, Asn497 et Thr403. Les groupements méthyles sont en contact hydrophobe avec le noyau

indole de Trp442. Cette interaction fortuite au sein du site actif est jugée mimétique de l'interaction naturelle qu'établit l'enzyme avec le substrat, similairement aux composés retrouvés dans les sites actifs des structures cristallographiques de MsrA. Ainsi, l'oxygène du cacodylate interagissant avec His480, et la molécule d'eau mentionnée ci-dessus symboliserait la position prise par l'atome d'oxygène d'un résidu MetSO et les groupements méthyles en interaction avec Trp442 correspondraient au méthyle ϵ et au méthylène γ de la chaîne latérale. Le site actif du monomère B, quant à lui, est également occupé par un composé externe, mais, cette fois, il s'agit du résidu Asn463 d'un voisin symétrique. Les interactions établies sont similaires à celles observées avec la molécule de cacodylate : l'atome O δ 1 interagit par liaisons hydrogène avec la chaîne latérale de His480 et la molécule d'eau stabilisée par le triplet His477, Asn497, Thr403, tandis que la partie aliphatique du restant du résidu est stabilisé par Trp442.

A partir d'une comparaison avec la MsrA de boeuf, les auteurs mettent en lumière le fait que l'organisation spatiale des résidus composant ce site actif lui confère une conformation "en miroir" par rapport à celui de la MsrA, bien que les résidus en question soient de nature différente (Lowther *et al.* 2002). Cette observation est directement liée à la stéréospécificité de chaque classe de Msr et correspond à l'adaptation de chaque protéine à la chiralité existant au niveau du soufre au sein des résidus MetSO. Ainsi, deux régions à rôles similaires se dessinent, situées de part et d'autre de chaque cavité : une zone hydrophobe, formée par Trp442 dans la structure de la MsrB, dont l'équivalent est la poche créée par Trp74 et Phe73 dans la MsrA de boeuf, et une zone hydrophile formée par His480 et la molécule d'eau mentionnée plus haut, dont l'équivalent chez la MsrA de boeuf est celle créée par les chaînes latérales de Glu115, Tyr103 et Tyr155. Le rôle attribué à la première zone est d'interagir avec les groupements aliphatiques du substrat, en particulier le méthyle ϵ et le méthylène γ , et celui de la zone hydrophile est d'interagir avec l'oxygène de la fonction sulfoxyde (Figure 30).

Par ailleurs, dans cette structure cristallographique, les deux résidus cystéine formant un pont disulfure lors de l'étape de recyclage (Cys495 et Cys440, respectivement équivalents à Cys117 et Cys63 chez la MsrB d'*E. coli*) sont suffisamment proches l'un de l'autre pour pouvoir former le pont disulfure attendu sans remaniement du repliement. En effet, les deux atomes S γ des cystéines en question sont distants de seulement 3.0 Å. Cette donnée constitue sans doute un avantage sur le plan de l'évolution de ces protéines. Cependant la position de la cystéine de recyclage n'est pas toujours conservée au sein des MsrB : en effet, à peu près 30

% des MsrB ne possèdent pas de cystéine à la position équivalente de Cys440 (Cys63 chez *E. coli*, voir paragraphe 3.3.2). Le cas de la MsrB de *X. campestris* est un exemple illustrant ce cas de figure. Cette protéine possède également deux résidus cystéine impliqués dans le mécanisme catalytique, mais sa cystéine de recyclage est située dans le fragment N-terminal de sa séquence, dans la boucle reliant $\alpha 2$ à $\beta 1$ si l'on se base sur la structure de la MsrB issue de *N. gonorrhoeae* (voir Figure 29). Or cet enzyme a été caractérisé en biochimie et présente des caractéristiques cinétiques similaires à celles du domaine MsrB de PilB issu de *N. meningitidis* (Neiers *et al.* 2004). Aussi, des différences entre les deux conformations de MsrB sont attendues de par la nécessité de l'établissement du pont disulfure lors du processus de recyclage de l'enzyme issu de *X. campestris*. Les résultats développés dans la partie B, section IV, paragraphe 2.3.1 décrivent la nature des différences conformationnelles en question.

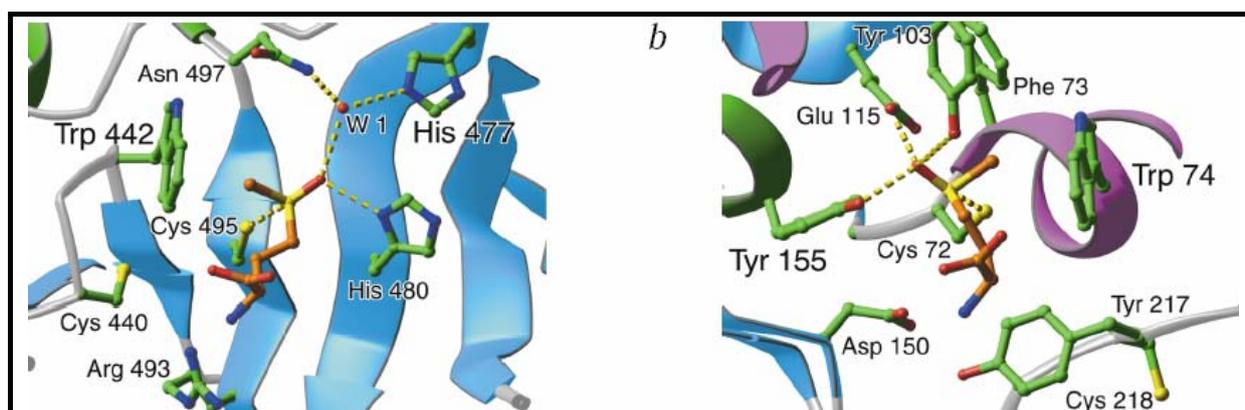


Figure 30 Représentation des sites actifs de la MsrB de *N. gonorrhoeae* et de la MsrA de bœuf
La fixation du substrat MetSO est modélisée dans chaque cas (tiré de (Lowther *et al.* 2002))

Enfin, il est à noter qu'une structure de MsrB déterminée par RMN a été déposée dans la PDB. Il s'agit de la MsrB de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), faisant partie du projet de génomique structurale "Northeast Structural Genomics" (Cible SR10) ; aucun article traitant de cette structure n'a été publié. Elle constitue un modèle de MsrB en solution, qu'il convient de comparer avec les différentes structures obtenues par cristallographie (celle du domaine MsrB de la protéine PilB de *N. gonorrhoeae* décrite ci-dessus additionnée de celles du domaine MsrB de la protéine PilB *N. meningitidis* et de la MsrB de *X. campestris* décrites plus loin). Sa description sera effectuée dans la partie B section IV paragraphe 3.1.

3.6. La protéine PilB de *Neisseria meningitidis*

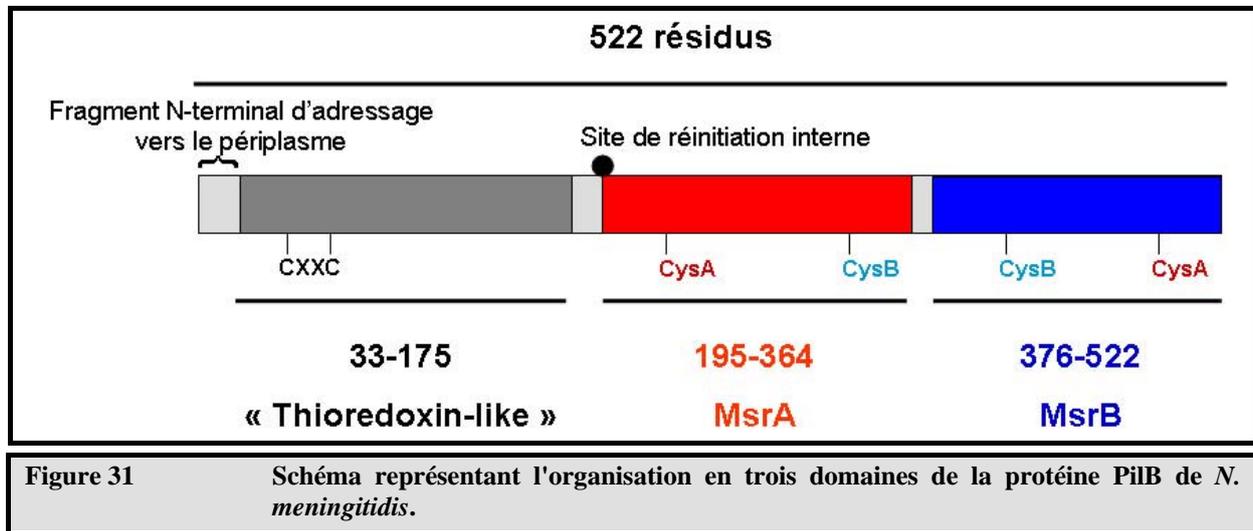
3.6.1. Présentation de la protéine et rôle cellulaire

A l'origine, la protéine PilB était pensée être impliquée dans la régulation de la transcription du gène *pilE* dont le produit est le constituant majeur du pili des bactéries du genre *Neisseria* (bactéries Gram-négatives) – d'où l'appellation de la protéine (Taha *et al.* 1988). En utilisant des souches de *N. gonorrhoeae*, Skaar et collaborateurs ont démontré non seulement que cette protéine n'est pas impliquée dans le processus de piliation, mais également qu'elle permet à la bactérie de résister à un stress oxydant provoqué par une exposition à H₂O₂ ou O₂⁻ (Skaar *et al.* 2002). Dans le cadre de sa pathogénicité, la protéine PilB participerait ainsi à la résistance de la bactérie au stress oxydant induit par les leucocytes de l'hôte ("oxidative burst" provoqué par les phagocytes, notamment).

La protéine PilB contient 522 résidus. Sur le plan structural et fonctionnel, elle se décompose en trois domaines. Dans les faits, un site de réinitiation interne de la traduction (correspondant au résidu Met195) fait qu'elle est exprimée sous deux formes, la deuxième ne contenant que deux domaines, le domaine central et le domaine C-terminal. Par ailleurs, en amont du domaine N-terminal se trouve un peptide signal d'export suivi d'un segment hydrophobe permettant à la protéine de s'ancrer à une membrane ; c'est ainsi que la protéine incluant les trois domaines a été localisée dans la membrane externe de la bactérie, tandis que la forme tronquée en 195 est présente dans le cytoplasme (Skaar *et al.* 2002). La protéine de *N. meningitidis* présente 97 % d'identité de séquence avec celle de *N. gonorrhoeae*. Les deux protéines sont donc quasiment identiques et les conclusions tirées de l'étude de l'une sont probablement transposables au cas de l'autre.

Le domaine N-terminal présente des caractéristiques similaires aux disulfures oxydoréductases du type Trx, en particulier un centre redox au niveau d'un motif CXXC comparable à celui de la Trx. Le domaine central présente une activité MsrA avec deux résidus cystéine impliqués dans le mécanisme (CysA et CysB). Enfin, le domaine C-terminal a une activité MsrB, avec également deux résidus cystéine impliqués dans la catalyse (voir paragraphes suivants) (Figure 31). Au vu du mécanisme catalytique des Msr (voir paragraphe 3.2), et étant donné que la Trx – une protéine cytoplasmique – ne peut certainement pas interagir avec la forme extra-cytoplasmique de PilB, une hypothèse probable est que le rôle du domaine N-terminal est d'assurer le recyclage des domaines Msr, *in vivo*. Une telle fusion

des activités MsrA/B au sein d'une protéine à trois domaines est retrouvée uniquement chez quelques organismes, dont *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*). La protéine homologue à PilB issue de cet organisme présente un taux d'identité et de similarité de séquence de respectivement 46 % et 61 % (472 résidus alignés) avec PilB de *N. meningitidis*.



3.6.2. Le domaine N-terminal

Une recherche d'homologie aux résidus 33-175 de la protéine PilB de *N. meningitidis* dans les banques de données de séquences fait ressortir des protéines apparentées aux Trx (que l'on regroupera désormais sous l'appellation "protéines de type Trx"), bien que les taux de similarité résultant ne soient jamais très élevés. Ainsi, à partir d'une recherche dans la banque SwissProt/Uniprot, par exemple, des séquences protéiques de fonctions aussi variées que des Trx, des peroxyrédoxines, des glutathion peroxydases ou encore la tryparédoxine ressortent de cette analyse, avec des scores relativement proches les uns des autres, au point qu'il n'est pas possible d'attribuer une fonction au domaine N-terminal de la protéine PilB (dont l'appellation sera désormais abrégée sous la notation Dom1_{PilB}), uniquement sur la base de l'analyse de sa séquence. Néanmoins, un groupe de protéines se détachent quelque peu des autres, à savoir des disulfures oxydoréductases périplasmiques du type DsbE ("disulfide bond oxidoreductase E"), TlpA ('thioredoxin-like protein A') ou ResA (faisant partie de l'opéron *resABCDE* impliqué notamment dans la régulation de la respiration aérobie ou anaérobie chez *B. subtilis*). La protéine prédite pour être la plus proche de Dom1_{PilB} est ainsi la TlpA putative de *F. nucleatum* (code d'accès dans la banque UniProt Q8RGU0_FUSNN) (39 %

d'identité pour 111 résidus alignés). Il est à noter que Dom1_{PilB} se trouve être localisé dans le même compartiment cellulaire que les protéines ayant les séquences les plus proches. Ces protéines catalysent, en général, la réduction de ponts disulfures apparaissant inopinément sur des protéines exportées vers le périplasma, un milieu globalement oxydant, contrairement au cytoplasme qui est globalement réducteur ; ce sont donc des protéines dites réductrices. D'autres enzymes de type Trx catalysent la formation de ponts disulfures (enzymes oxydants) dans le milieu périplasmique, comme la DsbA chez *E. coli*, et d'autres encore y catalysent l'isomérisation de ponts disulfures, c'est à dire un remaniement des résidus cystéine impliqués dans leur formation, comme la DsbC d'*E. coli*, par exemple.

Les expériences de biochimie effectuées sur Dom1_{PilB} – produit et purifié sous forme de module indépendant – par le groupe du Professeur Guy Branlant ont montré que (i) les deux cystéines du motif ₆₇CPLC₇₀ correspondent effectivement à des cystéines réactives permettant des réactions d'oxydoréduction sous forme d'échanges de ponts disulfures, (ii) la valeur de pKa de Cys67 est estimée inférieure à 6, tandis que celle de Cys70 avoisine 9.3, (iii) au vu de la valeur de son potentiel redox de -0.232 V, la protéine est à considérer comme réductrice, à l'instar de la Trx 1 d'*E. coli* par exemple (potentiel redox : -0.270 V), et enfin (iv) la protéine est capable de catalyser le recyclage des domaines Msr de PilB (manipulations effectuées avec chaque domaine produit isolément) (Wu *et al.* 2005). Cependant, il est apparu que l'efficacité catalytique est bien meilleure avec le domaine MsrB qu'avec le domaine MsrA. Il est intéressant de constater que cette sélectivité apparente de Dom1_{PilB} en faveur du domaine MsrB est inversée dans le cas de la protéine issue de *F. nucleatum*. En effet, les résultats récents utilisant les domaines produits indépendamment de la protéine PilB issue de cet organisme montrent que l'efficacité catalytique est meilleure avec le domaine MsrA qu'avec le domaine MsrB (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). Enfin, la question concernant le processus de recyclage de Dom1_{PilB} reste en suspens. En effet, la localisation périplasmique exclut l'intervention de la Trx réductase (protéine cytoplasmique) directement sur Dom1_{PilB}, de la même manière qu'elle le fait avec la Trx. Par ailleurs les résultats biochimiques indiquent que même *in vitro*, les deux protéines ne réagissent pas entre elles (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). Un candidat pour ce rôle de recyclage est la protéine transmembranaire DsbD. En effet, récemment, il a été montré *in vitro* que le domaine N-terminal de cette dernière est capable d'échanger un pont disulfure avec Dom1_{PilB} issu de *N. gonorrhoeae*, comme il le ferait avec les protéines substrats caractérisées de la DsbD (Brot *et al.* 2006). Cependant, la DsbD est ancrée à la membrane interne de la bactérie, tandis que l'expérience de Skaar et collaborateurs indique que PilB est ancrée à la

membrane externe. Aussi, le mécanisme effectif de recyclage de Dom1_{PilB} *in vivo* reste à être élucidé dans le détail.

3.6.3. Le domaine MsrA

Le domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis* possède 39 % d'identité de séquence avec l'enzyme d'*E. coli*. C'est un enzyme de la sous-classe 2, c'est à dire qu'il ne possède que deux résidus cystéine impliqués dans la catalyse, équivalents à Cys51 et Cys198 de la MsrA d'*E. coli*. Dans la suite du manuscrit, cette séquence de l'enzyme d'*E. coli* servira de référence pour la numérotation des résidus.

Contrairement au cas de la MsrA de *M. tuberculosis* où un résidu thréonine vient s'insérer au sein du motif contenant CysB, ici le segment $_{196}\text{GYC}_{198}$ est conforme aux situations les plus fréquentes. Par ailleurs, le motif caractéristique $_{50}\text{GCWFG}_{54}$ est également retrouvé dans cette protéine. Aussi, en regard des différentes études structurales de MsrA, les résidus formant le site actif de cet enzyme – à part Cys51 et Cys198 – sont : d'un côté, Trp53 et Phe52 qui formeraient une poche hydrophobe, d'un autre les trois résidus Glu94, Tyr82 et Tyr134 dont les chaînes latérales interagiraient avec une molécule d'eau jugée mimétique de l'oxygène du sulfoxyde, et enfin les résidus Asp129 et Tyr197 dont le rôle putatif est d'interagir avec les atomes de la chaîne principale du substrat.

Le rôle de ces différents résidus dans la reconnaissance du substrat et la catalyse de l'étape réductase a été recherché en enzymologie, (Antoine *et al.* 2006 ; Gand *et al.* 2007).

D'une part, une étude des mutants de substitution des résidus Cys51, Cys198, Glu94, Tyr82 et Tyr134 en comparaison avec l'enzyme "sauvage" a conduit aux conclusions suivantes : (i) la valeur du pKa de Cys51 passe d'environ 9.5 à 5.7 en présence du substrat ; la fixation du substrat conduirait donc à une stabilisation de la forme thiolate de ce résidu, impliquant certainement la charge partiellement positive portée par l'atome du soufre de la fonction sulfoxyde (ii) Glu94, Tyr82 et Tyr134 n'ont pas de rôle important dans la reconnaissance du substrat, mais plutôt dans l'acte catalytique, vraisemblablement en stabilisant l'état de transition de type sulfurane et (iii) ils sont également impliqués, directement ou indirectement, dans l'activation de Cys51 lors de la fixation du substrat ; en effet, leur substitution conduit à une augmentation du pKa de Cys51 vers des valeurs plus basiques. Ceci s'expliquerait par le fait que leur interaction avec l'oxygène du sulfoxyde, augmente la polarisation de la liaison $\text{S}^{\delta+}-\text{O}^{\delta-}$. La synthèse de l'ensemble des observations a

amené à un scénario où un transfert de proton se déroule de Cys51 vers le substrat entrant dans le site actif ; Glu94, Tyr82 et Tyr134, en particulier Glu94, joueraient un rôle important, bien qu'indirect, dans ce transfert de proton (Antoine *et al.* 2006).

D'autre part les mutants de substitution des autres résidus – en particulier Phe52, Trp53, Asp129 et Tyr197 – du site actif ont également été étudiés afin de dégager leur implication dans la première étape. Les différents mutants ont permis de valider un rôle de la poche hydrophobe formée par Trp53 et Phe52 dans la reconnaissance du substrat, qui est révélée par une constante d'affinité apparente profondément modifiée par les différentes substitutions. En outre, les résidus interagissant avec Trp53 dans les structures cristallographiques, à savoir Tyr189 et His186 sont avérés impliqués dans le positionnement de Trp53, de sorte que la conformation de la poche hydrophobe soit optimale pour la reconnaissance du méthyle ϵ du résidu MetSO, notamment. L'efficacité de l'acte catalytique est également affectée par les mutations, indiquant un rôle de cette poche hydrophobe dans un positionnement optimal du substrat pour le déroulement efficace de l'étape réductase. Enfin, les deux résidus Tyr197 et Asp129 ont été également montrés être impliqués dans la reconnaissance du substrat – en particulier pour Asp129, bien que dans une mesure moindre que les résidus de la poche hydrophobe. Par ailleurs, aucun rôle discriminant de ces deux résidus n'a été observé en faveur du substrat Ac-MetSO-NHMe et en défaveur de l'acide aminé MetSO libre (Gand *et al.* 2007).

3.6.4. Le domaine MsrB

Le domaine MsrB contient également deux résidus cystéine impliqués dans la catalyse, en positions 495 (CysA) et 440 (CysB) sur la séquence de la protéine entière ; il fait partie des enzymes contenant une cystéine de recyclage (Cys440) en position équivalente à Cys63 de la MsrB d'*E. coli*. Comme dans le cas des MsrA, la numérotation des acides aminés de la MsrB d'*E. coli* est choisie pour référence (paragraphe 3.3.2).

Contrairement à l'enzyme d'*E. coli* et à la moitié des séquences de MsrB putatives, le domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* ne possède pas les deux signatures CXXC lui permettant de coordonner un ion zinc (voir paragraphe 3.3.2). La structure attendue pour cet enzyme est en tout point similaire à celle de *N. gonorrhoeae* décrite plus haut (voir paragraphe 3.5) (97 % d'identité de séquence). Aussi, comme dans ce cas, le site actif serait formé par les résidus Trp65 et His103 de part et d'autre de Cys117, et, dans le fond de la

cavité, une molécule d'eau fixée par His100, Asn119 et Thr26 (voir paragraphe 3.5). Cet enzyme possède 44 % d'identité avec la MsrB d'*E. coli*.

Comme dans le cas de la MsrA, cet enzyme a également été bien caractérisé en enzymologie (Neiers *et al.* 2007). Les conclusions issues de cette étude sont, dans une certaine mesure, similaires à celles effectuées avec le domaine MsrA.

En effet, là également une activation de Cys117 due à la fixation du substrat a été constatée : le pKa du groupement thiol de ce résidu passe d'environ 9.3 dans l'enzyme libre à 6.6 en présence du substrat. Cela amène à considérer aussi une stabilisation de la forme thiolate de ce résidu par la charge partiellement positive de l'atome de soufre du sulfoxyde. L'étude des mutants de substitution de His103, d'une part, et de l'un quelconque des trois résidus His100, Asn119 et Thr26, d'autre part, a conduit à conclure à un rôle catalytique de ces résidus, en ce sens que l'affinité apparente du substrat n'est pas (ou est peu) affectée, alors que la constante de vitesse de l'étape réductase l'est beaucoup plus. Ce rôle correspond vraisemblablement à une stabilisation de l'état de transition de type sulfurane. Trp65 a été montré déterminant dans la reconnaissance du substrat, de par le noyau aromatique de sa chaîne latérale, d'une manière similaire au rôle attribué à la poche hydrophobe formée par Phe52 et Trp53 du domaine MsrA. Il est également montré important dans le déroulement efficace de la catalyse, en contribuant à un positionnement optimal du substrat. Enfin, un rôle d'assistant acide/base a été reconnu pour le résidu His103, dont la valeur du pKa est estimée à 8.3 ; la forme catalytiquement active de l'enzyme correspond à un couple Cys117/His103⁺. Notamment, la substitution de ce résidu conduit à une augmentation de la valeur du pKa de Cys117 vers 9.0. Aussi, d'une manière similaire à Glu94 dans le domaine MsrA, His103 jouerait un rôle dans un transfert de proton de la Cys117 vers le substrat. Cependant, dans ce cas, un comportement variable en fonction du pH a été observé avec ce résidu (qui s'est traduit par une valeur de pKa mesurée), ce qui n'est pas le cas de Glu94 dans la MsrA.

4. Les objectifs du travail de thèse

Les objectifs de ce travail de thèse étaient les suivants :

1. Mener une étude par cristallographie aux rayons X de Dom1_{PilB} issu de *N. meningitidis* – le même domaine produit isolément que celui utilisé dans les expériences biochimiques (Wu *et al.* 2005). Ce travail a pour but de mettre à jour les caractéristiques structurales de cette protéine, sous-jacentes à sa fonction disulfure réductase, notamment en regard de sa réactivité vis-à-vis des domaines Msr oxydés. Des éléments structuraux à l'origine de sa particularité comparativement à la Trx1 – en particulier concernant la sélectivité d'action vis-à-vis des domaines Msr – sont également recherchés. Les structures des deux formes réduite et oxydée (en regard de la situation des deux résidus Cys67 et Cys70 en pont disulfure ou non) ont été obtenues, la première ayant fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Molecular Biology* (Ranaivoson *et al.* 2006) (Annexe 1).

Ces résultats sont développés dans la partie B, section II du manuscrit.

2. Caractériser les aspects structuraux à l'origine du mécanisme des MsrA, à travers l'étude cristallographique du domaine central de PilB. Le même domaine isolé que celui produit pour l'enzymologie est utilisé (voir (Antoine *et al.* 2003)).

Au début de ces travaux, les structures des formes réduite et oxydée de cette protéine avaient été résolues par le Docteur Brice Kauffmann, constituant une partie de ses travaux de thèse. Les modèles issus de ces travaux sont repris et affinés ici, de façon à intégrer leur analyse avec les résultats subséquents, et ainsi tenter de retracer le comportement structural de l'enzyme dans les premiers événements de l'acte catalytique.

La structure du complexe du type michaelien est étudiée en co-cristallisant la protéine avec le substrat de haute affinité Ac-L-Met-S-SO-NHMe (voir partie A, paragraphe 3.1). Pour éviter le déroulement de la catalyse, la cystéine catalytique Cys51 a été substituée en sérine. Grâce à l'utilisation d'un substrat réel, cette structure permettra de confirmer (ou d'infirmer) les hypothèses effectuées à partir des structures précédemment résolues, quant à l'association de l'enzyme avec son substrat. Par ailleurs, elle sera discutée en regard des résultats obtenus en enzymologie sur le rôle des résidus du site actif.

D'autre part, le mutant sur la cystéine de recyclage C198S est également étudié, de façon à isoler la protéine dans un état où Cys51 est oxydé en acide sulfénique, après une mise en présence d'un substrat (voir partie A, paragraphe 3.2). Cette structure permettra de discuter l'état conformationnel de la protéine à l'issue de l'étape réductase, et de rechercher les déterminants structuraux guidant notamment la formation du pont disulfure intra-moléculaire entre Cys51 et Cys198.

La partie B, section III traite de ces résultats.

3. Mener le même type d'études concernant les MsrB avec l'utilisation du domaine C-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis* (le même domaine MsrB produit sous forme de module indépendant que celui utilisé pour le mécanisme catalytique (Olry *et al.* 2004)).

Les structures des formes réduite et oxydée de cette protéine avaient également été résolues par le Docteur Brice Kauffmann lors de sa thèse, et ces résultats seront repris ici ; l'objectif étant, ici, également de dégager les variations conformationnelles de l'enzyme au cours des premières étapes du mécanisme catalytique.

La structure d'un premier complexe entre le substrat Ac-L-Met-R-SO-NHMe et le mutant C117S était disponible avant le début de ces travaux (travaux menés par le docteur Brice Kauffmann), mais dans celle-ci, la cystéine de recyclage a formé un pont disulfure inter-moléculaire avec un monomère voisin, associé à une disposition en vis-à-vis des deux sites actifs qui empêchait une analyse spécifique des interactions entre un monomère et le substrat. Aussi, les manipulations ont été reprises avec l'utilisation du double mutant C117S/C63S, pour empêcher la formation de ce pont disulfure.

La structure d'une forme oxydée en acide sulfénique n'a pas été obtenue lors de ces travaux.

Enfin, l'étude structurale de la MsrB de *X. campestris* viendra enrichir cette analyse, dans la mesure où cette protéine fait partie des 40% de MsrB qui n'ont pas un résidu cystéine de recyclage en position 63 : sa cystéine de recyclage est en position 31 (voir partie A, paragraphe 3.3.2). En outre, contrairement au cas de la protéine de *N. meningitidis*, cet enzyme contient les deux segments CXXC lui permettant de fixer un ion zinc.

La structure du mutant C117S en présence du substrat permettra une comparaison avec la structure du complexe du type michaelien du domaine MsrB de PilB.

La structure de la forme oxydée (en pont disulfure intramolécule Cys117-Cys31) révélera les conséquences de ce type de variabilité sur la position de la cystéine de recyclage

dans le repliement des MsrB en général et dans le cas de l'enzyme de *X. campestris* en particulier.

La partie B, section IV est consacrée à la description et à l'analyse de ces résultats.

4. Entamer une étude structurale de PilB en entier, à partir d'une forme soluble de la protéine. Une approche par diffusion des rayons X est utilisée de façon à obtenir les premières données structurales sur la disposition relative des différents domaines. Etant donné que les résultats obtenus lors de ces travaux nécessitent des expériences supplémentaires pour une analyse plus précise de la structure de la protéine, ils seront traités dans la partie C de ce manuscrit.

Partie B

Etudes structurales de
la protéine PilB
et d'une MsrB

SECTION I

Procédures expérimentales

1. Généralités

1.1. Les échantillons protéiques

Les échantillons ont été produits et purifiés au sein du groupe Enzymologie du Professeur Guy Branlant (MAEM) par les docteurs Mathias Antoine, Alexandre Olry et Fabrice Neiers. Pour chaque protéine étudiée, les protocoles expérimentaux ont été détaillés dans des publications : (Antoine *et al.* 2003) pour le domaine MsrA de la protéine PilB issue de *N. meningitidis*; (Wu *et al.* 2005) pour le domaine N-terminal de cette même protéine ; (Olry *et al.* 2004) pour son domaine MsrB ; et (Neiers *et al.* 2004) pour la MsrB de *X. campestris*. Les échantillons ont été fournis solubilisés dans un tampon TRIS HCl 50 mM pH 8.

Le domaine N-terminal ainsi produit va du résidu Val33 jusqu'au résidu Leu175 de la protéine PilB. En amont se trouve normalement la séquence d'adressage de la protéine naturelle vers la membrane externe (voir partie Introduction, paragraphe 3.6.1). Le domaine MsrA commence, quant à lui, au résidu Asn196 et se termine au résidu Thr388 et le domaine MsrB du résidu Thr376 au résidu Lys521 (Figure 1), ceci quelles que soient les formes étudiées (réduites, oxydées ou mutants de substitution). Les constructions génétiques correspondantes ont donné lieu aux meilleurs rendements de production de formes solubles parmi toutes celles testées (équipe Enzymologie du MAEM, communication personnelle). Les deux domaines Msr de PilB seront désormais référés en tant que MsrA et MsrB de *N. meningitidis*.

Enfin, la protéine MsrB de *X. campestris* étudiée a été produite à partir du gène *msrB* de la souche ATCC 13951.

Afin de rendre homogènes les différentes informations tirées des expériences faites avec des Msr issues d'organismes différents, une numérotation unique des résidus se révèle nécessaire : celle d'*E. coli* a été adoptée tant pour la MsrA (Figure 2) que pour la MsrB (Figure 3).

1.2. Les essais de cristallisation

Des essais de cristallisation préliminaires ont été effectués par criblage de conditions commerciales. Les conditions de Jena Biosciences (JBScreen : 240 conditions), Hampton Research (Crystal Screen 1 et 2 : 96 conditions) et Emerald Biostructures (Wizard Screen 1 et

	10	20	30	40	50	60	70	80
PilB
Dom1	-----	-----	-----	--VPHTLSTL	KTADNRPASV	YLKKDKPTLI	KFWASW	PLC
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	90	100	110	120	130	140	150	160
PilB
Dom1	AQDAKFSSAN	LITVASPGFL	HEKKDGFQK	WYAGLNYPKL	PVVTDNGGTI	AQSLNISVYP	SWALIGKDGD	VQRIVKGSIN
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	170	180	190	200	210	220	230	240
PilB
Dom1	EAQALALIRD	PNADLGS LKH	SFYKPD TQKK	DSKIMNTRTI	YLAGG	FWGL	EAYFQRIDGV	VDAVSGYANG
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	250	260	270	280	290	300	310	320
PilB
Dom1	SYRHTGHAET	VKVTYDADKL	SLDDILQYFF	RVVDPTSLNK	QGNDTGTQYR	SGVYYTDPAE	KAVIAAALKR	EQQKYQLPLV
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	330	340	350	360	370	380	390	400
PilB
Dom1	VENEPLKNFY	DAEYHQDYL	IKNPNGYCHI	DIRKADEPLP	GKTKTAPQ GK	GFDAATYKKP	SDAELKRTL T	EEQYQVTQNS
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	410	420	430	440	450	460	470	480
PilB
Dom1	ATEYAFSHEY	DHLFKPGIYV	DVVS GEPLFS	SADKYDSGCG	WPSFTRPIDA	KSVTEHDDFS	YNMRRTEVRS	HAADSHLGHV
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	490	500	510	520	530	540		
PilB		
Dom1	FDPGPRDKGG	LRYCINGASL	KFIPL EQMDA	AGYGALKSKV	K			
MsrA	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
MsrB	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

Figure 1

Séquence de la protéine PilB et de ses différents domaines produits pour l'étude en cristallographie.

Les cystéines catalytiques des différents domaines sont surlignées en rouge. La cystéine de résolution du domaine N-terminal est surlignée en vert. Les cystéines de recyclage des domaines MsrA et MsrB sont en cyan.

2 : 96 conditions) ont été systématiquement criblées. Au début, ces essais ont été effectués manuellement, en utilisant la méthode de "gouttes à l'huile" : 2 μ L de solution protéique et 2 μ L de solution de cristallisation ont été dispensés dans un des 72 puits d'une microplaque (du type "Microbatch plate" fournis par Hampton Research, par exemple) préalablement recouverte d'huile de paraffine, de sorte que les gouttes ainsi formées étaient préservées d'une évaporation grâce à l'huile qui les recouvraient. L'accès à un robot de cristallisation (modèle

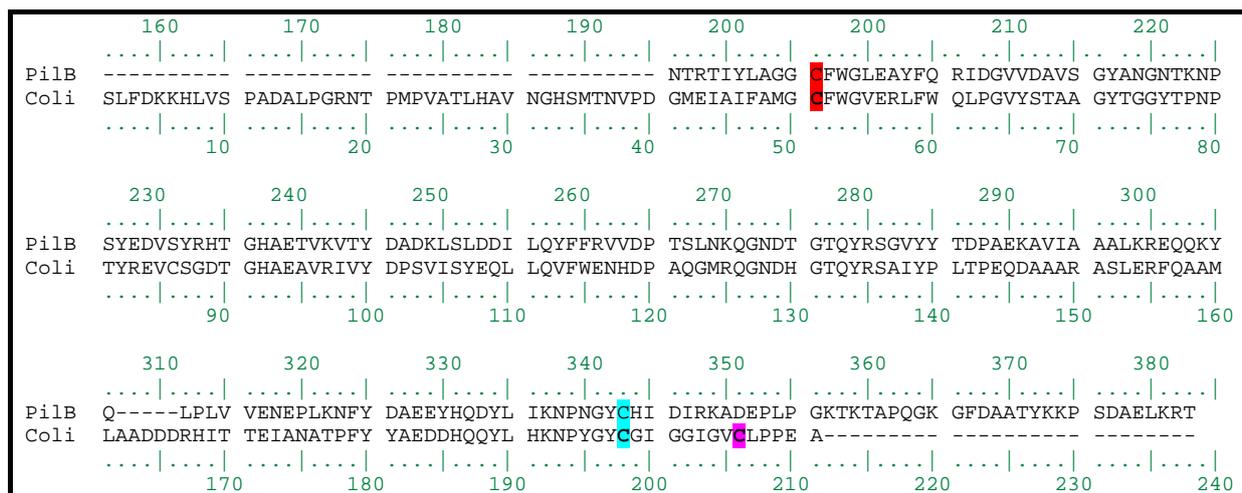


Figure 2

Alignement des séquences de la MsrA de *N. meningitidis* et de la MsrA d'*E. coli*.

La cystéine catalytique est surlignée en rouge, la cystéine de recyclage commune aux deux MsrA est en cyan. Une troisième cystéine intervenant ensuite dans le recyclage (surlignée en violet) est présente chez *E. coli* mais absente chez *N. meningitidis*. Les numérotations d'acides aminés de chaque enzyme sont indiquées, celle d'*E. coli* (en bas) servant de référence.

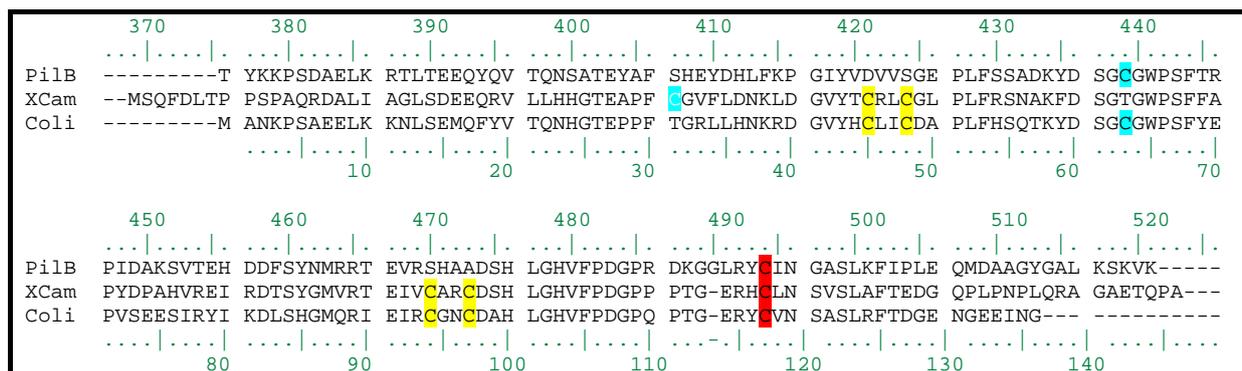


Figure 3

Alignement des séquences de la MsrB de *N. meningitidis*, de la MsrB de *X. campestris* et de la MsrB d'*E. coli*.

La cystéine catalytique est surlignée en rouge, la cystéine de recyclage est en cyan. Quatre cystéines (surlignées en jaune) liant un ion zinc sont observées dans les MsrB d'*E. coli* et de *X. campestris*. Les numérotations d'acides aminés propres aux MsrB de *N. meningitidis* et d'*E. coli* sont indiquées, celle d'*E. coli* (en bas) servant de référence.

Mosquito, de chez TTP Labtech, acheté par l'IFR111) a permis de faire les criblages, soit en gouttes à l'huile (microplaques de 96 puits), soit par la méthode de la diffusion de vapeur en gouttes assises : les gouttes ont été faites dans des boîtes de trois puits pour chaque réservoir. Cela a permis notamment de faire varier dans un seul essai les volumes des prélèvements ou les concentrations protéiques de départ, tout en ne prélevant que des petites quantités (100 ou 200 nL dans les manipulations ici). Les boîtes ont été stockées à 20 °C, et régulièrement observées à la loupe binoculaire pour détecter la présence de cristaux. Pour les travaux menés ici, souvent les cristaux obtenus lors de ces criblages ont été de taille et de qualité suffisantes pour une expérience de diffraction des rayons X. Toutefois pour quelques cas, il a fallu mener des manipulations visant à les optimiser, notamment en transposant les conditions de cristallisation d'intérêt pour les adapter à la méthode de diffusion de vapeur en gouttes suspendues, et en les modifiant légèrement. Ces manipulations ont été effectuées classiquement, dans des boîtes Linbro de 24 réservoirs, recouvertes hermétiquement par des lamelles sous lesquelles ont été déposées les gouttes (4 μ L, avec des rapports différents entre les volumes initiaux des solutions protéiques et des solutions de cristallisation). Dans toute la suite de ce manuscrit, les concentrations données seront celles des différentes solutions avant la formation des gouttes.

1.3. Les données de diffraction

Toutes les expériences de diffraction des rayons X sur les monocristaux obtenus ont été menées sur synchrotron, à Hambourg (les lignes EMBL de DESY) ou à Grenoble (ESRF). Les mesures ont été effectuées à 100 K, aussi, les cristaux étaient prélevés de leurs gouttes avec des boucles en nylon ("CryoLoop", fournies par Hampton Research) ou en Mylar ("LithoLoop", fournies par Molecular Dimensions Ltd) et plongés rapidement dans de l'azote ou de l'éthane liquide pour leur transport. Pour éviter la formation des cristaux de glace, parfois il a été nécessaire de plonger transitoirement les cristaux prélevés dans une solution cryoprotectrice. Cette dernière a été préparée par ajout de glycérol dans la solution mère ou une solution de composition voisine. Un transvasement rapide du cristal dans de l'huile visqueuse Paratone-N avant la cryogénéisation a été, certaines fois, utilisé à la place. Les données de diffraction collectées ont ensuite été indexées, intégrées et mises à l'échelle en utilisant soit XDS (Kabsch 1993), soit la suite HKL (Denzo pour l'indexation et l'intégration

et Scalepack pour la mise à l'échelle) (Otwinowski et Minor 1997). Dans les paragraphes qui suivent, les statistiques présentées permettent d'évaluer la qualité des différents jeux de données utilisés. Y apparaît entre autres le facteur R_{sym} qui quantifie le désaccord entre les intensités des différentes réflexions équivalentes par les symétries du groupe de Laue associé au groupe d'espace du cristal. Sa définition en est :

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^{j=n_{hkl}} |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}; \quad \text{avec } \langle I_{hkl} \rangle = \frac{1}{n_{hkl}} \sum_{j=1}^{j=n_{hkl}} I_{hkl,j}$$

$\langle I_{hkl} \rangle$: Intensité moyenne de la réflexion d'indices h,k et l

$I_{hkl,j}$: $j^{\text{ème}}$ mesure de l'intensité pour la réflexion d'indices h,k,l ou l'une de ses équivalentes par les symétries du groupe de Laue.

n_{hkl} : nombre d'observations pour la réflexion d'indices h,k,l

1.4. La résolution et l'affinement des structures

Mis à part les cas de la forme réduite du domaine N-terminal de PilB et de la forme oxydée de la MsrB de *X. campestris* dont les structures ont été résolues par la méthode de diffusion anormale à une longueur d'onde (SAD) (voir descriptions dans les paragraphes correspondants), toutes les structures résolues lors de ces travaux ont été obtenues par remplacement moléculaire. Les logiciels utilisés pour effectuer les remplacements moléculaires ont été CNS (version 1.0) (Brunger *et al.* 1998) ou MOLREP (Vagin et Teplyakov 1997) en recherchant les solutions de rotation et de translation par maximum de vraisemblance ; les solutions correctes se révélaient alors par des maxima des fonctions de rotation et de translation qui se dégagent très nettement des autres valeurs. Ce faisant, les données appartenant aux plus hautes couronnes de résolution n'ont pas été prises en compte ; la résolution maximale a été systématiquement limitée à 3 Å.

Les modèles ont été affinés contre les données cristallographiques en utilisant CNS (Brunger *et al.* 1998) ou REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997). Les modèles ont d'abord été affinés sous forme de corps rigides, puis plusieurs exécutions du programme pour un affinement de la position et/ou des facteurs d'agitation thermique isotropes des atomes ont été effectuées. Pour ce faire, les données aux plus hautes couronnes de résolution ont été prises en compte. A l'issue de chaque exécution du programme d'affinement, une vérification visuelle

du modèle et une reconstruction sur un système graphique ont été effectuées en utilisant TURBO/FRODO (Roussel et Cambillau 1991) ou COOT (Emsley et Cowtan 2004). Certains des modèles présentés nécessitent des cycles d'affinement plus poussés, mais en l'état, ils peuvent être exploités pour une analyse répondant aux objectifs posés (voir partie Introduction, paragraphe 4). Le déroulement des affinements est notamment évalué à partir du facteur R, parfois appelé facteur résiduel mais plus souvent facteur d'accord alors qu'il mesure en fait le désaccord entre les modules des facteurs de structures F_{obs} déterminés à partir des intensités mesurées pour les différentes réflexions hkl et les modules des facteurs de structure calculés à partir du modèle, pour les mêmes réflexions hkl :

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{hkl obs}| - |F_{hkl calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{hkl obs}|}$$

De plus, afin d'éviter les problèmes de sur-affinement, le facteur R_{libre} a été introduit. Sa définition en est la même que celle du facteur R, mais il ne porte que sur une fraction des réflexions (5 à 10 %), non utilisées dans l'affinement, le facteur R classique portant alors sur la majeure partie des réflexions sur lesquelles le modèle est effectivement affiné. A titre d'indication, ces deux facteurs seront reportés pour les modèles non affinés, c'est-à-dire après les procédures de remplacement moléculaire et en tenant compte des données de la gamme de résolution utilisée pour l'affinement. Puis ces valeurs seront données à nouveau pour décrire l'état actuel du modèle après l'affinement, définitif ou provisoire selon les cas.

2. Etude structurale du domaine N-terminal de la protéine PilB

2.1. La forme réduite

L'analyse préliminaire de la séquence nous avait indiqué une ressemblance avec les thiol-disulfure oxydo-reductases du type thiorédoxine, en particulier de la famille des ResA, des TlpA ou des DsbE (voir partie Introduction, paragraphe 3.6.2). Or, avec les données collectées pour la forme native (voir ci-après), les tentatives de remplacement moléculaire

utilisant des modèles connus de cette famille ont échoué, que ce soit à partir de modèles pris indépendamment ou d'une combinaison de plusieurs modèles (jusqu'à dix structures proches superposées entre elles pour donner le modèle initial), même en poly-alanine, et quelle que fût la résolution maximale des données tolérée. Du reste, des tentatives similaires ont été effectuées avec des structures de thiorédoxine de différents types ou issus d'organismes différents, mais sans succès.

Aussi, en plus des cristaux de la forme sauvage native, des cristaux d'une forme sélénée ont été préparés, afin de tenter une résolution de la structure en utilisant la diffusion anormale du sélénium. Pour la production de cette forme, comme la séquence naturelle du domaine ne contient pas de résidu méthionine, un mutant de substitution L100M/S158M a été créé dans lequel il devenait possible d'incorporer deux résidus sélénométhionine. Les sites des deux mutations ont été choisis sur la base de la structure de la DsbE de *Bradyrhizobium japonicum* (code PDB 1KNG, (Edeling *et al.* 2002)), pour être vraisemblablement situés dans une zone peu agitée dans notre cas.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (Ranaivoson *et al.* 2006).

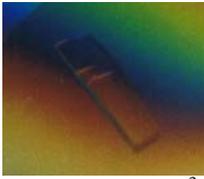
2.1.1. Cristallisations et collecte des données

Le criblage des différentes conditions commerciales en gouttes à l'huile a révélé que le domaine N-terminal de PilB cristallisait préférentiellement dans des conditions basées sur du sulfate d'ammonium. La forme native (6 mg/mL) a ainsi donné des cristaux monocliniques avec la condition JBS6-D6 (3.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en quinze jours environ. Ces cristaux appartenaient au groupe d'espace C2 ($a = 57.0 \text{ \AA}$, $b = 45.1 \text{ \AA}$, $c = 59.2 \text{ \AA}$; $\beta = 112.0^\circ$), un unique monomère était présent dans l'unité asymétrique et le taux de solvant était de 50 %.

Une gamme de concentrations entre 1 et 4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été préparée et utilisée en diffusion de vapeur en gouttes suspendues pour cristalliser la forme sélénée (4 ou 6 mg/mL au départ). Des cristaux quadratiques du groupe d'espace P4₁2₁2 ($a = b = 52.5 \text{ \AA}$, $c = 144.3 \text{ \AA}$) sont apparus rapidement (environ une semaine) pour la condition à 3.5 M (Tableau 1). Dans ces cristaux également, un seul monomère se trouvait dans l'unité asymétrique ; le taux de solvant était de 45 %.

Les données de diffraction ont été collectées au synchrotron DESY (Hambourg), sur la ligne X11 (à une longueur d'onde de 0.811 \AA) pour la forme native et sur la ligne BW7A (0.975 \AA) pour la forme sélénée. La cryo-protection des cristaux a été assurée avec du

glycérol additionné à la solution mère (20 % V/V). Les données ont été traitées avec la suite HKL (Otwinowski et Minor 1997) jusqu'à 1.9 Å de résolution pour la forme native et 2.6 Å de résolution pour la forme sélénée. Elles étaient complètes respectivement à 99.9 % et à 100 %, et étaient de bonne qualité, avec des valeurs du facteur R_{sym} de 8.0 % (forme native) et de 6.8 % (forme sélénée), avec un rapport $I/\sigma(I)$ de 8.9 (forme native) et de 9.4 (forme sélénée) pour une redondance de 3.7 (forme native) et de 27 (forme sélénée) (Tableau 1).

Conditions de cristallisation		
	Dom1 _{PILB} , forme sauvage	[SeMet]-Dom1 _{PILB}
Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux	3.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (JBS6-D6)	3.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , TRIS HCl 0.1 M pH 8.5
Exemples de cristaux obtenus	 50*100*250 μm ³	 40*80*250 μm ³

Statistiques de collecte		
Caractéristique	Dom1 _{PILB} , forme sauvage	[SeMet]-Dom1 _{PILB}
Groupe d'espace	C2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Paramètres de maille	a = 57.0 Å; b = 45.1 Å; c = 59.2 Å α = γ = 90°; β = 112.0°	a = b = 52.5 Å; c = 144.3 Å α = β = γ = 90°
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.811	0.975
Rotation (°)	180	360
Pas d'oscillation (°)	1	0.5
Nombre total de réflexions	40907	181969
Nombre de réflexions uniques	11079	6730
Limites de résolution (Å)	30 - 1.90 (2.05 - 1.90) ^b	30 - 2.6 (2.8 - 2.6) ^b
Complétude (%)	99.9 (100.0) ^b	100.0 (100.0) ^b
Redondance	3.7	27.0
$I/\sigma(I)$	8.9 (2.3) ^b	9.4 (2.6) ^b
R_{sym} (%)	8.0 (32.6) ^b	6.8 (30.1) ^b
$R_{\text{r.i.m}}$ (%) ^c	9.3 (38.3) ^b	6.9 (30.7) ^b
$R_{\text{p.i.m}}$ (%) ^c	4.9 (19.9) ^b	1.3 (6.0) ^b
Nombre d'atomes de sélénium	0	2
% solvant	50	45

Tableau 1

Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour le domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*, sous forme réduite.

^a Composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes.

^b Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

^c Ces deux facteurs de qualité sont définis dans (Weiss et Hilgenfeld 1997).

2.1.2. Résolution de la structure et procédure d'affinement

Les données de diffraction de la forme sélénée du domaine N-terminal de PilB ont fait partie de celles utilisées par l'équipe de l'EMBL à Hambourg pour valider le protocole SAD du pipeline Auto-rickshaw alors en développement (Panjikar *et al.* 2005). Auto-rickshaw est un processus visant à automatiser la résolution d'une structure à partir de données de diffraction déjà traitées. Adapté au départ pour un phasage expérimental (diffusion anormale à une (SAD) ou plusieurs (MAD) longueur(s) d'onde pouvant être combinée avec une méthode de remplacement isomorphe (SIRAS)), les dernières versions permettent également d'utiliser un modèle de remplacement moléculaire seul ou en addition de phases expérimentales (voir http://www.embl-hamburg.de/Auto-Rickshaw/auto-rickshaw_v.html). Auto-rickshaw permet ainsi l'optimisation d'une expérience de diffraction sur synchrotron, par exemple en arrêtant une collecte supplémentaire à une nouvelle longueur d'onde si le protocole SAD se révèle être un succès. Plusieurs programmes sont exécutés les uns à la suite des autres, dont le choix et les paramètres initiaux (effectués par les modules dénommés "decision-makers") sont déterminés avant tout à partir des indications entrées par l'expérimentateur (méthode de phasage, limite de résolution, groupe d'espace, nombre de molécules par unité asymétrique...) et ensuite à partir des résultats des programmes dont l'exécution est achevée (Figure 4).

Dans notre cas, SHELXD (Schneider et Sheldrick 2002) a localisé deux des trois atomes de sélénium présents dans l'unité asymétrique (correspondant aux deux résidus méthionine introduits par mutagenèse dirigée et à la méthionine N-terminale), MLPHARE (CCP4 (1994)) a effectué un phasage initial, DM (Cowtan 1994) une modification de densité et une extension des phases aux plus hautes résolutions, ESSENS (Kleywegt et Jones 1997) une identification et un positionnement d'hélices α et, enfin, ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) une reconstruction automatique du modèle. Dû à la faible résolution de 2.6 Å, la dernière procédure n'a abouti qu'à 50 % du modèle, et il a fallu procéder à plusieurs exécutions ultérieures du programme de reconstruction automatique, à l'issue de chacune desquelles un assemblage manuel sur un système graphique a été effectué. Quand le modèle a ainsi été complété à 90 %, un affinement a été effectué en utilisant CNS (Brunger *et al.* 1998).

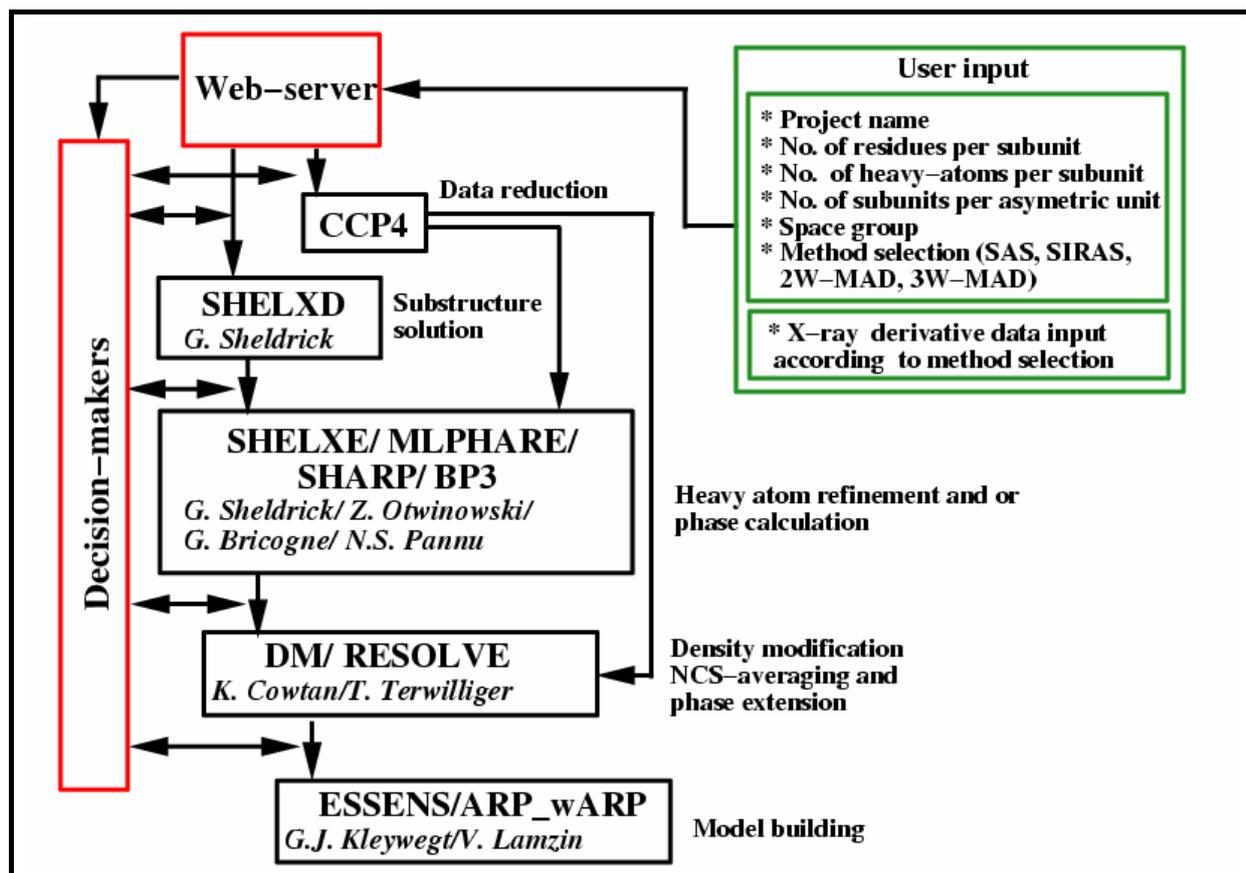


Figure 4 Architecture globale d'Auto-rickshaw (Panjikar *et al.* 2005)
Voir <http://www.embl-hamburg.de/services/mx/software/rickshaw.html>.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	18.62 – 1.90 (2.02 – 1.90) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	9620 (1685) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R _{libre}	1099 (189) ^a
R (%)	18.2 (23.4) ^a
R _{libre} (%)	21.9 (26.9) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1110 / 143
Nombre de molécules d'eau	154
Nombre d'atomes hors protéine et molécules d'eau	1 SO ₄ ²⁻ , 2 Cl ⁻
Facteurs B moyens :	
Chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	17.50 / 19.87 / 27.65 / 19.83
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	88.6
dans les régions autorisées	11.4
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.006
Sur les angles (°)	1.268

Tableau 2 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour le domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*, sous forme réduite.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Ce modèle partiel a enfin été placé dans la maille du cristal natif, en utilisant MOLPREP (Vagin et Teplyakov 1997), et ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) a permis de le compléter jusqu'à 99% de la séquence. Les dernières étapes de l'affinement ont été effectuées avec CNS, et la finalisation de la reconstruction du modèle a été faite manuellement avec TURBO/FRODO (Roussel et Cambillau 1991). Ce faisant, des pics de densité résiduels ont été interprétés comme correspondant à des ions sulfate et chlorure provenant de la solution de cristallisation. La protéine reconstruite des résidus Val33 à Leu175, était bien définie tout au long de sa chaîne principale ; seules quelques chaînes latérales en surface présentaient une faible densité électronique. Le modèle final présente un facteur R de 18.2 % et un facteur R_{libre} de 21.9 % (Tableau 2).

2.2. La forme oxydée

2.2.1. Cristallisations et collecte des données

La protéine a été oxydée en exploitant ses propriétés catalytiques, c'est à dire en l'incubant avec le domaine MsrB oxydé de PilB, suivi d'une purification par chromatographie (F. Neiers, communication personnelle).

Des essais en gouttes à l'huile avec des concentrations entre 2 et 4 M en sulfate d'ammonium (concentration en protéine : 7.2 mg/mL) ont permis d'avoir des cristaux quadratiques en quelques jours aux plus hautes concentrations en agent cristallisant (groupe d'espace $P4_12_12$; $a = b = 52.2 \text{ \AA}$, $c = 125.4 \text{ \AA}$). Ici aussi, un unique monomère était présent dans l'unité asymétrique et le cristal contenait 49 % de solvant.

Un cristal d'une goutte de l'essai à 3 M en sulfate d'ammonium a été prélevé pour la collecte des données de diffraction. De l'huile Paratone-N a été utilisée pour la cryoprotection de ce dernier. La collecte d'un jeu de données de diffraction complet à 98.8 % a été effectuée sur la ligne X13 de DESY (Hambourg), à une longueur d'onde de 0.811 \AA . Le traitement avec XDS a révélé un jeu de relativement bonne qualité jusqu'à 2.1 \AA de résolution, avec des valeurs moyennes de R_{sym} de 9.1 %, de $I/\sigma(I)$ de 14.7 et de redondance de 6.1 (Tableau 3). Les données de plus haute résolution, bien que présentant un R_{sym} élevé (54 %), ont dans un premier temps été conservées, du fait de leur rapport signal/bruit qui reste significatif (3.3).

Conditions de cristallisation	
Exemple de cristaux obtenus	Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux
 <p>80*80*200 μm</p>	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , TRIS HCl 0.1 M pH 8.5

Statistiques de collecte	
Caractéristiques	Valeurs finales
Groupe d'espace	P4 ₁ 2 ₁ 2
Paramètres de maille	a = b = 52.2 Å; c = 125.4 Å; α = β = γ = 90°
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.806
Rotation (°)	80
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	64213
Nombre de réflexions uniques	10496
Limites de résolution (Å)	19.39-2.11 (2.22-2.11) ^b
Complétude (%)	98.8 (92.8) ^b
Redondance	6.1 (5.8) ^b
R _{sym} (%)	9.1 (53.6) ^b
I/σ(I)	14.7 (3.3) ^b
% solvant	49

Tableau 3

Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour le domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*, sous forme oxydée.

^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes.

^b Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

2.2.2. Remplacement moléculaire et procédure d'affinement

La structure a été obtenue par remplacement moléculaire à partir de la structure de la forme réduite. Le logiciel MOLREP (Vagin et Teplyakov 1997) a été utilisé ; à l'issue du processus, il a abouti au positionnement de l'unique monomère dans l'unité asymétrique. Ce modèle a donné lieu à des facteurs R de 41.7 % et R_{libre} de 40.9 %, avant affinement (gamme de résolution : 18.72 Å – 2.11 Å).

L'affinement du modèle contre les données cristallographiques a été effectué avec REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997), couplé avec COOT (Emsley et Cowtan 2004) pour les

remaniements manuels du modèle. Peu de difficultés ont été rencontrées lors de ces étapes, étant donné la proximité conformationnelle entre la structure de la forme réduite et de la forme oxydée (voir Partie B, section II, paragraphe 1.3). Les cartes de densité électronique calculées ont conduit à modéliser une molécule de sulfate issue de la solution de cristallisation. A l'issue de la procédure d'affinement effectuée, le modèle montre un facteur R de 20.7 % et un facteur R_{libre} de 28.2 % (Tableau 4). L'écart élevé entre ces deux valeurs vient certainement de la qualité médiocre des données dans les plus hautes gammes de résolution (voir paragraphe précédent et Tableau 4) ; de nouveaux cycles d'affinements en limitant un peu plus la résolution maximale devraient réduire cet écart.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	18.72 – 2.11 (2.17 – 2.11) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	9458 (640) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	497 (25) ^a
R (%)	20.7 (27.7) ^a
R_{libre} (%)	28.2 (39.2) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1117 / 144
Nombre de molécules d'eau	133
Espèce hors protéine et molécules d'eau	1 SO_4^{2-}
Facteurs B moyens :	
Chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	29.5 / 31.4 / 39.8 / 31.4
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	93.5
dans les régions autorisées	6.5
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
sur les longueurs de liaisons (Å)	0.023
sur les angles (°)	2.08

Tableau 4 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour le domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*, sous forme oxydée.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

3. Etude structurale du domaine MsrA de la protéine PilB

3.1. Les formes réduites et oxydées

Les structures cristallographiques des formes réduite et oxydée (en pont disulfure intra-moléculaire) de la MsrA de *N. meningitidis* avaient été résolues avant le début de mes

travaux, faisant partie de la thèse du Docteur Brice Kauffmann. Les procédures expérimentales sont résumées dans les paragraphes suivants.

3.1.1. Cristaux obtenus et données de diffraction

Bien que les conditions de cristallisation des deux formes réduite et oxydée aient été très différentes (20 % PEG 8000, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 pour la forme réduite et 30 % PEG 4000, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M Na Acétate pH 4.6 pour la forme oxydée), les cristaux obtenus dans les deux cas étaient isomorphes (système orthorhombique, groupe d'espace P2₁2₁2₁) avec des paramètres de mailles : a = 43.5 Å, b = 49.2 Å et c = 66.2 Å pour les cristaux de la forme réduite, et a = 43.5 Å, b = 45.6 Å et c = 66.0 Å pour ceux de la forme oxydée.

Tous les cristaux de MsrA étudiés ici présentent des caractéristiques similaires, avec néanmoins une légère variabilité du paramètre b, c'est à dire une différence entre les valeurs toujours inférieure à 10 %. Ainsi, dans tous les cas, un unique monomère est retrouvé dans l'unité asymétrique ; les taux de solvant estimés sont compris entre 27 et 36 % (voir Tableau 5, Tableau 7 et Tableau 9).

Caractéristiques	Valeurs finales	
	Forme réduite	Forme oxydée
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de maille	a = 43.5 Å; b = 49.2 Å; c = 66.2 Å α = β = γ = 90°	a = 43.5, b = 45.6 Å; c = 66.0 Å α = β = γ = 90°
Longueur d'onde de collecte (Å)	1.5418	0.89
Rotation (°)	180	241
Pas d'oscillation (°)	1	1
Nombre total de réflexions	17198	99319
Nombre de réflexions uniques	8394	10483
Limites de résolution (Å)	30-2.00 (2.03-2.00) ^a	20-1.95 (2.06-1.95) ^a
Complétude (%)	90.6 (90.2) ^a	99.9 (100) ^a
Redondance	2.04 (1.98) ^a	9.5 (9.7) ^a
I/σ(I)	14.3 (3.3) ^a	23.8 (6.9) ^a
R _{sym} (%)	5.6 (26.9) ^a	6.9 (35.8) ^a
% solvant	27	30

Tableau 5 Statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrA de *N. meningitidis*, sous les formes réduite et oxydée.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Les données de diffraction ont été collectées au service commun de diffraction des rayons X de l'UHP (longueur d'onde 1.54 Å) pour la forme réduite et sur la ligne BM14 (longueur d'onde 0.89 Å) de l'ESRF pour la forme oxydée. Elles ont été traitées avec la suite

HKL (Otwinowski et Minor 1997), jusqu'à 2.00 Å de résolution pour la forme réduite, et avec XDS pour la forme oxydée jusqu'à une résolution de 1.95 Å. Les caractéristiques des cristaux et les statistiques sur les données de diffraction traitées sont données dans le Tableau 5.

3.1.2. Résolution et affinement des structures

La structure de la forme réduite a été résolue par remplacement moléculaire, le modèle de départ ayant été la MsrA de *M. tuberculosis* (code PDB 1NWA, (Taylor *et al.* 2003)). La structure ainsi obtenue a servi comme modèle de remplacement moléculaire pour l'obtention de celle de forme oxydée. Ces procédures, ainsi que l'affinement des structures, ont été effectuées avec CNS (Brunger *et al.* 1998) et ont abouti à la reconstruction du modèle de la forme réduite des résidus Asn41 à Thr213. Les 26 derniers résidus n'ont pas pu être modélisés, du fait d'une trop faible définition en densité électronique. Cette structure présentait un facteur R de 17.3 % et un facteur R_{libre} de 19.2 % (Tableau 6). Il est à noter que dans le modèle final, les résidus du fragment ₁₉₅NGYCH₁₉₉ qui inclut la cystéine de recyclage (voir partie Introduction) étaient relativement faiblement définis en densité électronique comparativement au reste de la structure. Cette observation constitue une constante dans toutes les structures de MsrA étudiées ici, en particulier pour la structure de la forme oxydée (voir ci-après).

L'affinement de la structure de la forme oxydée était en cours au début de mes propres travaux, aussi je l'ai repris. La structure présentait alors un facteur R de 21.5 % et un facteur R_{libre} de 26.2 %, et toute l'extrémité C-terminale à partir du résidu Asn196 était mal définie en densité électronique. Plusieurs exécutions de CNS (Brunger *et al.* 1998) et des ajouts manuels de molécules d'eau pour interpréter des pics de densité positive ont permis de faire apparaître une densité de meilleure qualité pour cette zone, mais elle restait néanmoins mal définie en comparaison avec le reste de la structure. En particulier, la portion ₁₉₅NGYC₁₉₈ (déjà faiblement définie dans la forme réduite) a pu être modélisée essentiellement à l'aide de cartes 3Fo-2Fc de type "omit-map" où les atomes correspondant à cette portion étaient positionnés, puis omis (cartes calculées d'une manière combinée avec une dynamique moléculaire : protocole "simulated-annealing omit-map" de CNS (Brunger *et al.* 1998)). Dans le modèle final, quel que soit le type de carte considéré, les atomes allant du résidu His199 au résidu Asp201 étaient trop mal définis pour être positionnés, aussi, ces résidus en sont absents. Les atomes de la chaîne principale du résidu Cys198 sont également mal définis, mais le pont

disulfure entre Cys51 et Cys198 – bien défini en densité – et la connectivité avec le résidu précédent, combinés à un affinement de la géométrie du modèle, ont abouti à la modélisation de ce résidu tel qu'il est présenté dans le modèle final. Les résidus de la position 202 à la position 211 étaient suffisamment bien définis en densité (en particulier dans les "omit-map" calculées en omettant les atomes en question) pour être modélisés dans la structure. Le modèle final présentait un facteur R de 19.2 % et un facteur R_{libre} de 21.9 %. Le détail des caractéristiques de ces deux modèles finaux est présenté dans le Tableau 6.

Caractéristiques	Valeurs finales	
	Forme réduite	Forme oxydée
Limites de résolution (Å)	16.54 – 2.0 (2.13 – 2.0) ^a	19.3 – 1.95 (2.07 – 1.95) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	16476 (2581) ^a	18107 (3012) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	869 (128) ^a	946 (143) ^a
R (%)	17.3 (22.2) ^a	19.2 (22.5) ^a
R_{libre} (%)	19.2 (23.1) ^a	21.9 (27.3) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1358 / 169	1304 / 162
Nombre de molécules d'eau	146	76
Espèces hors protéine et molécules d'eau	aucune	1 acétate (ACT)
Facteurs B moyens :		
Chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	19.4 / 22.5 / 35.4 / 22.3	26.9 / 30.1 / 37.9 / 29.1
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)		
dans les régions les plus favorables	91.8	92.9
dans les régions autorisées	7.5	7.1
dans les régions généreusement autorisées	0.7	0
dans les régions interdites	0	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard		
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.009	0.006
Sur les angles (°)	1.3	1.3

Tableau 6 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrA de *N. meningitidis*, sous les formes réduite et oxydée.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

3.2. Le complexe avec le substrat

3.2.1. Cristallisations et collecte des données

L'étude structurale du complexe entre la MsrA et un substrat a utilisé le mutant C51S et le substrat Ac-*L*-Met-*R,S*-SO-NHMe (voir partie Introduction, paragraphe 4).

La protéine (18 mg/mL, c'est à dire 840 μ M) a été co-cristallisée avec le substrat par la technique de la goutte à l'huile. Dans les mélanges de cristallisation, une concentration finale du substrat de 200 mM a été visée afin de permettre à tous les sites actifs d'être occupés,

même dans l'état cristallin où, *a priori*, la concentration locale en protéine est beaucoup plus élevée qu'en solution. La condition JBS1-C1 (30 % PEG 550 MME, 0.1 M Bicine pH 9, 0.1 M NaCl) a permis d'obtenir des cristaux orthorhombiques du groupe d'espace $P2_12_12_1$ aux paramètres de maille voisins de ceux observés dans les cristaux des formes réduite et oxydée (voir paragraphe 3.1 et Tableau 5). Un seul monomère était présent dans l'unité asymétrique, et il y avait 32 % de solvant.

La condition de cristallisation additionnée à l'huile de paraffine utilisée pour recouvrir les gouttes était suffisamment cryo-protectrice ; les cristaux ont donc été prélevés directement pour les expériences de diffraction.

Les données de diffraction ont été collectées sur la ligne X11 (longueur d'onde 0.811 Å) du synchrotron DESY (Hambourg) et ont été traitées avec HKL (Otwinowski et Minor 1997) jusqu'à 2.24 Å de résolution. Ainsi, un jeu de données complet à 98.6 % a été collecté, avec un R_{sym} de 7.8 %, un $I/\sigma(I)$ moyen de 15.3 et une redondance moyenne de 4.1, tout en préservant une qualité de données satisfaisante dans la plus haute couronne de résolution (Tableau 7).

Conditions de cristallisation	
Exemple de cristaux obtenus	Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux
 80*80*300 μm (pour un prisme)	30 % PEG 550 MME, 0.1 M Bicine pH 9, 0.1 M NaCl + 200mM Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe

Statistiques de collecte	
Caractéristiques	Valeurs finales
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$
Paramètres de maille	$A = 43.9 \text{ \AA}; b = 50.3 \text{ \AA}; c = 66.6 \text{ \AA}; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.811
Rotation (°)	106
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	30965
Nombre de réflexions uniques	7513
Limites de résolution (Å)	20-2.24 (2.28-2.24) ^b
Complétude (%)	98.6 (99.7) ^b
Redondance	4.1 (4.1) ^b
R_{sym} (%)	7.8 (26.5) ^b
$I/\sigma(I)$	15.3 (4.24) ^b
% solvant	32

Tableau 7

Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrA de *N. meningitidis*, en complexe avec le substrat.

^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes

^b Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

3.2.2. Remplacement moléculaire et procédure d'affinement

La structure a été résolue par remplacement moléculaire à partir de la forme réduite, en utilisant CNS (Brunger *et al.* 1998). Un seul monomère a ainsi été positionné dans l'unité asymétrique, et le modèle présentait un facteur R de 37.0 % et un facteur R_{libre} de 37.13 %, en début d'affinement (gamme de résolution : 19.8 Å – 2.24 Å). L'affinement du modèle a également été effectué avec CNS (Brunger *et al.* 1998), couplé avec TURBO/FRODO (Roussel et Cambillau 1991) pour les contrôles visuels et les remaniements manuels. La structure a ainsi pu être modélisée du résidu Asn41 au résidu Gly211. Les derniers résidus de la séquence étaient apparemment, ici encore, trop agités pour être visibles au niveau de la densité électronique. Comme dans les observations des formes oxydée et réduite, la portion ₁₉₅NGYCH₁₉₉ était faiblement définie en densité ici encore, comparativement au reste de la molécule. Néanmoins, cette portion apparaissait mieux définie dans ce cas que dans les trois autres structures de MsrA étudiées ici, certainement du fait de la présence du substrat dans le site actif (voir ci-après).

Pendant la procédure d'affinement, un pic de densité apparaissait au niveau du site actif qui pouvait correspondre au soufre, à l'oxygène et au carbone ε du substrat. Le substrat a donc été placé entièrement dans le site actif, ses autres atomes étant disposés similairement à la méthionine d'un monomère voisin présente dans le site actif de la MsrA de *M. tuberculosis* (Taylor *et al.* 2003) (voir partie Introduction, paragraphe 3.4.3). Les caractéristiques géométriques de départ du substrat Ac-MetSO-NHMe (la configuration S-sulfoxyde) ont été inspirées des modèles de méthionine sulfoxyde (résidu MSO) (coordonnées "idéales") répertoriés dans la banque de données des composés hétérogènes d'Uppsala (HIC-Up : "Hetero-compound Information Center – Uppsala") (Kleywegt 2007). Après l'affinement de la conformation ainsi positionnée contre les données cristallographiques, des cartes 3Fo-2Fc et Fo-Fc de type "omit-map" où le substrat était omis (calculées d'une manière combinée avec une dynamique moléculaire : protocole "simulated-annealing omit-map" de CNS (Brunger *et al.* 1998)) ont levé toute ambiguïté quant à la présence de ce dernier dans le site actif (voir même partie, section III, paragraphe 1.3). Néanmoins, la région de la chaîne principale du substrat restait faiblement définie en densité quel que soit le type de carte calculé. Additionné à la résolution relativement faible, cela rendait le positionnement des atomes constituant cette région incertain. La conformation du substrat dans le modèle final est celle jugée la plus

plausible sur le plan stérique et en regard des interactions possibles entre les atomes de la chaîne principale et les résidus du site actif, notamment. Il a, en outre, été tenu compte des observations faites avec le modèle de *M. tuberculosis* (code PDB 1NWA ; (Taylor *et al.* 2003)) en particulier de l'interaction entre la paire de résidus Tyr197/Asp129 et la liaison amide incluant l'azote de la chaîne principale du résidu méthionine d'un monomère voisin présent dans le site actif (voir partie A, paragraphe 3.4.3).

Le modèle final présentait un facteur R de 18.8 % et un facteur R_{libre} de 19.6 % (Tableau 8). Outre les 28 derniers résidus et la portion ${}_{195}\text{NGYCH}_{199}$, les cartes de densité électronique ne présentaient aucune discontinuité le long du squelette peptidique, et seules quelques chaînes latérales de résidus en surface étaient faiblement définies.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	19.8 – 2.24 (2.38 – 2.24) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	11612 (1872) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	1256 (209) ^a
R (%)	18.8 (22.6) ^a
R_{libre} (%)	19.6 (24.7) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1343 / 167
Nombre de molécules d'eau	82
Espèce hors protéine et molécules d'eau	1 Ac-MetSO-NHMe (MSO) ⁻
Facteurs B moyens : chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	23.8 / 25.6 / 34.2 / 25.7
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	91.1
dans les régions autorisées	8.9
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.012
Sur les angles (°)	1.3

Tableau 8 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrA de *N. meningitidis*, en complexe avec le substrat.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

3.3. La forme acide sulfénique

3.3.1. Cristallisations et collecte des données

Pour l'étude de l'intermédiaire acide sulfénique, le mutant C198S a été utilisé (voir partie A, paragraphe 4).

La protéine seule (31 mg/mL) a cristallisé en gouttes à l'huile avec la condition JBS1-D1 (30 % PEG 1500) au bout de 10 jours environ. Les cristaux obtenus ainsi étaient

également orthorhombiques du type $P2_12_12_1$, avec des caractéristiques similaires aux cas précédemment (voir Tableau 8). Du diméthyl-sulfoxyde (DMSO) a ensuite été injecté dans les gouttes pour une diffusion dans les cristaux (environ 300 mM final). Dans le cristal choisi pour la collecte des données de diffraction, le DMSO a été diffusé pendant au moins 12 heures. Le DMSO a été choisi comme substrat ici à cause de sa petite taille par rapport au résidu MetSO : il avait donc plus de chances de préserver l'empilement cristallin.

La condition de cristallisation était également suffisamment cryo-protectrice pour que les cristaux puissent être prélevés directement pour les expériences de diffraction.

Les données de diffraction, ici, ont été collectées sur la ligne BM30A de l'ESRF (Grenoble) (longueur d'onde 0.92 Å). Elles ont été traitées avec XDS ; elles étaient complètes à 100 % jusqu'à une résolution de 2.0 Å, avec, un R_{sym} de 8.2 %, une redondance moyenne de 7.1 et un $I/\sigma(I)$ moyen de 15.8. (Tableau 9). Les cristaux contenaient 36 % de solvant.

Conditions de cristallisation	
Exemple de cristaux obtenus	Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux
 80*80*500 μm	30 % PEG 1500

Statistiques de collecte	
Caractéristiques	Valeurs finales
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$
Paramètres de maille	$a = 44.6, b = 54.6, c = 64.8 ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.92
Rotation (°)	180
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	79750 (11596) ^b
Nombre de réflexions uniques	11221 (1608) ^b
Limites de résolution (Å)	45-2.00 (2.11-2.00) ^b
Complétude (%)	100 (100) ^b
Redondance	7.1 (7.2) ^b
R_{sym} (%)	8.2 (36.6) ^c
$I/\sigma(I)$	15.8 (5.6) ^c
% solvant	36

Tableau 9

Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrA de *N. meningitidis*, la cystéine catalytique étant sous forme acide sulfénique.

^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes

^b Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution..

3.3.2. Remplacement moléculaire et procédure d'affinement

La structure a également été obtenue par remplacement moléculaire, le modèle de départ étant la forme réduite. CNS (Brunger *et al.* 1998) a été utilisé, ici encore pour effectuer ce remplacement moléculaire ainsi que pour les procédures d'affinement du modèle, et les remaniements manuels sur graphique ont été faits avec TURBO/FRODO (Roussel et Cambillau 1991). Le modèle présentait un facteur R de 38.0 % et un facteur R_{libre} de 39.0 % avant les cycles d'affinement (gamme de résolution 41.76 – 2.0 Å). Le modèle a pu être reconstruit du résidu Asn41 au résidu Pro210, ici c'est à dire un résidu en moins par rapport au mutant C51S. La portion de séquence ${}_{195}\text{NGYCH}_{199}$ était faiblement définie en densité ici aussi – moins bien que dans le cas du mutant C51S.

En cours d'affinement est apparu un renflement de densité électronique dans le prolongement de l'atome de soufre de Cys51 qui pouvait très bien accommoder l'oxygène de l'acide sulfénique. Les caractéristiques géométriques de départ de ce résidu ont été inspirées du modèle de cystéine oxydée (résidu CEA, coordonnées "idéales") répertoriés dans HIC-Up (Kleywegt 2007). Ici encore, outre la portion ${}_{195}\text{NGYCH}_{199}$ et l'extrémité C-terminale, aucune discontinuité n'a été révélée par les cartes de densité électronique le long du squelette peptidique. Le modèle final présente un facteur R de 19.3 % et un facteur R_{libre} de 23.5 %.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	41.76 – 2.00 (2.13 – 2.00) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	19133 (3110) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	983 (171) ^a
R (%)	19.3 (25.2) ^a
R_{libre} (%)	23.5 (30.7) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1349 / 166
Nombre de molécules d'eau	123
Espèce hors protéine et molécules d'eau	aucune
Facteurs B moyens : chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	22.56 / 25.64 / 32.32 / 24.80
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	89.7
dans les régions autorisées	10.3
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
sur les longueurs de liaisons (Å)	0.006
sur les angles (°)	1.2

Tableau 10 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrA de *N. meningitidis*, la cystéine catalytique étant sous forme acide sulfénique.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

4. Etude structurale du domaine MsrB de la protéine PilB

4.1. Les formes réduites et oxydées

La résolution des structures de la MsrB de *N. meningitidis*, sous formes réduite et oxydée avait également fait partie du travail de thèse du docteur Brice Kauffmann, comme dans le cas de la MsrA ; les procédures expérimentales sont aussi résumées ici.

4.1.1. La forme réduite

La structure de la forme réduite a été résolue par la méthode de diffusion anormale à plusieurs longueurs d'onde (MAD), tirant profit du signal anormal du sélénium (Kauffmann *et al.* 2002). Deux résidus Met sont présents dans la séquence, aussi, lors de la préparation des échantillons, ils ont été substitués par des résidus sélénométhionine, afin de pouvoir effectuer le phasage.

La protéine a cristallisé dans une solution de phosphate de potassium, en diffusion de vapeur en gouttes suspendue, à 20°C, les monocristaux obtenus étant du groupe d'espace $P2_12_12_1$ ($a = 44.0 \text{ \AA}$, $b = 118.6 \text{ \AA}$, $c = 138.5 \text{ \AA}$). Quatre monomères y étaient présents dans l'unité asymétrique, et ces cristaux contenaient 51 % de solvant.

Trois jeux de données de diffraction ont ainsi été collectés sur la ligne BM30A de l'ESRF à 0.9796 \AA (inflexion du seuil d'absorption, correspondant au minimum de f'), à 0.9791 \AA (pic du seuil d'absorption, correspondant au maximum de f'') et 0.9765 \AA (éloigné des optima de f' et f''). Ces jeux de données ont été traités avec la suite HKL (Otwinowski et Minor 1997) jusqu'à 1.82 \AA de résolution. Les caractéristiques des cristaux et des jeux de données sont détaillées dans le Tableau 11.

Les huit atomes de sélénium présents dans l'unité asymétrique ont ensuite été localisés grâce au programme SnB (Weeks et Miller 1999). Un phasage initial a alors été effectué pour des données allant jusqu'à 2 \AA de résolution effectué à l'aide du programme SHARP (Bricogne *et al.* 2003). Les phases ont ensuite été étendues à 1.82 \AA de résolution en utilisant

la procédure de nivellement de solvant du programme SOLOMON (Abrahams et Leslie 1996). Enfin, une reconstruction automatique du modèle avec le logiciel ARP/wARP (version 5.1) (Perrakis *et al.* 1999) a permis de reconstruire 465 des 588 résidus de l'unité asymétrique.

Cristallisations – Caractéristiques des cristaux	
Conditions de cristallisation :	2 μ L de solution protéique (75 mg/mL de protéine, 100 mM Tris HCl, pH 8) + 2 μ L de solution de cristallisation (500 mM KH_2PO_4)
Conditions de cryoprotection :	solution de cristallisation + 20% MPD (V/V)
Caractéristiques des cristaux obtenus :	$\text{P}2_12_12_1$; 4 molécules / unité asymétrique ($V_m = 2.73 \text{ \AA}^3/\text{Da}$; 51 % de solvant) a = 44.0 \AA ; b = 118.6 \AA ; c = 138.5 \AA , $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ Limite de diffraction : 1.80 \AA

Statistiques des collectes de données			
Caractéristiques	Inflexion	Pic	Lointain
Longueur d'onde de collecte (\AA)	0.9796	0.9791	0.9765
Energie (eV)	12656.83	12663.54	12700
Nombre total de réflexions	121316	116823	121337
Limites de résolution (\AA)	30 - 1.82 (1.86 – 1.82) ^a	30 - 2.6 (1.86 – 1.82) ^a	30 – 1.82 (1.86 – 1.82) ^a
Complétude (%)	97.2 (91.8) ^a	93.6 (84.1) ^a	97.1 (90.2) ^a
I/ σ (I)	12.7 (3.1) ^a	16.1 (2.5) ^a	13.1 (2.9) ^a
R_{svm} (%)	4.5 (21.2) ^a	5.8 (22.2) ^a	13.1 (2.9) ^a

Tableau 11 Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés en méthode MAD pour les cristaux de la forme réduite de la MsrB de *N. meningitidis* (forme sélénée) (d'après (Kauffmann *et al.* 2002)).
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (\AA)	24.69 – 1.78 (1.83 – 1.78) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	56058 (3690) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	1099 (203) ^a
R (%)	18.8 (27.8) ^a
R_{libre} (%)	23.7 (34.6) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	4654 / 576
Nombre de molécules d'eau	768
Nombre d'atomes hors protéine et molécules d'eau	3 PO_4^{3-}
Facteurs B moyens : chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (\AA^2)	21.2 / 23.3 / 35.9 / 23.2
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	92.1
dans les régions autorisées	7.9
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (\AA)	0.014
Sur les angles ($^\circ$)	1.4

Tableau 12 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrB de *N. meningitidis*, sous forme réduite.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Le modèle a enfin été affiné avec REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997) et la finalisation de la reconstruction a été effectuée manuellement en utilisant COOT (Emsley et Cowtan 2004). Le modèle final présentait un facteur R de 18.8 % et un facteur R_{libre} de 23.7 % (Tableau 12). Le modèle final est bien défini en densité électronique, en révélant notamment la présence de trois ions phosphate fixés par la protéine. Plusieurs résidus ont également révélé des conformations alternatives, en particulier différentes positions possibles prises par les atomes S_{γ} des deux résidus cystéine du site actif. La situation de ces deux résidus en regard de ces multiples conformations diffère suivant le monomère de l'unité asymétrique considéré (voir partie B, section IV, paragraphe 1.2.2).

4.1.2. La forme oxydée

Des cristaux hexagonaux ont été obtenus en gouttes à l'huile (condition JBS3-B4 : 20 % PEG 4000, 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), à 20°C. Ils appartenaient au groupe d'espace P622, avec $a = b = 111.71 \text{ \AA}$, $c = 54.55 \text{ \AA}$ et $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Une seule molécule était présente dans l'unité asymétrique et le cristal contenait 58 % de solvant.

Ces cristaux avaient un pouvoir de diffraction relativement médiocre, aussi seul un jeu de données de qualité moyenne a pu être collecté (collecte effectuée sur la ligne BM14 de l'ESRF). Ces données ont été traitées avec l'utilisation de XDS jusqu'à 3 Å de résolution (Tableau 13).

Le modèle a été obtenu par remplacement moléculaire à partir de la forme réduite en utilisant MOLREP (Vagin et Teplyakov 1997). L'affinement a été effectué avec CNS (Brunger *et al.* 1998), aboutissant à un modèle présentant actuellement un facteur R de 25.5 % et un facteur R_{libre} de 29.2 %. Les caractéristiques du modèle final sont présentées dans le Tableau 14.

L'affinement de ce modèle contre les données cristallographiques nécessite sans doute d'être amélioré, de façon à obtenir des valeurs plus basses des facteurs d'accord : en particulier, les valeurs actuelles dans la couronne de plus haute résolution ne sont pas acceptables. Néanmoins, la faible résolution de 3.0 Å ne permettra sans doute pas d'obtenir des valeurs de R et de R_{libre} beaucoup plus faibles. Cependant, en l'état, les cartes de densités sont suffisamment indicatives des caractéristiques structurales apportées par le pont disulfure intra-moléculaire. Notamment, la conformation globale de la protéine est similaire à celle de la forme réduite (voir partie B, section IV, paragraphe 1.4.1). Un pic de densité électronique

positive résiduelle est présent dans le site actif. Lors de ses travaux de thèse, le Docteur Brice Kauffmann a pu modéliser un résidu MetSO (le substrat utilisé pour oxyder l'enzyme) ou bien

Cristallisations – Caractéristiques des cristaux	
Conditions de cristallisation	2 μL de solution protéique (15 mg/mL de protéine, 100 mM Tris HCl, pH 8) + 2 μL de solution de cristallisation (20 % PEG 4000, 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ^b (JBS3-B4))
Conditions de cryoprotection	huile
Caractéristiques des cristaux obtenus	P622; 1 molécule / unité asymétrique ($V_m = 2.89 \text{ \AA}^3/\text{Da}$; 58 % de solvant) a=111.71 Å , b=111.71 Å , c=54.55 Å ; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$ Limite de diffraction : 3.0 Å

Statistiques de collecte	
Caractéristiques	Valeurs finales
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.8856
Rotation ($^\circ$)	92
Pas d'oscillation ($^\circ$)	1
Nombre total de réflexions	58021
Nombre de réflexions uniques	4245
Limites de résolution (Å)	30.0 - 3.0 (3.18 – 3.0) ^a
Complétude (%)	99.5 (99.2) ^a
Redondance	13.7 (12.9) ^a
R_{sym} (%)	11.3 (27.0) ^a
$I/\sigma(I)$	11.3 (4.2) ^a
% solvant	58

Tableau 13 Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrB de *N. meningitidis*, sous forme oxydée.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	19.51 – 3.0 (3.2 – 3.0) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	3178 (221) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{free}	1099 (24) ^a
R (%)	25.5 (28.7) ^a
R_{free} (%)	29.2 (42.1) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	1110 / 144
Nombre de molécules d'eau	27
Espèce hors protéine et molécules d'eau	1 MetSO ⁻
Particularité	Pont disulfure Cys63-Cys117
Facteurs B moyens : chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å^2)	45.0 / 46.1 / 45.0 / 45.6
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	68.6
dans les régions autorisées	30.5
dans les régions généreusement autorisées	0.8
dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
sur les longueurs de liaisons (Å)	0.008
sur les angles ($^\circ$)	1.1

Tableau 14 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrB de *N. meningitidis*, sous forme oxydée.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Met (le produit d'oxydation) pour interpréter ce pic. Compte tenu du rôle de l'enzyme, il avait conclu que la situation la plus probable était la présence d'une MetSO (voir partie B, section IV, paragraphe 1.4.2).

4.2. Le complexe avec le substrat

4.2.1. Cristallisation et collecte des données

Le complexe avec le substrat étudié ici a utilisé le mutant C63S/C117S, au lieu du simple mutant C117S (voir Partie A, paragraphe 4.0).

Conditions de cristallisation	
Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux	
30 % PEG 400, 0.1 M TRIS-HCl pH 8.5, 0.2 M Na Citrate (JBS1-B6) ^b	
15 % PEG 400, 0.1 M TRIS-HCl pH 8.5, 0.2 M Na Citrate (JBS1-A4)	
30 % PEG 550 MME, 0.1 M Bicine, pH 9.0, 0.1 M NaCl (JBS1-C1)	

Statistiques de collecte	
Caractéristique	Valeur finale
Groupe d'espace	P4 ₃ 2
Paramètres de maille	a = b = c = 154.9 Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.969
Rotation (°)	180
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	1236334
Nombre de réflexions uniques	37516
Limites de résolution (Å)	50-2.1 (2.18-2.1) ^c
Complétude (%)	100 (100) ^c
Redondance	32.9
R _{sym} (%)	7.5 (42.8) ^c
I/ σ (I)	28.14 (2.98) ^c
% solvant	66

Tableau 15 Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrB de *N. meningitidis*, en complexe avec le substrat.
^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes
^b Condition ayant donné lieu au cristal utilisé pour la collecte des données de diffraction.
^c Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Comme dans le cas de la MsrA, la protéine (ici 19 mg/mL) a été co-cristallisée avec le mélange des deux diastéréoisomères Ac-L-Met-R,S-SO-NHMe (200 mM final), en utilisant la méthode des gouttes à l'huile. Après 6 mois de stockage à 20 °C, des cristaux cubiques sont apparus dans plusieurs conditions possédant des caractéristiques communes : l'agent

cristallisant est un polyéthylène glycol (PEG) de faible poids moléculaire (PEG 400 ou PEG 550 MME), et le pH est au moins égal à 8.5 (Tableau 15). Ces cristaux appartenait au groupe d'espace $P4_332$ ($a = b = c = 154.9 \text{ \AA}$), avec deux monomères dans l'unité asymétrique et 66 % de solvant.

Les données de diffraction ont été collectées sur la ligne synchrotron ID14-1 de l'ESRF, à Grenoble, à une longueur d'onde de 0.934 \AA . Les solutions de cristallisation, additionnées à l'huile de paraffine utilisée pour recouvrir les gouttes, étaient suffisamment cryo-protectrices pour qu'aucun traitement additionnel ne fût nécessaire : le cristal a été prélevé directement de la liqueur mère pour la collecte des données (Tableau 15). Les données ont été traitées avec la suite HKL (Otwinowski et Minor 1997) jusqu'à une résolution de 2.1 \AA . Elles étaient complètes à 100 %, avec des valeurs de R_{sym} de 7.5 %, de $I/\sigma(I)$ de 28.1 et de redondance de 32.9 (valeur élevée, due au fait que la collecte a été effectuée sur une rotation du cristal de 180° et lié à l'appartenance au système cubique).

4.2.2. Remplacement moléculaire et procédure d'affinement

La structure a été résolue par remplacement moléculaire, à partir du monomère A de la forme réduite en utilisant CNS (Brunger *et al.* 1998). Les deux monomères ont été ainsi positionnés dans l'unité asymétrique, et leurs positions globales ont été affinées en les considérant chacun comme un corps rigide. Le modèle présentait alors un facteur R de 43.7 % et un facteur R_{libre} de 45.7 %, avant d'être soumis aux procédures d'affinement (gamme de résolution : $19.83 - 2.10 \text{ \AA}$). Le modèle a été affiné avec le programme REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997) et les reconstructions manuelles sur graphique ont été effectuées avec le logiciel COOT (Emsley et Cowtan 2004).

Plusieurs pics de densité résiduelle apparaissaient au cours de l'affinement. Compte tenu de leurs aspects dans les différentes cartes calculées (de type $2F_o-F_c$ ou F_o-F_c) et de la composition du mélange de cristallisation, ils pouvaient être interprétés, pour la plupart, par du PEG. Quelques-uns d'entre eux pouvaient également correspondre à du TRIS ou à du citrate. Enfin, un de ces pics à l'interface des deux monomères, dans une zone éloignée du site actif, correspondait au substrat. Dans le modèle final, des atomes de l'un ou l'autre de ces composés hétérogènes ont été placés dans la grande majorité des pics de densité résiduelle (37 molécules de PEG, 1 molécule de TRIS et 1 molécule de citrate : voir Tableau 16). Certains

pics de la carte différence notamment sont encore présents, faibles ou diffus et souvent difficilement interprétables sans ambiguïté, compte tenu de la résolution. La procédure d'affinement devrait sans doute être poursuivie, néanmoins, le modèle présenté dans ces pages montre des statistiques satisfaisantes en regard de l'expérience de cristallographie menée ici (voir Tableau 16), et la précision du modèle est suffisante pour répondre à la plupart des problèmes à l'origine de la manipulation. En particulier, certaines caractéristiques géométriques et stéréochimiques restent à être améliorées.

Les deux sites actifs présentent les densités électroniques attendues correspondant au substrat. Comme dans le cas de la MsrA, les caractéristiques géométriques de départ du substrat (ici le stéréoisomère *R*-sufoxyde) ont été inspirées de l'acide aminé MSO (coordonnées "idéales") de HIC-Up (Kleywegt 2007). Dans le monomère A, le substrat se présentait manifestement sous deux conformations au niveau de sa chaîne principale. Le monomère B, quant à lui, semblait accueillir uniquement une conformation du substrat ; la zone occupée par la deuxième conformation présentait une partie d'une molécule de PEG.

Le modèle ainsi affiné présente un facteur R de 20.0 % et un facteur R_{libre} de 23.4 % (Tableau 16). Les deux monomères sont bien définis en densité, sans présenter de discontinuité sur toute la longueur de la chaîne polypeptidique.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	19.83 – 2.10 (2.16 – 2.10) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	33593 (2554) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	1871 (135) ^a
R (%)	20.0 (22.4) ^a
R_{libre} (%)	23.4 (25.6) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	2381 / 290
Nombre de molécules d'eau	154
Nombre d'atomes hors protéine et molécules d'eau	37 PEG ; 1 TRIS ; 1 Citrate ; 3 Ac-MetSO-NHMe
Facteurs B moyens : chaîne principale / chaînes latérales / eau + autres/ tous (Å ²)	26.4 / 29.0 / 67.2 / 37.3
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	88.0 %
dans les régions autorisées	10.1 %
dans les régions généreusement autorisées	0.8
dans les régions interdites	1.2
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.021
Sur les angles (°)	1.81

Tableau 16 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour le domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis*, en complexe avec le substrat.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

5. Etude structurale de la MsrB de *Xanthomonas campestris*

5.1. La forme oxydée

5.1.1. Cristallisation et collecte des données

Le criblage des conditions commerciales en gouttes à l'huile a permis d'obtenir plusieurs conditions basées sur du PEG 3000 ou 4000 ayant favorisé la formation de cristaux monocliniques (groupe d'espace $P2_1$, $a = 44.2 \text{ \AA}$, $b = 65.3 \text{ \AA}$, $c = 58.0 \text{ \AA}$, $\beta = 94.8^\circ$) assez rapidement (environ une semaine), pour une concentration initiale en protéines de 55 mg/mL (Tableau 17). Dans ces cristaux, deux monomères de MsrB étaient disposés dans l'unité asymétrique et il y avait 40 % de solvant.

De l'huile Paratone-N a été utilisée pour la cryo-protection du cristal sélectionné pour l'expérience de diffraction des rayons X. Un jeu de données complet à 99.6 % a été collecté sur la ligne X11 de DESY (longueur d'onde 0.81 \AA). Ce jeu est de bonne qualité jusqu'à une résolution de 1.66 \AA , comme l'atteste le traitement effectué avec la suite HKL (Otwinowski et Minor 1997) ($R_{\text{sym}} = 3.8 \%$, $I/\sigma(I) = 24.1$, redondance de 3.8 : valeurs moyennes sur une gamme de résolution allant de 50 à 1.66 \AA) (Tableau 17).

5.1.2. Résolution de la structure et procédure d'affinement

Etant donné notamment le pourcentage d'identité entre cette protéine et la MsrB issue de l'une ou l'autre espèce de *Neisseria* (44 % sur 114 résidus alignés), nous espérons résoudre la structure par remplacement moléculaire. Il s'est avéré que ni le modèle de *N. gonorrhoeae* (code PDB: 1L1D) ni celui de *N. meningitidis* dont nous avons résolu la structure n'a permis de le faire, aussi a-t-il fallu procéder à un phasage expérimental. Le fait qu'il y ait un atome de zinc fixé naturellement (voir partie Introduction, paragraphe 3.3.2) a permis de tirer profit du

Conditions de cristallisation	
Cristaux	Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux
 40*100*250 µm (pour une plaquette)	32% PEG 4000, 0.8M LiCl, 0.1M TRIS HCl pH 8.5 (JBS3-D6) ^b
	30% PEG 3000, 0.1M TRIS HCl pH 8.5, 0.2M LiSO4 (JBS1-D6)
	20% PEG 4000, 0.6M NaCl, 0.1M NaMES pH 6.5 (JBS3-C2)
	25% PEG 4000, 0.1M Na Citrate pH 5.6, 0.2M Sulf Ammo (JBS3-C6)
	30% PEG 4000, 0.1M Na Citrate pH 5.6, 0.2M Sulf Ammo (JBS3-D5)

Statistiques de collecte	
Caractéristiques	Valeurs finales
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille	a = 44.2 Å; b = 65.3 Å; c = 58.0 Å; α = γ = 90 °; β = 94.8 °
Longueur d'onde de collecte (Å)	0.811
Rotation (°)	180
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	145609
Nombre de réflexions uniques	38713
Limites de résolution (Å)	50 – 1.66 (1.72 – 1.66) ^c
Complétude (%)	99.6 (97.4) ^c
Redondance	3.8
R _{sym} (%)	3.8 (37.0) ^c
I/σ(I)	24.1 (2.1) ^c
% solvant	40

Tableau 17 Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrB de *X. campestris*, sous forme oxydée.
^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes
^b Condition ayant donné lieu au cristal utilisé pour la collecte des données de diffraction.
^c Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

signal anomal de cet atome lourd. Bien que la longueur d'onde de collecte du jeu de données de la forme native (0.81 Å : voir partie précédente) fût éloignée du pic d'absorption du zinc (1.2837 Å), la prise en charge de ce jeu de données par le protocole SAD d'Auto-rickshaw (voir partie 2.1.2 et Figure 4) a permis de résoudre la structure, de sorte qu'il n'y ait pas eu besoin d'effectuer des collectes supplémentaires.

SHELXD (Schneider et Sheldrick 2002) a permis de localiser les deux atomes de Zinc présents dans l'unité asymétrique ; leur configuration absolue a été déterminée avec ABS (Hao 2004), puis un affinement des deux sites et un phasage initial jusqu'à la résolution maximale de 1.66 Å a été effectué avec BP3 (Pannu et Read 2004). Les phases ont enfin été améliorées par modification de densité grâce à DM (Cowtan 1994). Par la suite, une exécution d'ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999) a abouti à la reconstruction de 95 % du modèle, lequel a été complété manuellement avec l'utilisation de TURBO/FRODO (Roussel et Cambillau 1991). Enfin, l'affinement du modèle a été mené avec l'utilisation de REFMAC5 (Murshudov

et al. 1997), en une procédure incorporant une correction de solvant et une mise à l'échelle anisotrope, en ayant défini chaque monomère comme un groupe TLS. Les remaniements manuels finaux utilisaient COOT (Emsley et Cowtan 2004). Le modèle final présente un facteur R de 19.2 % et un facteur R_{libre} de 23.7 % (Tableau 18).

Le modèle est globalement très bien défini en densité électronique, à tel point que plusieurs conformations alternatives de chaînes latérales sont présentes. Parmi elles se trouvent les deux résidus cystéine du site actif, en pont disulfure. En effet, les cartes du type 2Fo-Fc et Fo-Fc calculées montrent deux positions alternatives prises par l'atome S γ de Cys31 des deux monomères de l'unité asymétrique, mais dans le monomère B, les cartes de densité ont montré, en outre, deux positions de l'atome S γ de Cys117. Une des deux conformations prises par Cys117, dans ce cas, ne semblait pas l'impliquer dans une liaison covalente avec Cys31.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	43.27 – 1.66 (1.71 – 1.66) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	34541 (2572) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R_{libre}	1925 (148) ^a
R (%)	19.2 (23.8) ^a
R_{libre} (%)	23.7 (27.1) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	2433 / 306
Nombre de molécules d'eau	460
Nombre d'atomes hors protéine et molécules d'eau	2 Zn ²⁺
Facteurs B moyens :	
chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	20.6 / 22.3 / 33.4 / 23.3
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
Dans les régions les plus favorables	88.5
Dans les régions autorisées	11.1
Dans les régions généreusement autorisées	0.4
Dans les régions interdites	0
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.012
Sur les angles (°)	1.46

Tableau 18 Statistiques finales après affinement du modèle élaboré pour la MsrB de *X. campestris*, sous forme oxydée.
^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

5.2. Le complexe avec le substrat

5.2.1. Cristallisation et collecte des données

La protéine utilisée pour caractériser le complexe avec le substrat était le mutant inactif C117S (voir partie A, paragraphe 4).

De la même façon que pour la MsrB de *N. meningitidis*, le complexe entre la MsrB de *X. campestris* et le substrat a été préparé en co-cristallisant 20 mg/mL de l'enzyme muté avec le même mélange des deux stéréoisomères du substrat que précédemment (200 mM final) (voir partie 1.2). Des cristaux orthorhombiques (groupe d'espace $P2_12_12_1$) ont été obtenus dans deux conditions contenant du PEG 8000, à pH 7.5. Deux monomères y étaient présents dans l'unité asymétrique et ils contenaient 51 % de solvant. La condition qui a permis la formation des cristaux le plus rapidement (environ 3 semaines) a été choisie pour la collecte des données (Tableau 19).

Des données de diffraction ont été collectées à 2.5 Å de résolution sur la ligne BW7A (longueur d'onde 1.24 Å) du synchrotron DESY (Hambourg). La liqueur mère étant suffisamment cryo-protectrice, le cristal choisi pour la collecte des données a été directement prélevé de la goutte et monté sur le diffractomètre. Cependant, aucun des essais de cristallisation effectués n'a donné lieu à des monocristaux de bonne qualité (les cristaux se présentaient sous forme de fines plaques agglomérées), ce qui s'est répercuté sur un jeu de données de diffraction présentant des statistiques modestes, pour une relativement faible résolution (2.5 Å). Les données ont été retenues jusqu'à cette résolution maximale, car les intensités mesurées y présentaient encore un bon rapport signal/bruit, malgré un R_{sym} assez élevé (Tableau 19). Ces données étaient complètes à 97.8 %, présentaient une redondance de 12.6, un R_{sym} de 12.5 % et un $I/\sigma(I)$ moyen de 11.7 ; des détails plus complets de leurs caractéristiques sont présentés dans le Tableau 19.

5.2.2. Remplacement moléculaire et procédure d'affinement

Deux procédures de remplacement moléculaire utilisant MOLREP (Vagin et Teplyakov 1997) ont été tentées : l'une à partir du monomère A de la forme oxydée de la MsrB de *X. campestris*, et l'autre à partir du monomère A de la forme réduite de la MsrB de *N. meningitidis*. Lors de ce dernier processus, le programme a intégré automatiquement la séquence de la MsrB de *X. campestris* dans le modèle. Contrairement au cas de la forme

oxydée dont la structure a dû être résolue par la méthode SAD, les deux procédures ont donné des solutions ici. Dans les deux cas, les deux monomères ont pu être positionnés dans l'unité asymétrique, mais la solution issue du modèle de *N. meningitidis* semblait mieux se dégager

Conditions de cristallisation	
Cristaux	Conditions initiales ^a ayant donné des cristaux
 40*80*150 µm (pour une plaquette)	18 % PEG 8000 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M acétate de calcium (JBS5-B1) ^b
	20 % PEG 8000 0.1 M Na HEPES pH 7.5 (JBS5-B4)

Statistiques de collecte	
Caractéristique	Valeur finale
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de maille	a = 39.5 Å; b = 74.2 Å; c = 123.0 Å; α = β = γ = 90°
Longueur d'onde de collecte (Å)	1.24
Rotation (°)	360
Pas d'oscillation (°)	1
Nombre total de réflexions	163180
Nombre de réflexions uniques	12926
Limites de résolution (Å)	50 – 2.50 (2.59 – 2.50) ^c
Complétude (%)	97.8 (94.3) ^c
Redondance	12.6
R _{sym} (%)	12.5 (54.8) ^c
I/σ(I)	11.7 (2.2) ^c

Tableau 19 Conditions de cristallisation et statistiques sur les jeux de données de diffraction collectés pour la MsrB de *X. campestris*, en complexe avec le substrat.
^a Conditions initiales : composition de la solution qui est mélangée à la solution protéique pour préparer les gouttes
^b Condition ayant donné lieu au cristal utilisé pour la collecte des données de diffraction.
^c Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

que l'autre. A titre indicatif, la solution issue du remplacement moléculaire utilisant la forme oxydée de la MsrB de *X. campestris* présentait un facteur R de 54.6 % et un facteur R_{libre} de 54.0 % tandis que celle utilisant la MsrB de *N. meningitidis* donnait un facteur R de 51.5 % et un facteur R_{libre} de 48.5 % (valeurs calculées avec les réflexions de la gamme de résolution utilisée pour l'affinement, c'est à dire 26.5 Å – 2.49 Å). L'affinement a été effectué avec REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997), et a donné lieu à un modèle présentant actuellement un facteur R de 17.8 % et un facteur R_{libre} de 25.8 % (Tableau 20). Dans ce cas également, l'écart entre les deux facteurs d'accord R et R_{libre} n'est pas tout à fait satisfaisant. Ici aussi, le modèle nécessite vraisemblablement d'être affiné en diminuant légèrement la résolution maximale, les réflexions présentant manifestement une qualité médiocre à ce niveau (voir paragraphe précédent et tableau 19).

Un pic de densité pouvant être interprété par le substrat est apparu en cours d'affinement au niveau du site actif du monomère A. Cependant, contrairement au cas du complexe similaire utilisant la MsrB de *N. meningitidis*, la définition de ce dernier en termes de densité électronique est relativement faible au niveau de sa chaîne principale (voir partie B, section IV, paragraphe 2.2.2). Ceci est certainement imputable à la qualité relativement médiocre des données, en particulier dans la plus haute gamme de résolution (voir paragraphe précédent). Un pic de densité positive est également présent au niveau du site actif du monomère B, mais ce dernier ne pouvait pas correspondre au substrat, d'une part à cause de sa forme au niveau des cartes de densité électronique de type 2Fo-Fc ou Fo-Fc calculées, mais également du fait de la présence à proximité d'une boucle du monomère A en interaction avec les résidus du site actif de ce deuxième monomère (voir partie B, section IV, paragraphe 2.2.2). La carte de densité électronique de type Fo-Fc montrait une persistance d'un pic positif à ce niveau, même en ayant affiné la structure en présence d'une molécule d'eau ; il s'agissait donc d'une espèce plus riche en électrons. Parmi toutes les espèces présentes dans la solution de cristallisation (voir paragraphe précédent), seul un ion calcium permettait d'interpréter convenablement ce pic de densité électronique.

Caractéristiques	Valeurs finales
Limites de résolution (Å)	26.55 – 2.49 (2.55 – 2.49) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R	11596 (739) ^a
Nombre de réflexions utilisées pour calculer R _{libre}	636 (45) ^a
R (%)	17.8 (27.4) ^a
R _{libre} (%)	25.8 (34.0) ^a
Nombre d'atomes protéiques hors hydrogène / nombre de résidus	2350 / 306
Nombre de molécules d'eau	90
Espèces hors protéine et molécules d'eau	1 MetSO, 2 Zn ²⁺ , 1 Ca ²⁺
Facteurs B moyens :	
chaîne principale / chaînes latérales / eau / tous (Å ²)	25.5 / 26.1 / 31.4 / 26.2
Diagramme de Ramachandran: nombre de résidus (%)	
dans les régions les plus favorables	85.7
dans les régions autorisées	13.9
dans les régions généreusement autorisées	0
dans les régions interdites	0.4
Ecart quadratique moyen par rapport à la géométrie standard	
Sur les longueurs de liaisons (Å)	0.027
Sur les angles (°)	2.451

Tableau 20 Statistiques après affinement actuel du modèle élaboré pour la MsrB de *X. campestris* (mutant C117S) co-cristallisée avec le substrat.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

SECTION II

Le domaine N-terminal de PilB

1. Description de la structure du domaine N-terminal de PilB

1.1. Bilan des résultats expérimentaux

La structure de la forme réduite a d'abord été résolue à partir des cristaux quadratiques obtenus avec le dérivé sélénié du double mutant L100/S158M, à 2.6 Å de résolution ; la méthode SAD a été utilisée pour la détermination de ce modèle préliminaire. La structure de la forme sauvage (1.9 Å de résolution) a ensuite été complétée et affinée à partir de ce premier modèle, en utilisant les données collectées avec les cristaux monocliniques correspondants (voir la partie Matériel et Méthodes à la Section I, Tableau 1, page 92). Le modèle final ainsi obtenu (un monomère dans l'unité asymétrique) recouvre toute la séquence de la protéine produite, à partir du résidu Val33 jusqu'au résidu Leu175 de la séquence de la protéine PilB de *N. meningitidis*, avec un facteur R de 19.9 % et un facteur R_{free} de 22.4 %. L'analyse de ce modèle à la fois avec PROCHECK (Laskowsky *et al.* 1993) et CNS (Brunger *et al.* 1998) a montré une bonne stéréochimie et aucun résidu dans une zone interdite du diagramme de Ramachandran (voir Section I, Tableau 2, page 94). L'étude de cette structure a fait l'objet d'un article publié dans Journal of Molecular Biology (Ranaivoson *et al.* 2006) présenté en Annexe 1 de ce manuscrit. La structure a été déposée dans la PDB sous la référence 2FY6.

La structure de la forme oxydée a, quant à elle, été résolue par remplacement moléculaire, à partir de celle de la forme réduite, en utilisant un cristal quadratique diffractant jusqu'à 2.1 Å. Le pont disulfure attendu entre Cys67 et Cys70 est très bien défini en termes de densité électronique (voir paragraphe 1.4 et Figure 9 plus bas). Le modèle (un monomère dans l'unité asymétrique) recouvre ici aussi la séquence entière de la protéine, augmentée en N-terminal de la méthionine introduite pour la production de la protéine ; il présente un facteur R de 20.7 % et un facteur R_{free} de 27.7 %. Ici également, un examen du modèle avec PROCHECK (Laskowsky *et al.* 1993) et CNS (Brunger *et al.* 1998) montre de bonnes caractéristiques stériques et géométriques : en particulier, aucun résidu ne se situe dans une zone non autorisée dans le diagramme de Ramachandran.

Dans les deux cas, seules quelques chaînes latérales en surface de la protéine sont faiblement définies en termes de densité électronique. Celle de Leu69 en fait partie ; il s'agit du résidu X₂ du motif CX₁X₂C, constituant le centre redox de la protéine. En effet, les atomes

en positions γ , δ^1 et δ^2 de ce résidu ne sont pas définis en densité, et ils présentent des facteurs d'agitation thermiques élevés.

Par ailleurs, malgré la différence entre les deux groupes d'espace des cristaux en question (C2 pour la forme réduite et P4₁2₁2 pour la forme oxydée), les deux empilements cristallins se révèlent être relativement similaires, avec seulement une légère réorientation des molécules entre elles. Ainsi, dans les deux types de cristaux, il y a peu d'interactions directes entre monomères voisins, la plupart étant établies par le biais de molécules d'eau. Par ailleurs le positionnement relatif de deux voisins symétriques au sein du cristal dispose les deux sites actifs en face l'un de l'autre, établissant quelques contacts directs, mettant notamment en jeu un groupement carbonyle d'une chaîne principale au voisinage de Leu69, expliquant probablement en partie l'agitation de sa chaîne latérale mentionnée plus haut, bien que cette observation pourrait correspondre à un comportement naturel de ce résidu.

1.2. Le repliement global

Comme décrit dans la partie A, paragraphe 3.6.2, la séquence de Dom1_{PilB} rapproche ce domaine des protéines apparentées à la thioredoxine, et les expériences biochimiques et enzymologiques lui révèlent un comportement similaire à la thioredoxine 1 d'*E. coli*, en particulier vis-à-vis des domaines Msr de PilB.

Effectivement, le repliement canonique des protéines structurellement apparentées aux thioredoxines (Trx) (que l'on regroupera sous l'appellation de "protéines de type Trx", en anglais "Trx-like") est retrouvé dans la structure globale de Dom1_{PilB}. Il s'agit d'un repliement composé d'un feuillet β mixte à quatre brins (β_I à β_{IV}) autour duquel sont disposées trois hélices α . Ces éléments de structure secondaire sont connectés entre eux selon l'ordre $\beta_I\alpha\beta_{II}\alpha\beta_{III}\beta_{IV}\alpha$ en suivant la séquence. Pour former le feuillet, les brins β du cœur s'organisent dans l'ordre II-I-III-IV, β_{III} étant anti-parallèle aux autres (Figure 1).

Chez une grande partie des protéines de type Trx, des éléments de structure secondaire supplémentaires s'additionnent à ce repliement commun. Bien qu'elles soient à l'origine de l'appellation du repliement de base, les structures de Trx ont ce type d'insertion : une extension en N-terminal forme un cinquième brin β qui vient s'additionner au feuillet central en interagissant parallèlement au brin β_{II} et se prolonge par une hélice α avant de commencer le repliement canonique décrit ci-dessus (Figure 2).

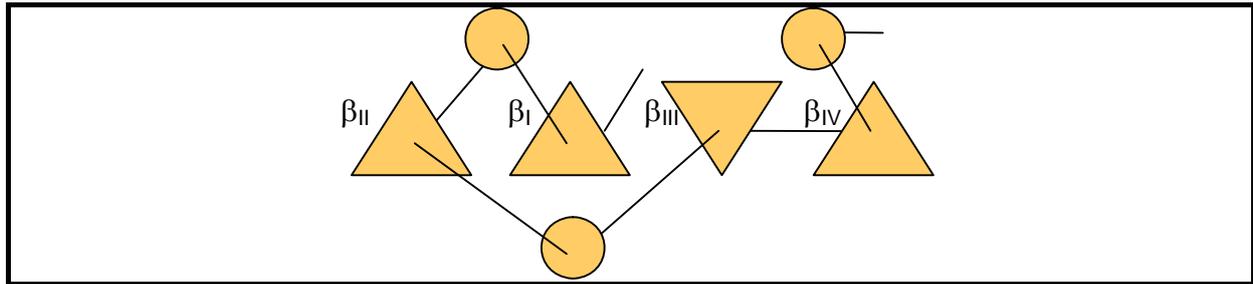


Figure 1

Schéma topologique du repliement canonique des protéines de type Trx.

Les hélices α sont représentées par des cercles et les brins β par des triangles dont les orientations relatives (pointe en haut ou en bas) reflètent le sens respectif des brins les uns par rapport aux autres (parallèles ou antiparallèles).

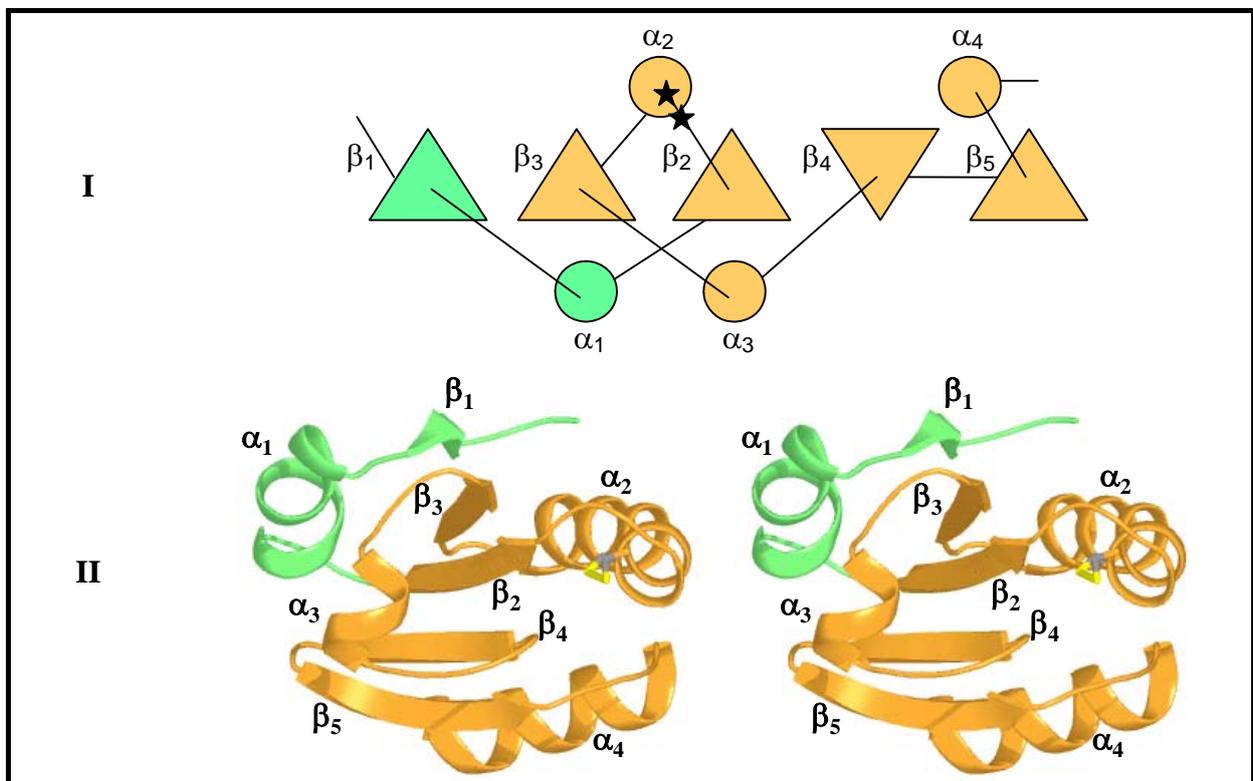


Figure 2

Schémas représentant (I) la topologie du repliement des Trx, et (II) un exemple de structure tridimensionnelle associée, la Trx1 d'*E. coli* (code PDB: 1XOB (Jeng *et al.* 1994)) (représentation stéréo).

Le repliement canonique est représenté en orange, les éléments de structure secondaire additionnels sont en vert. Le feuillet β mixte est ordonné 1-3-2-4-5. Dans (I), les étoiles marquent la position approximative des résidus cystéine catalytiques, représentés en mode bâtons dans (II).

La formation du pont disulfure n'a pas affecté la conformation globale de Dom1_{PilB}, aussi, oxydée ou réduite, la protéine présente le même repliement. Son feuillet β central contient cinq brins (notés β_1 à β_5 suivant la séquence), comme chez les Trx. Dans les deux cas, le brin β supplémentaire s'organise d'une manière comparable pour donner le feuillet central, mais dans le cas de Dom1_{PilB}, il n'est pas apporté par une extension en N-terminal,

mais une insertion à l'intérieur du repliement canonique : il s'agit du brin β_3 . En effet, au-delà du brin β_2 , à partir de Gly98 jusqu'à Gly127, la chaîne polypeptidique se replie pour former une hélice α puis le brin β_3 avant de reprendre le repliement qui la classe parmi les protéines de type Trx. L'extrémité N-terminale (de Val33 à Lys56) constitue également une insertion dans le repliement de base, puisqu'elle forme une courte hélice α (appelée α_0), un coude, et finalement un tour d'hélice 3_{10} . En définitive, en plus du feuillet β central, Dom1_{PilB} contient cinq hélices α (α_0 à α_4) et une très courte hélice 3_{10} ; parmi ces éléments de structure secondaire, les hélices α_1 , α_3 et α_4 , et les brins β_1 , β_2 , β_4 et β_5 constituent le repliement canonique des protéines de type Trx. En regard de la description de ce repliement de base effectuée plus haut, β_1 joue le rôle de β_I , β_2 de β_{II} , β_4 de β_{III} et β_5 de β_{IV} (Figure 3).

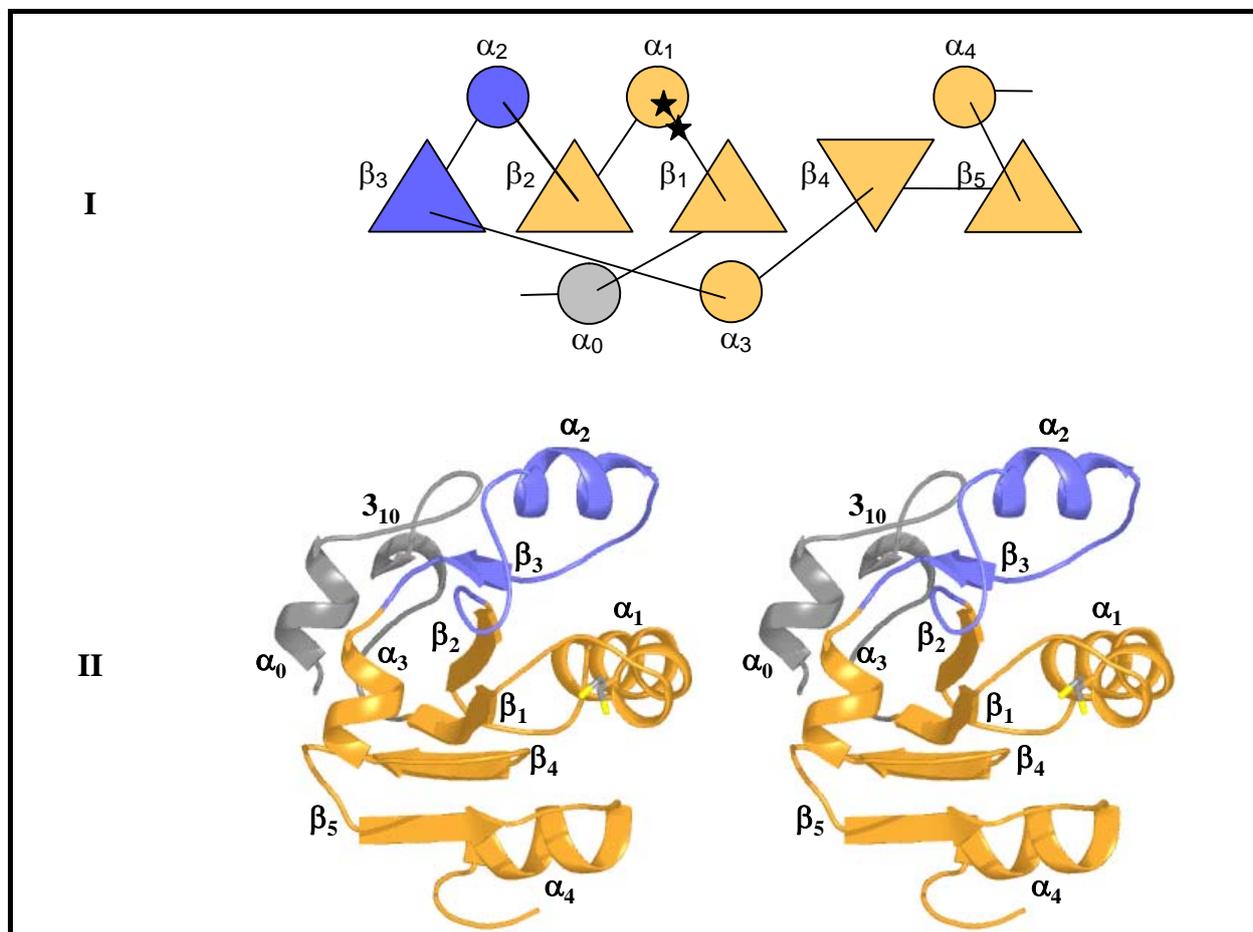


Figure 3

Schémas représentant (I) la topologie du repliement du domaine N-terminal de PilB, et (II) la structure tridimensionnelle associée (représentation stéréo).

Le repliement canonique est représenté en orange, les éléments de structure secondaire insérés dans le repliement canonique sont en gris ou bleu. Le feuillet β mixte est ordonné 3-2-1-4-5. L'hélice α_0 de l'extrémité N-terminale occupe grossièrement la même position que l'hélice α_1 des Trx. En revanche, α_2 n'a pas d'équivalent spatial chez les Trx.

Dans (1), les étoiles marquent la position approximative des résidus cystéine catalytiques, représentés en mode bâtons dans (2).

1.3. Les voisins structuraux

Une recherche de voisins structuraux de Dom1_{PilB} en utilisant DALI (Holm et Sander 1993) et VAST (Gibrat *et al.* 1996) a abouti à une série de protéines de type Trx, mais les deux programmes ont établi un classement différent en fonction de la procédure interne utilisée pour estimer les similarités. Le classement issu de DALI dépend du Z-score et celui issu de VAST suit un score propre ("VAST-score") défini par les auteurs. Néanmoins, la synthèse des résultats obtenus conduit à observer que certaines disulfures oxydo-réductases périplasmiques émergent légèrement des Trx et des peroxyrédoxines. Avec DALI la protéine ResA de *Bacillus subtilis* (codes PDB 1SU9 et 1ST9 (Crow *et al.* 2004) donne le meilleur score (Z-score = 14.8), suivie par la protéine TlpA de *Bradyrhizobium japonicum* (code PDB : 1JFU (Capitani *et al.* 2001)) (Z-score = 12.6). Avec VAST, ces deux protéines se retrouvent respectivement en troisième et huitième position, tandis que le meilleur score est obtenu avec la protéine DsbE de *M. tuberculosis* (code PDB : 1LU4 (Goulding *et al.* 2004); VAST-score = 15.0) – une protéine apparemment absente de la base de données utilisée par DALI. Ces protéines sont repliées de la même manière et sont regroupées au sein d'une sous-classe de protéines de type Trx sous la dénomination de CMP ("Cytochrome Maturation Protein") (Copley *et al.* 2004). Cinq CMP d'organismes différents sont présents dans la PDB ; les trois citées ci-dessus et les structures de DsbE de *B. japonicum* (code PDB : 1KNG (Edeling *et al.* 2002)) et d'*E. coli* (code PDB : 1ZY5 (Stirnemann *et al.* 2005)). Cette recherche de voisins structuraux fait ainsi ressortir les mêmes types de protéines que lors de l'analyse préliminaire de la séquence (partie A paragraphe 3.6.2). Ces cinq structures seront toutes considérées dans cette étude structurale (Figure 4), bien que les deux dernières soient éloignées dans les classements issus de DALI et VAST lors de la recherche de voisins structuraux de Dom1_{PilB}.

A partir de l'entrée dans le brin β 1, le nombre des éléments de structures secondaires des CMP est identique à celui donné par le repliement de Dom1_{PilB}, ainsi que leur succession dans la structure primaire et leur organisation spatiale relative (Figure 4 et Figure 5). C'est ainsi qu'une superposition entre Dom1_{PilB} et l'une quelconque des cinq structures de CMP donne des écarts quadratiques moyens sur les positions (r.m.s.d.) des atomes C α compris entre 1.7 et 1.9 Å, pour environ 100 atomes superposés. En outre, toutes les protéines considérées possèdent une insertion en N-terminal par rapport au repliement Trx canonique, mais elles forment toutes une structure en épingle à cheveux sauf dans le cas de Dom1_{PilB}. En

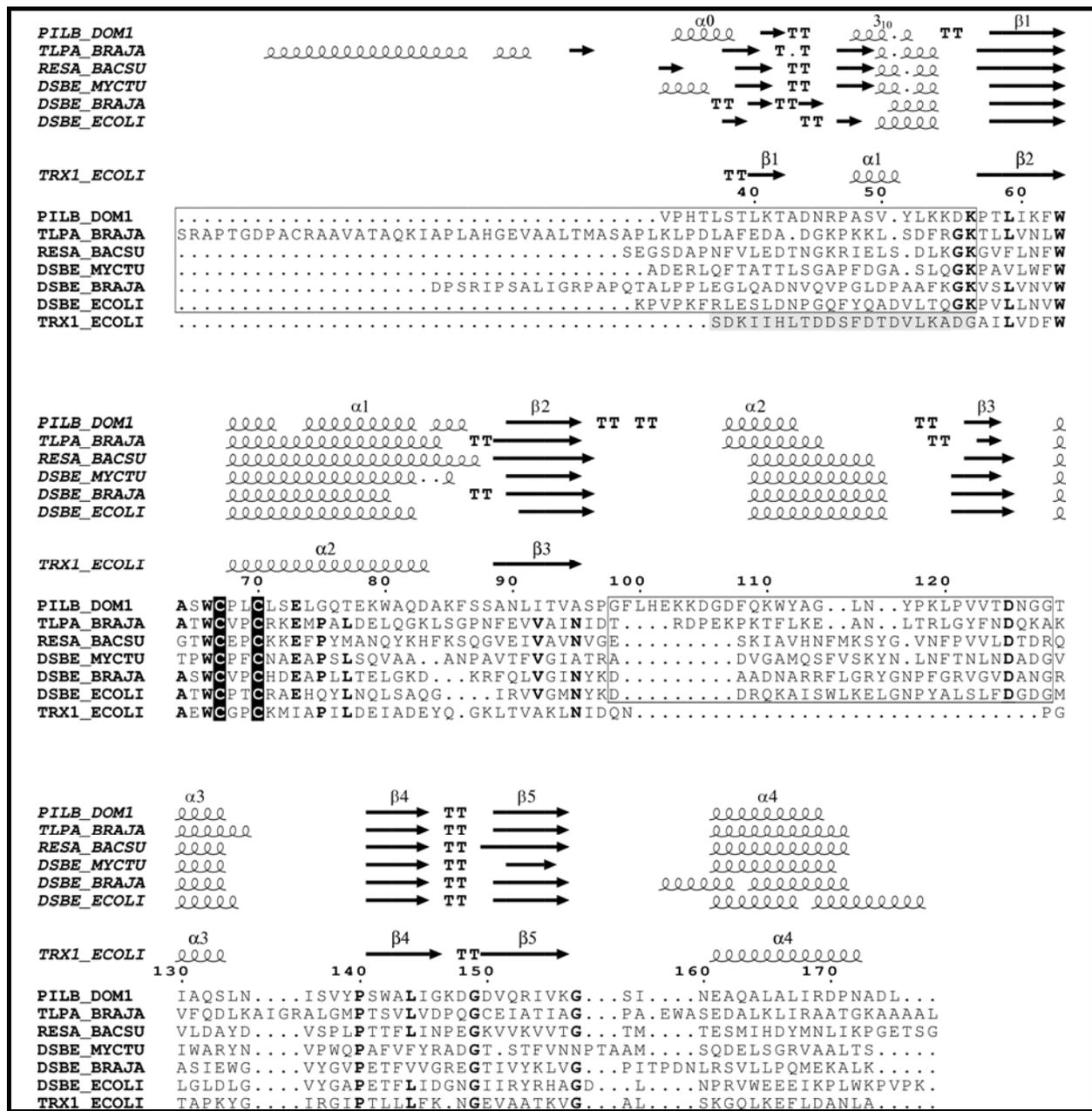


Figure 4

Séquences du domaine N-terminal de la protéine PilB de *N. meningitidis*, des protéines ResA de *B. subtilis*, TlpA de *B. japonicum*, DsbE de *M. tuberculosis*, CcmG/DsbE d'*E. coli* et de la Trx1 d'*E. coli*, alignées selon la superposition de leur structures tridimensionnelles, et représentées associées à leur structures secondaires. Les résidus encadrés ou surlignés en gris correspondent respectivement aux éléments de structures secondaires additionnels au repliement Trx canonique chez les CMP ou chez la Trx1. Attention, contrairement à ce que laisse supposer ce type de représentation, les parties N-terminales de ces protéines n'ont aucune équivalence spatiale, bien que représentées alignées. La figure a été réalisée avec le logiciel EsPript (Gouet *et al.* 2003).

effet, dans ce cas, à la place d'un premier brin β , le début de la chaîne polypeptidique se replie pour donner l'hélice α_0 , ce qui aboutit à une éloignement du fragment qui suit 8 Å plus loin, où elle forme un tour d'hélice 3_{10} au lieu du deuxième brin β de la structure en épingle à cheveux observée dans les autres structures. Il est possible que cette différence structurale

résulte de l'absence des résidus présents normalement en amont de Val33 dans la protéine PilB entière (voir la section I, paragraphe 1.1).

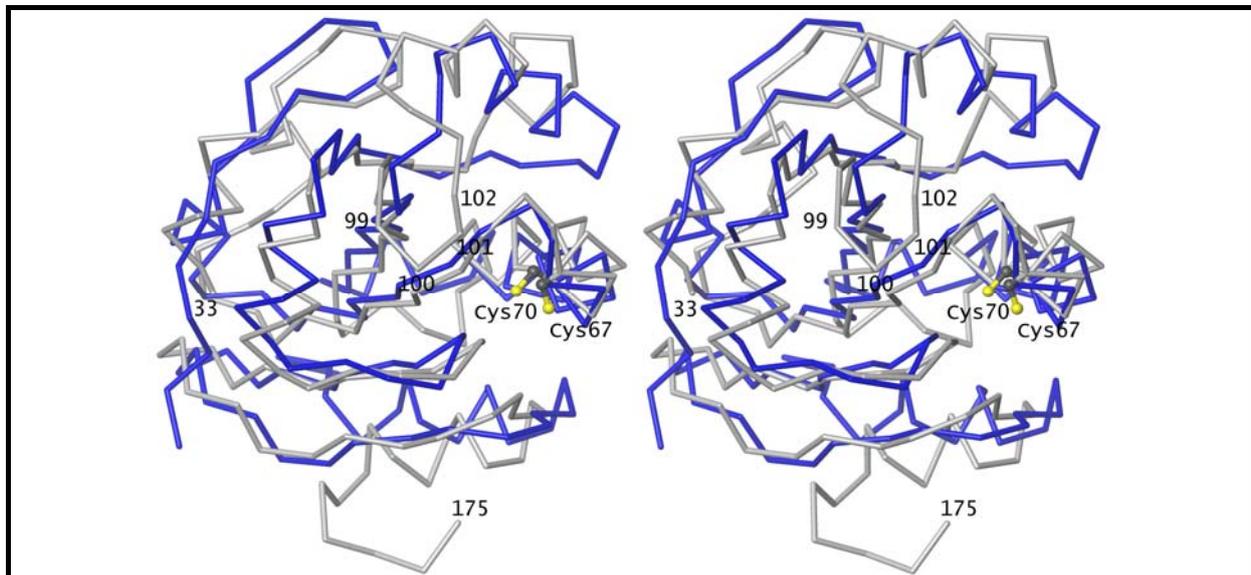


Figure 5 Représentation stéréo des traces α superposées des structures de Dom1_{PilB} (en gris) et ResA de *B. subtilis* (en bleu) (code PDB 1SU9, (Crow *et al.* 2004)). Les deux résidus cystéine de Dom1_{PilB} sont représentés en mode sphères et bâtons.

La superposition entre les différentes structures révèle une autre particularité de Dom1_{PilB} : la boucle reliant β 2 et α 2 (de Ser96 à Gly106) y est plus longue de quatre résidus (₉₉FLHE₁₀₂), lesquels se dégagent donc comme une insertion par rapport aux autres structures; ils forment un coude dans une région proche du site actif (voir paragraphe suivant et Figure 6).

Dans la mesure où il est établi que Dom1_{PilB} présente des fonctions du type Trx vis-à-vis des domaines Msr de la protéine PilB (Wu *et al.* 2005) (voir partie A paragraphe 3.6.2), il convient de comparer sa structure à celles des Trx. La Trx1 d'*E. coli* (code PDB : 1XOB (Jeng *et al.* 1994)) servira de modèle pour cette comparaison. Comme expliqué plus haut, les Trx ont également un feuillet β central à cinq brins qui est tout à fait superposable à celui de Dom1_{PilB}. Cependant, le fait que le brin β supplémentaire par rapport au repliement canonique soit apporté par deux régions différentes de la séquence apporte des différences sensibles dans les structures globales. En premier lieu, les fragments N-terminaux ne jouent pas un rôle structural équivalent. Celui des Trx forme le brin β 1 du feuillet central et l'hélice α 1, tandis que celui de Dom1_{PilB} forme les deux hélices α 0 et α 3₁₀. On peut noter que dans les deux structures de Trx1 d'*E. coli* et de Dom1_{PilB} superposées (r.m.s.d. = 1.72 Å entre 81 α superposés), les hélices α 1 et α 0 occupent la même région de l'espace, mais il convient d'être

prudent sur l'interprétation de cette observation car, comme énoncé plus haut, il se peut que la formation de l'hélice $\alpha 0$ soit due à la troncature en 33 de Dom1_{PilB}. Par ailleurs, si les brins β supplémentaires par rapport au repliement canonique ($\beta 3$ dans Dom1_{PilB} et $\beta 1$ dans Trx1) sont effectivement superposables dans les deux structures, le fragment qui relie les deux brins $\beta 2$ et $\beta 3$ n'a pas d'équivalent dans le cas de la Trx1, laquelle n'a donc pas d'hélice comparable à l'hélice $\alpha 2$ formée au sein de ce fragment. De fait, la Trx1 n'a pas d'élément structural comparable aux résidus ₉₉FLHE₁₀₂ mentionnés plus haut (Figure 4 et Figure 7).

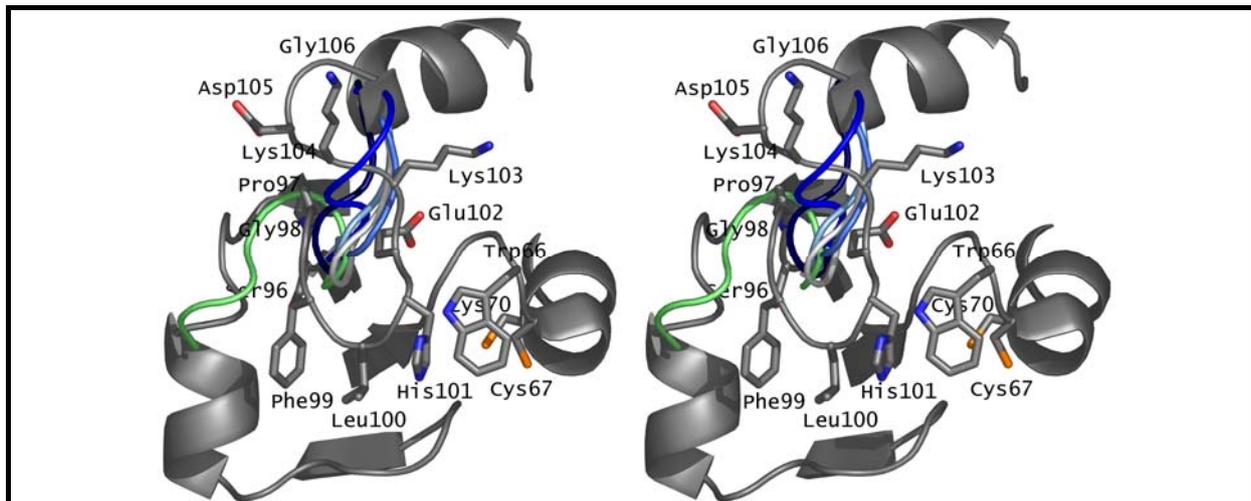


Figure 6

Représentation stéré montrant la région de la boucle Ser96-Gly106 qui connecte $\beta 2$ à $\alpha 2$ dans Dom1_{PilB} sous forme réduite.

A titre de comparaison, les boucles équivalentes sont plus courtes dans ResA de *B. subtilis* (bleu marine), TlpA de *B. japonicum* (bleu), DsbE de *M. tuberculosis* (bleu ciel), CcmG/DsbE de *B. japonicum* (bleu clair) et CcmG/DsbE d'*E. coli* (blanc). L'ordre différent des brins β observés dans la Trx1 d'*E. coli* conduit à l'absence d'hélice α spatialement équivalente à $\alpha 2$ de Dom1_{PilB} ou des CMP, de sorte qu'en sortie de $\beta 2$, la chaîne forme une boucle (représentée en vert) qui relie directement à $\alpha 3$.

Enfin, rappelons que Dom1_{PilB} présente une structure très similaire selon que la protéine est sous forme réduite ou oxydée : une superposition entre les deux formes donne un r.m.s.d. de 0.48 Å pour 143 atomes C α superposés. Aussi, la conformation du site actif des deux formes de la protéine est quasiment inchangée

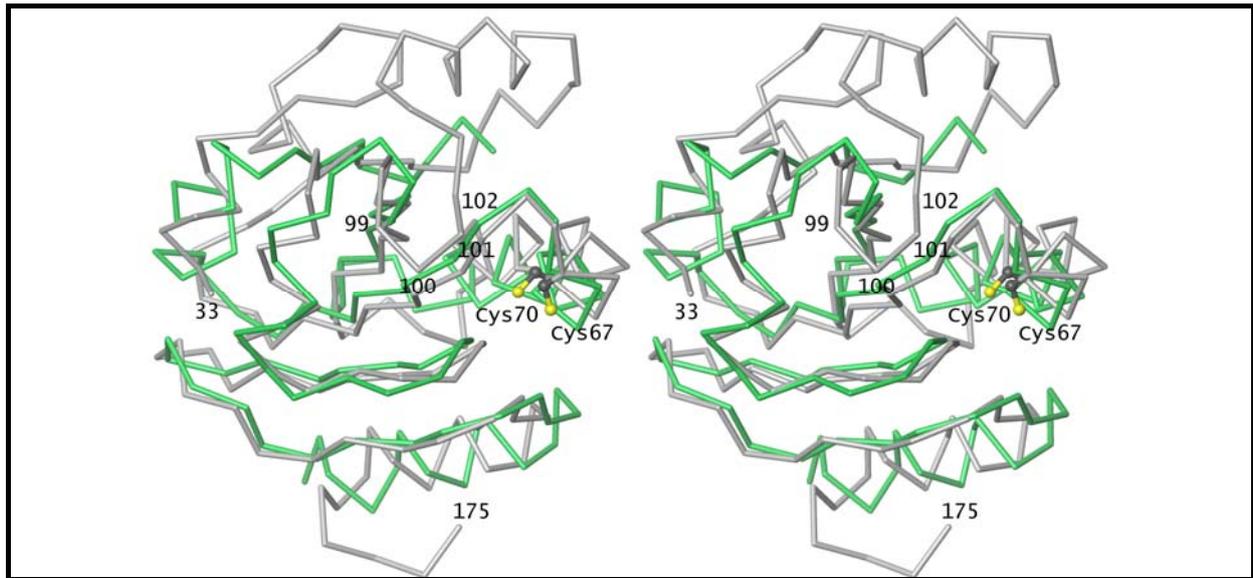


Figure 7 Représentation stéréo des traces C α superposées des structures de Dom1_{PilB} (en gris) et Trx1 d'*E. coli* (en vert) (code PDB: 1XOB (Jeng *et al.* 1994)). Les deux résidus cystéine de Dom1_{PilB} sont représentés en mode sphères et bâtons.

1.4. Le site actif

Le motif du site actif $_{67}\text{CPLC}_{70}$ se trouve à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 – la première hélice du repliement Trx canonique. Comme c'est souvent le cas dans cette famille de protéines, cette hélice présente une rupture en son sein (en position 75 ici), due à la présence d'une glycine, un résidu classiquement à l'origine de ruptures dans les hélices α . Les axes des deux parties d'hélices résultantes forment un angle d'environ 40° (Figure 8). Dans les structures de protéines homologues, une courbure équivalente est également observée, mais causée par un résidu proline.

Au sein du motif $_{67}\text{CPLC}_{70}$, le cycle pyrrolidine de Pro68 forme une proéminence à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 , et la chaîne latérale du résidu Leu69 semble agitée (voir paragraphe 1.2.).

Comme annoncé plus haut, (fin du paragraphe 1.1), les résidus proches du site actif de deux voisins symétriques se font face l'un à l'autre, et établissent quelques contacts directs, de nature similaire, qu'il s'agisse de la forme réduite ou oxydée, bien que la différence entre les deux groupes d'espace affecte visiblement légèrement l'orientation relative de ces deux monomères, et donc le positionnement des différents atomes des résidus relevés ici. Ces contacts impliquent en particulier les chaînes latérales de Trp66, Pro68 et Leu69, au contact

de Pro68 et His101 d'un monomère voisin (voir Figure 9). Le cycle pyrrolidine de Pro68 du voisin symétrique vient se positionner au-dessus du noyau aromatique de Trp66, ses atomes occupant ainsi l'espace entre His101 et Trp66. Dans la forme oxydée, par exemple, les atomes C γ et C δ de ce résidu Pro68 sont distants en moyenne de 3.7 Å du noyau indole de Trp65, tandis que le plan formé par la liaison peptidique qu'il établit avec Leu69 se met parallèlement avec celui du cycle imidazole de His101, les deux plans étant distants d'environ 4 Å. Deux résidus plus loin, on peut observer le résidu His101 du même voisin symétrique se positionnant ainsi entre Pro68 et Leu69.

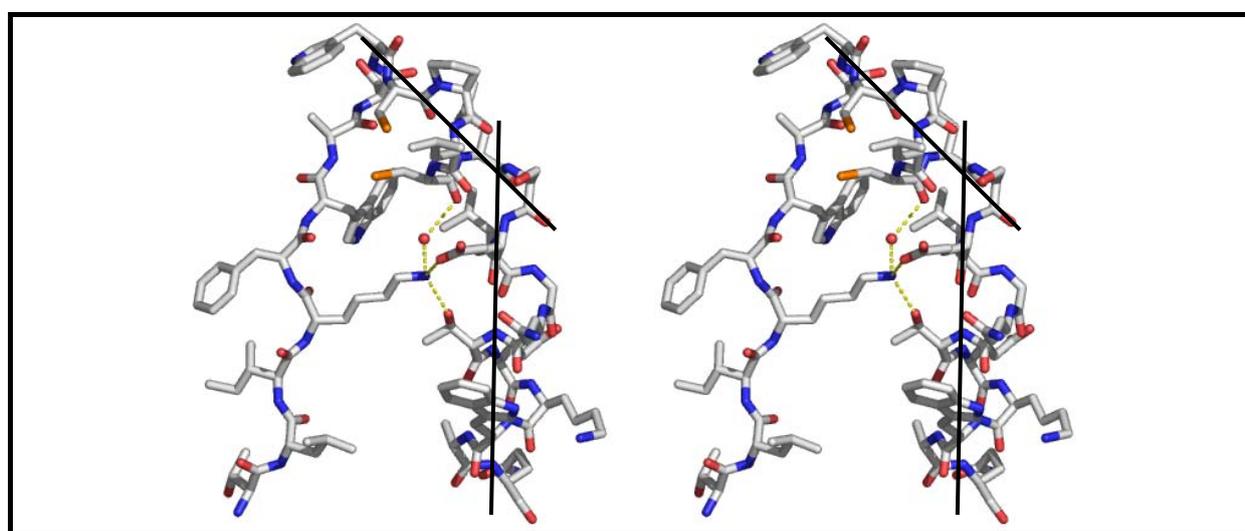


Figure 8 Représentation stéréo des résidus 58 à 82 de Dom1_{PilB}, correspondant aux structures secondaires $\beta 1$ et $\alpha 1$ ainsi qu'à la boucle les reliant. Cys67 est observée à l'extrémité N-terminale de $\alpha 1$, Cys70 un tour d'hélice plus loin. $\alpha 1$ présente un coude, mis en évidence par la représentation schématisée des deux portions d'axes de l'hélice. On notera l'interaction entre $\beta 1$ et $\alpha 1$ par le biais de liaisons hydrogène impliquant Lys61, en particulier le pont salin Lys61-Glu73.

L'atome S γ de Cys67 est dirigé à l'extérieur du site actif, le rendant accessible au solvant alors que Cys70 est plus enfoui à l'intérieur de la protéine. Dans la forme réduite, les deux S γ de Cys67 et Cys70 sont distants de 3.3 Å, une distance suffisamment grande pour exclure la présence d'un pont disulfure (environ 2 Å) (Figure 9). Par ailleurs, les cartes de densité électronique définissant ces deux résidus ne montrent aucun pic pouvant correspondre à une liaison covalente entre les deux soufres. Cette distance de 3.3 Å, additionnée aux positions relatives des atomes des deux résidus Cys, montre que les deux atomes de soufre sont en liaison hydrogène étroite. En effet, les quatre atomes C β_{67} , S γ_{67} , S γ_{70} et C β_{70} forment un angle dièdre virtuel de 70°, avec un angle entre C β_{67} , S γ_{67} et S γ_{70} de 79° et un angle entre

$S\gamma_{67}$, $S\gamma_{70}$ et $C\beta_{70}$ de 93° , ce qui correspond à une bonne géométrie entre deux groupements thiols de cystéines pour l'établissement d'une liaison hydrogène entre eux (Kerr *et al.* 1975). $S\gamma_{67}$ est impliqué dans deux autres liaisons hydrogène, avec les atomes d'azote des chaînes principales de Leu69 (distance entre les deux atomes : 3.5 Å) et de Cys70 (distance entre les deux atomes : 3.4 Å). L'environnement de l'atome $S\gamma_{69}$ est, quant à lui, essentiellement hydrophobe, du fait de la présence de la chaîne latérale de *cis*-Pro140 et des atomes $C\beta$ de Tyr139 et Trp63 ; aucun groupement potentiellement donneur ou accepteur de liaisons hydrogène – à part $S\gamma_{67}$ – ne se trouve dans un rayon de 3.9 Å autour de cet atome, distance maximale relevée pour des liaisons hydrogène entre un groupement thiol et un atome d'oxygène ou d'azote (Adman *et al.* 1975 ; Kerr *et al.* 1975 ; Gregoret *et al.* 1991) (Figure 9).

La présence du pont disulfure dans la forme oxydée n'a pas apporté de différences structurales majeures dans la conformation du site actif. Les chaînes principales des résidus formant le site catalytique restent en tout point superposables à celles de la forme réduite. Les seules rotations d'angles χ_1 autour des liaisons covalentes $C\alpha$ - $C\beta$ des deux résidus cystéine suffisent à rapprocher suffisamment les atomes de soufre de sorte que le pont disulfure puisse s'établir. Une légère différence est observée entre les deux structures au niveau de la boucle ${}_{99}\text{FLHE}_{102}$, mais dans la mesure où cette boucle est impliquée dans l'empilement cristallin, et qu'elle n'établit pas d'interaction directe avec Cys67 ni Cys70 cette observation doit plutôt être mise sur le compte de la différence entre les groupes d'espace des cristaux ayant permis la détermination de ces deux structures (Figure 9).

Dans le tour suivant de l'hélice α_1 , le résidu Glu73 est impliqué dans un réseau de liaisons hydrogène probablement importantes dans la stabilisation de la conformation du site actif, et/ou qui pourraient être impliquées dans la réactivité des cystéines du motif ${}_{67}\text{CPLC}_{70}$ (voir paragraphe 2). Ces interactions sont présentes dans les deux formes réduite et oxydée. L'atome $O\epsilon_1$ de Glu73 interagit par une liaison hydrogène/pont salin avec l'atome $N\zeta$ du résidu Lys61 appartenant au brin β_1 . $N\zeta_{61}$ partage aussi une liaison hydrogène avec l'atome $O\delta$ de Thr77 et une autre avec une molécule d'eau ; cette dernière est liée à l'oxygène carbonyle de la chaîne principale de Cys70 (Figure 8 et Figure 9).

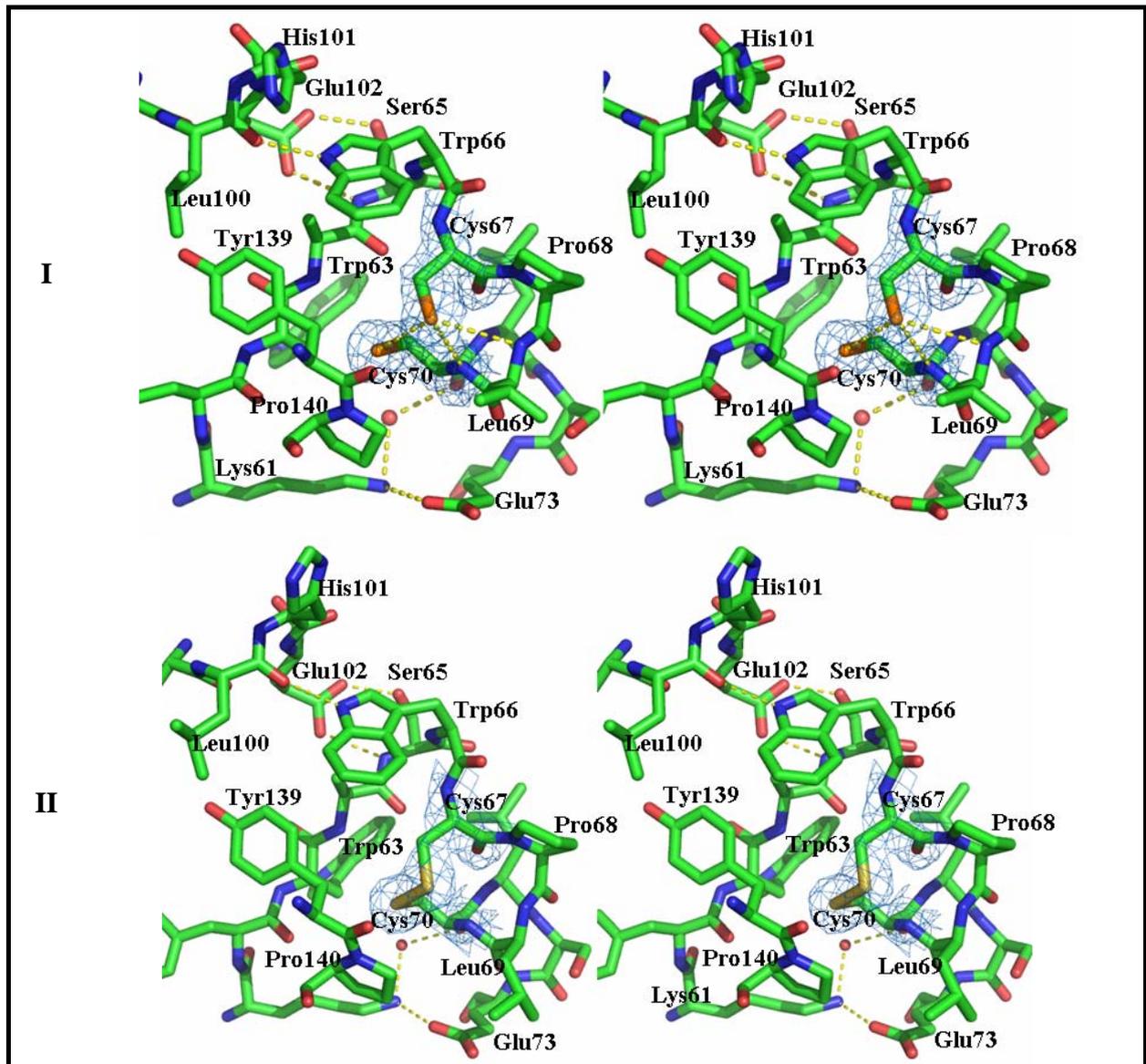


Figure 9 Représentations stéréo détaillant la conformation du fragment $_{67}\text{CPLC}_{70}$ et des résidus environnants du domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis*, pour la forme réduite (I) et la forme oxydée (II).
Les cartes de densité de type 3Fo-2Fc contourées à 1.5σ sont représentées dans la région des résidus cystéine.

Les résidus $_{99}\text{FLHE}_{102}$ appartenant à la boucle Ser96-Gly106 – mis en évidence plus haut comme constituant un élément structural caractéristique de $\text{Dom1}_{\text{PilB}}$ – forment un coude proche du site actif ; ce dernier est disposé de telle sorte que les chaînes latérales de Leu100, His101 et Glu102 sont spatialement proches de Ser65, Trp66 et Tyr139, lesquels sont dans le voisinage immédiat de Cys67. Ainsi, trois liaisons hydrogène sont observées entre ce fragment et ces résidus : entre l'oxygène de la chaîne principale de Leu100 et N ϵ de Trp66,

entre l'oxygène O ϵ 2 de Glu102 et l'oxygène O γ de Ser65 et entre O ϵ 1 de Glu102 et l'azote de la chaîne principale de Ser65 (Figure 10).

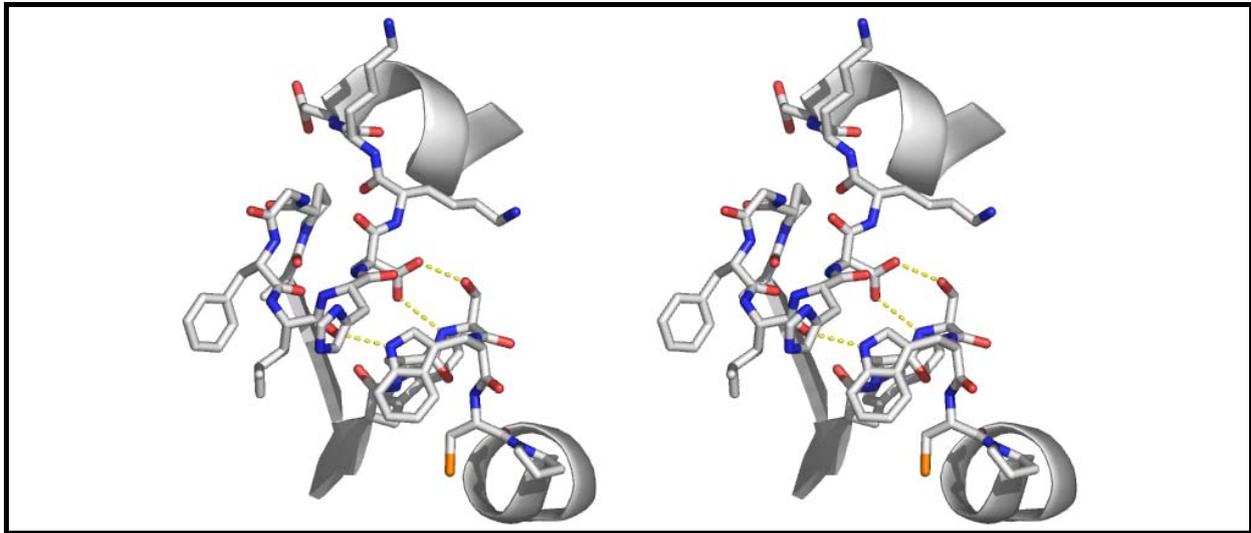


Figure 10 Boucle ${}_{99}\text{FLHE}_{102}$ de la structure de la forme réduite de $\text{Dom1}_{\text{PilB}}$ et interactions avec les résidus voisins du motif ${}_{67}\text{CPLC}_{70}$.

2. Discussion : Analyse fonctionnelle

2.1. La structure globale et ses voisins structuraux

L'architecture globale de $\text{Dom1}_{\text{PilB}}$ la classe parmi la très grande famille de protéines dénommées protéines de type Trx. Qi et Grishin proposent une classification structurale de cette famille de protéines en y englobant les protéines contenant le motif canonique (basé sur un feuillet β mixte central à quatre brins, décrit dans le paragraphe 1.3), et en intégrant aussi des variantes, en particulier des protéines présentant une permutation circulaire dans l'organisation des éléments de structures secondaires par rapport au motif de base (Qi et Grishin 2005). De ce point de vue, $\text{Dom1}_{\text{PilB}}$ et les Trx font partie de la même sous-famille.

Cependant, en regard de la formation et de la nature de ses éléments de structure secondaire additionnels par rapport au repliement canonique, et en cohérence avec sa localisation cellulaire (extra-cytoplasmique), $\text{Dom1}_{\text{PilB}}$ se distingue des Trx (cytoplasmiques) et se rapproche plus des CMP, une sous-classe de protéines périplasmiques proposée pour être

à mi-chemin dans l'évolution entre les peroxyrédoxines et leur ancêtre de type Trx (Copley *et al.* 2004). Les CMP conservent le motif CXXC faisant d'elles des disulfures oxydoréductases, mais à la différence des Trx qui sont des réducteurs cytoplasmiques généraux et ont une large gamme de protéines substrats, les CMP présentent souvent des sélectivités, voire des spécificités de substrat et leurs fonctions caractérisées les incluent dans des voies biochimiques uniques. Elles ont été ainsi dénommées par (Copley *et al.* 2004) car une grande partie de celles dont les fonctions ont été caractérisées sont impliquées dans des voies de maturation de cytochromes en tant que réducteurs spécifiques de ponts disulfures. Ainsi, concernant celles dont les structures ont été déterminées, la protéine ResA de *B. subtilis* (codes PDB 1SU9 et 1ST9) est impliquée dans la maturation du cytochrome c (Crow *et al.* 2004), les CcmG/DsbE de *B. japonicum* (code PDB : 1KNG) et d'*E. coli* (code PDB : 1ZY5) aussi, mais au sein d'une voie différente (Edeling *et al.* 2002 ; Stirnimann *et al.* 2005), et la TlpA de *B. japonicum* (code PDB : 1JFU) est impliquée dans la maturation du cytochrome aa3 (Capitani *et al.* 2001). La DsbE de *M. tuberculosis* (code PDB : 1LU4) constitue, semble-t-il, une exception au sein de ce groupe, puisqu'elle agit en tant qu'oxydant général en catalysant la formation de ponts disulfures dans le milieu extra-cytoplasmique. Aussi, de ce point de vue, l'activité enzymatique de Dom1_{PilB} vis-à-vis des domaines Msr de la protéine PilB accentue sa similarité avec les CMP, puisqu'il agit en tant que réducteur du pont disulfure formé lors du mécanisme des Msr, mais avec une certaine sélectivité, puisqu'il présente une meilleure efficacité vis-à-vis de la MsrB (Wu *et al.* 2005).

2.2. Le site actif et la réactivité des Cys67 et Cys70

L'étude biochimique de Dom1_{PilB} a donné lieu à une estimation de la valeur du pKa de Cys67 (la cystéine catalytique) inférieure à 6, et celle du pKa de Cys70 (la cystéine de régénération) voisine de 9.3 (Wu *et al.* 2005) (voir partie A paragraphe 3.6.2), ce qui est conforme à l'analyse de la structure de la forme réduite. En effet, la forme thiolate de Cys67 est stabilisée, certainement grâce au dipôle de l'hélice α 1 en N-terminal de laquelle ce résidu réside, mais aussi grâce à la liaison hydrogène étroite entre les deux S γ des deux cystéines du motif, et enfin grâce aux liaisons hydrogène avec les atomes d'azote des chaînes principales des résidus 69 et 70 ; ces observations sont cohérentes avec une diminution de la valeur du pKa, par rapport à celle de 8.8 du thiol en solution. A l'inverse, l'environnement hydrophobe

autour de S₇₀ favorise un état protoné, non chargé pour ce résidu, et donc en faveur d'une augmentation de la valeur du pKa.

Des études ont tenté de corréler la valeur du pKa des cystéines catalytiques des disulfures oxydo-réductases de type Trx avec les potentiels rédox des protéines considérées, l'hypothèse étant que plus la valeur du pKa de la cystéine catalytique est basse, plus le potentiel redox de la protéine est élevé. Les deux cas illustrant le mieux une telle corrélation sont ceux de la Trx1 (Mössner *et al.* 1998) et de la DsbA d'*E. coli* (Grauschopf *et al.* 1995 ; Huber-Wunderlich et Glockshuber 1998). La première est classée parmi les réducteurs, avec un potentiel redox de -0.270 V, et un pKa de la cystéine catalytique d'environ 7.1 ; la deuxième est une protéine périplasmique agissant en tant qu'oxydant général, avec un potentiel redox de -0.125 et un pKa d'environ 3.4. Parmi les CMP de structures connues, la DsbE de *M. tuberculosis* semble obéir à cette règle, puisqu'elle a un potentiel redox de -0.128 V – et agit en tant qu'oxydant – et un pKa de la cystéine catalytique de 5.0 (Goulding *et al.* 2004). De même, la CcmG/DsbE d'*E. coli* agit en tant que réducteur, avec un potentiel redox voisin de -0.2 V et un pKa de la cystéine catalytique de 6.8 (Li *et al.* 2001 ; Stirnimann *et al.* 2005), et semble donc aussi se conformer à l'hypothèse. En ce qui concerne la DsbE (Fabianek *et al.* 1997) et la TlpA (Loferer *et al.* 1995) de *B. japonicum*, les potentiels redox mesurés les classent parmi les réducteurs, mais malheureusement, aucune valeur de pKa n'est rapportée permettant de les discuter en regard de cette règle.

Dom1_{PilB} est clairement à positionner parmi les protéines réductrices, ayant un potentiel redox de -0.232 V (Wu *et al.* 2005). Or la valeur inférieure à 6 du pKa de Cys67 est en désaccord avec l'hypothèse énoncée ci-dessus. Il constitue ainsi un exemple révélant que la seule donnée du pKa de la cystéine catalytique ne suffit pas à prédire le comportement redox de la protéine. D'autres études vont également dans ce sens, révélant qu'une corrélation entre le pKa de la cystéine catalytique et le potentiel redox de la protéine disulfure oxydo-réductase n'est pas, en toute rigueur, établie (Chivers *et al.* 1997 ; Jacobi *et al.* 1997 ; Moutevelis et Warwick 2004). En conséquence, les déterminants structuraux à l'origine du potentiel redox des disulfures oxydo-réductases de type Trx semblent être relativement complexes et impliquent probablement les interactions entre les résidus du site actif et ceux qui l'avoisinent. Dans leur étude de la DsbE de *M. tuberculosis* – qui se trouve être une protéine oxydante contrairement aux DsbE des bactéries Gram-négatives – Goulding et collaborateurs proposent une implication d'une paire de résidus (Trp30 et Glu42 dont les chaînes latérales interagissent par liaison hydrogène) dans la stabilisation du site actif en une conformation où la forme réduite est favorisée. Un tel rôle de cette paire de résidus contribuerait au

comportement oxydant de la protéine, autrement dit à la valeur élevée du potentiel redox. Dans notre cas, aux positions équivalentes, une paire de résidus interagissant entre eux est également observée : Lys61 et Glu73 (voir paragraphe 1.4). Cependant en comparant les deux formes réduite et oxydée, aucune différence structurale pertinente n'est relevée concernant l'interaction entre ces deux résidus, ni concernant les résidus avoisinants. Suivant le principe sous-jacent au cas relaté de la DsbE de *M. tuberculosis*, Dom_{PilB} étant un réducteur, sa forme réduite devrait être déstabilisée par rapport à sa forme oxydée. Il est possible que la perte d'énergie apportée par la rupture de la liaison covalente entre les deux soufres soit suffisante dans le cas de Dom_{PilB} pour qu'il se comporte comme un réducteur. Cette hypothèse est également avancée dans le cas de la protéine ResA de *B. subtilis* (réductrice) mais les auteurs ont, en outre, reporté une perte de plusieurs autres interactions stabilisatrices lors du passage de la forme oxydée à la forme réduite (Crow *et al.* 2004).

2.3. Rôles probables des résidus ⁹⁹FLHE₁₀₂

Lors de la comparaison de Dom_{PilB} avec les CMP de structures connues et la Trx1, le fragment ⁹⁹FLHE₁₀₂ a été révélé comme étant un élément caractéristique additionnel, non observé chez les autres. Dans la mesure où ce fragment est proche du site actif, on peut imaginer qu'il joue un rôle dans les interactions entre Dom_{PilB} et ses partenaires (substrat ou partenaire de régénération), d'autant que les interactions entre monomères voisins au sein du cristal semblent impliquer His101, appartenant à ce segment. Aucune donnée structurale n'est disponible concernant une telle association avec un partenaire de Dom_{PilB}, mais une structure de CMP en complexe covalent avec un domaine de son partenaire de régénération a été résolue, qui pourrait être utilisée par comparaison pour essayer de déterminer les résidus impliqués dans l'interface entre Dom_{PilB} et l'un de ses partenaires. Il s'agit de la CcmG/DsbE d'*E. coli* liée par pont disulfure inter-moléculaire avec le domaine N-terminal de la DsbD, c'est-à-dire le domaine de cette protéine transmembranaire (liée à la membrane cytoplasmique) dédiée à l'échange de pont disulfure avec la CcmG/DsbE oxydée (Stirnemann *et al.* 2005). Malheureusement, une superposition entre Dom_{PilB} et la CcmG/DsbE révèle que l'encombrement stérique apporté par les résidus du fragment ⁹⁹FLHE₁₀₂ empêcherait une interaction similaire. En outre, les résidus de la CcmG/DsbE reportés comme étant importants dans l'interface d'association avec la DsbD ne sont pas conservés dans Dom_{PilB}. Or,

récemment, il a été montré *in vitro* que le domaine N-terminal de la DsbD est capable de catalyser la réduction de Dom1_{PilB} (expériences menées avec des protéines issues de *N. gonorrhoeae* (Brot *et al.* 2006)) ; il semble donc que la DsbD interagisse avec Dom1_{PilB} d'une manière différente qu'avec la CcmG/DsbE, à moins d'un changement conformationnel qui reste à être caractérisé, en particulier au sein du fragment ₉₉FLHE₁₀₂. Ceci est cohérent avec le rôle de la DsbD dans la cellule, où elle est utilisée pour transférer les électrons du cytoplasme (à partir de la thioredoxine) vers le périplasma (réduction de ponts disulfures de plusieurs protéines de type Trx, notamment) (Stirnemann *et al.* 2005). Cependant, le fait que PilB ait été localisé sur la membrane externe de *N. gonorrhoeae* (Skaar *et al.* 2002) semble indiquer qu'une interaction directe entre la DsbD et Dom1_{PilB} ne se déroule pas *in vivo*.

Comme Dom1_{PilB} et la Trx1 d'*E. coli* sont tous les deux capables de réduire les ponts disulfures des domaines Msr de la protéine PilB, on peut également observer l'association entre la Trx1 et un de ses partenaires, et tenter de mettre en évidence une possibilité d'interactions similaires avec Dom1_{PilB}. Une structure de complexe entre la Trx1 d'*E. coli* et son partenaire de régénération, la Trx réductase, est disponible dans la PDB (Lennon *et al.* 2000), mais aucune structure avec une protéine substrat n'a encore été déterminée. En revanche, la structure de la Trx humaine, très proche en séquence de celle-ci, a été résolue, complexée avec des fragments des protéines Nf-κB (Qin *et al.* 1995) et Ref-1 (Qin *et al.* 1996), des protéines substrats de la Trx. Il est à noter que tous ces complexes sont associés covalamment par un pont disulfure inter-moléculaire. En superposant Dom1_{PilB} avec ces structures de Trx, il est apparu qu'une cavité toujours observée dans la Trx au sein de laquelle vient se loger une chaîne latérale aromatique du partenaire est recouverte par le fragment ₉₉FLHE₁₀₂ ; une cavité formée par les portions en C-terminal des brins β2 et β3, celle en N-terminal du brin β4, et l'hélice α de connexion entre les brins β3 et β4. Cette cavité semble être un point d'ancrage pour un positionnement correct de la protéine partenaire. Plus généralement, elle semble importante dans les interfaces de contacts réalisés par la Trx, y compris pour des interventions autres que les processus d'oxydo-réduction, comme l'atteste par exemple la présence d'un résidu aliphatique de l'ADN polymérase du phage T7 occupant cette même cavité de la Trx1 d'*E. coli* dans la structure d'un complexe entre ces deux partenaires (Doublie *et al.* 1998). Ainsi, d'après ces observations, le mode d'interaction entre Dom1_{PilB} et l'un de ses partenaires diffère de celui de la Trx1 ; les interactions devraient s'établir au niveau de points d'ancrages différents, ou alors la boucle contenant le fragment ₉₉FLHE₁₀₂ subit un changement de conformation de nature à découvrir une poche hydrophobe

similaire à celle de la Trx1. Cette deuxième hypothèse semble peu probable, puisque (i) dans les deux formes réduite et oxydée de Dom1_{PilB}, la conformation de la boucle en question est similaire, le peu de différences étant certainement dû à l'empilement cristallin (voir paragraphe 1.4), (ii) la conformation de cette boucle est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogène, impliquant notamment Ser65 et Trp66, et enfin (iii) des résultats biochimiques récents indiquent que la délétion de cette boucle dans l'enzyme de *N. meningitidis* n'affecte pas ses propriétés catalytiques (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). Néanmoins, le fait d'observer la même insertion dans la protéine PilB de *F. nucleatum* conduit à supposer un rôle fonctionnel de ce fragment. Il est possible que ce soit un élément important dans la reconnaissance avec le partenaire de régénération naturel.

SECTION III

Le domaine MsrA de PilB

1. Description de la structure de la MsrA de PilB

1.1. Bilan des résultats expérimentaux

Quatre structures cristallographiques du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis* ont été déterminées. Ce sont quatre formes représentatives de l'état de la protéine à différents stades du cycle catalytique : la forme réduite, un complexe de type michaelien entre le mutant C51S et un acide aminé méthionine sulfoxyde aux extrémités N- et C-terminales protégées sous forme de liaisons amides, un mutant C198S dans lequel la cystéine catalytique Cys51 est sous forme acide sulfénique, et l'enzyme sauvage oxydée présentant un pont disulfure intramoléculaire Cys51-Cys198.

Ces travaux font l'objet d'une publication dont le manuscrit, présenté en Annexe 2, vient d'être soumis à *Journal of Molecular Biology*.

Le domaine MsrA étudié ici comprend 193 résidus, correspondant à la séquence de la protéine PilB allant du résidu Asn196 au résidu Thr388 (voir Partie B, Section I, paragraphe 1.1) ; il y est référé en tant que MsrA de *N. meningitidis*. Afin de simplifier les comparaisons entre les MsrA de différentes sources, une numérotation unique a été adoptée, utilisant l'enzyme d'*E. coli* pour référence (voir partie B, section I, paragraphe 1.1).

Les quatre structures discutées dans cette étude ont toutes été obtenues à partir de cristaux orthorhombiques ayant approximativement les mêmes paramètres de maille (avec cependant des variations de 10% environ sur le paramètre *b*) et ayant tous le même groupe d'espace $P2_12_12_1$, bien que des conditions de cristallisation différentes aient été utilisées pour leur obtention. Un unique monomère est présent dans l'unité asymétrique. Les quatre structures ont été résolues par la méthode du remplacement moléculaire, la première à partir de la structure de la MsrA de *M. tuberculosis* ((Taylor *et al.* 2003), code PDB 1NWA), les trois autres à partir de ce modèle initial de la MsrA de *N. meningitidis*.

L'enzyme sauvage a cristallisé spontanément sous sa forme réduite (notée par la suite MsrA_{red}). La structure a été affinée jusqu'à une résolution de 2.0 Å, avec un facteur R de 17.3 % et un facteur R_{free} de 19.2 %. Le modèle comporte 169 résidus (de Asn41 à Thr213), complétés par un résidu Met N-terminal résultant de la production de la protéine.

La structure du complexe avec le substrat (notée MsrA_{MetSO}) a été obtenue en cocristallisant le mutant C51S avec le substrat Ac-Met-*R,S*-SO-NHMe, c'est-à-dire avec un mélange équimolaire des deux stéréoisomères *R*- et *S*-sulfoxyde. Affiné jusqu'à 2.24 Å de résolution avec un facteur R de 18.8 % et un facteur R_{free} de 19.6 %, le modèle a été reconstruit jusqu'au résidu Gly211.

La préparation de la forme comportant un acide sulfénique sur Cys51 (notée MsrA_{CysOH}) a été réalisée en injectant du DMSO dans les gouttes à l'huile qui avaient vu apparaître les cristaux natifs. Ce substrat a été utilisé en raison de sa petite taille afin d'éviter que les cristaux ne craquent. La structure est affinée jusqu'à une résolution de 2 Å (R = 19.3 %; R_{free} = 23.5 %) ; la chaîne polypeptidique n'a pu être construite au-delà du résidu Pro210.

La forme oxydée en pont disulfure (notée MsrA_{ox}) a été préparée en amont des essais de cristallisation, par oxydation de la forme réduite avec de la MetSO, et en l'absence de tout réducteur. Dans ce dernier modèle, affiné à 1.95 Å de résolution (R = 19.2 % et R_{free} = 21.9 %), la chaîne polypeptidique s'arrête là encore au résidu Pro210.

Des quatre structures présentées ci-dessus, les structures de MsrA_{red} et de MsrA_{ox} avaient été résolues par Brice Kauffmann dans le cadre de ses travaux de thèse, (Kauffmann, 2003) (voir section II paragraphe 3.1). J'ai ainsi repris et poursuivi ces travaux, en particulier en ce qui concerne l'affinement du modèle de la forme oxydée contre les données cristallographiques, et je les ai complétés avec les deux autres modèles.

La densité électronique est systématiquement moins claire que dans le reste de la structure autour de la séquence ¹⁹⁴PNGYCH₁₉₉ qui inclut notamment la cystéine de recyclage Cys198 – mutée en sérine dans la MsrA_{CysOH}. Cette observation est corrélée à des facteurs d'agitation thermique des atomes de cette région en moyenne plus élevés d'environ 1.5 σ par rapport à la moyenne calculée sur l'ensemble des atomes protéiques. La meilleure définition de ce segment est observée dans la structure de la MsrA_{MetSO}, en particulier pour le résidu Tyr197 (voir paragraphe 1.3), tandis qu'elle est au contraire très pauvre pour la structure de la MsrA_{ox}, en particulier au niveau de Tyr197, à nouveau, et au niveau de la chaîne principale de Cys198 (voir paragraphe 1.5).

1.2. La forme réduite de la MsrA de PilB

1.2.1. La structure globale

Le repliement global de la MsrA_{red} (Figure 1) est très semblable à celui observé dans les autres modèles de MsrA. En effet, les atome C α se superposent avec des r.m.s.d. tout au plus de 0.94 Å (pour 153 atomes) pour le modèle de la MsrA de boeuf (Lowther *et al.* 2000). Ce repliement répond ainsi à la description effectuée pour l'enzyme d'*E. coli* appelée dans la partie introductive de ce manuscrit ((partie A, paragraphe 3.4.1. (Tete-Favier *et al.* 2000)). Cependant, le long fragment N-terminal observé dans la MsrA d'*E. coli* ne se retrouve pas ici, de par la construction génétique utilisée pour produire le domaine isolé de la protéine PilB, qui commence au résidu suivant Met195. La chaîne polypeptidique commence directement par former le brin β 1. Les résidus en amont dans la séquence de PilB sont considérés faisant partie du fragment connectant la MsrA à Dom1_{PilB}. Par ailleurs, cette borne correspond au site de réinitiation interne donnant lieu à une forme alternative de PilB uniquement à deux domaines MsrA-MsrB (partie A paragraphe 3.6.1). De ce point de vue, l'enzyme de *N. meningitidis* est comparable à celui de *M. tuberculosis* (partie A paragraphe 3.4.3.), qui ne contient pas non plus ce fragment N-terminal. L'examen des différentes séquences de MsrA indique que cette absence d'un fragment N-terminal peu structuré est une caractéristique des MsrA de la sous-classe 2.

Au niveau de l'extrémité C-terminale, très peu structurée, le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de Tyr197 est observé en liaison hydrogène avec l'atome O δ 1 du résidu Asp129, situé dans la boucle reliant les brins β 3' et β 3" additionnels au feuillet β constituant l'ossature du repliement. Comme dans toutes les structures de MsrA précédemment résolues, la chaîne latérale de Asp129 est aussi liée, par le biais d'une molécule d'eau, à l'azote de la chaîne principale de Cys51. La paire de résidus Asp129-Tyr197 constitue l'entrée du site actif.

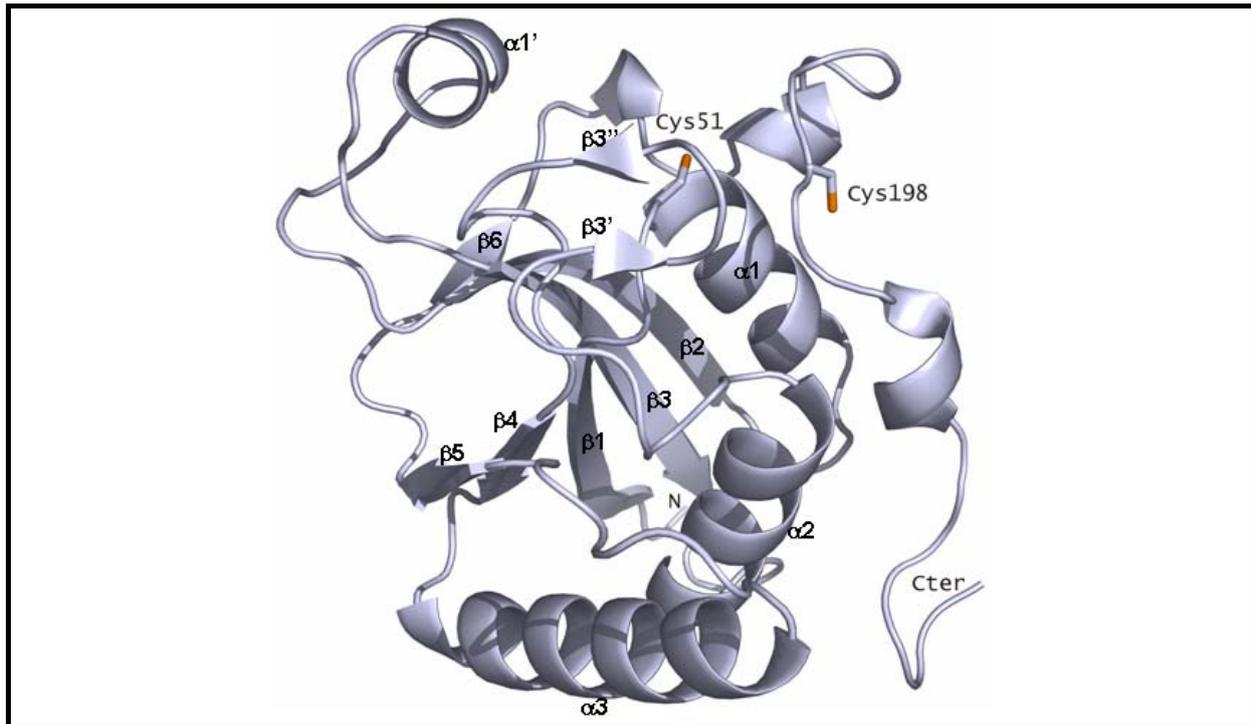


Figure 1

Représentation en mode flèches et rubans du repliement de la MsrA de *N. meningitidis*.

Les hélices α et les brins β sont numérotés comme dans la structure de la MsrA d'*E. coli* ((Tete-Favier *et al.* 2000)(voir partie A, paragraphe 3.4.1.)). Les chaînes latérales des résidus Cys51 et Cys198 sont représentés en mode bâtons.

1.2.2. Le site actif

Les résidus du site actif observés dans la structure de la MsrA_{red} sont positionnés d'une manière tout à fait similaire à celle observée dans les structures cristallographiques des enzymes d'*E. coli* (Tete-Favier *et al.* 2000), du bœuf (Lowther *et al.* 2000), de *M. tuberculosis* (Taylor *et al.* 2003) et du peuplier (Rouhier *et al.* 2007). De fait, il apparaît donc une petite différence avec la structure RMN de l'enzyme d'*E. coli* dans laquelle Glu94 et Cys51 ont été observés dans une orientation un peu inhabituelle (Coudevylle *et al.* 2007) (voir partie A paragraphe 3.4.). Cependant, notons que dans la structure de la MsrA_{red} de *N. meningitidis*, une boursouffle légère de la densité électronique autour de Cys51 pourrait correspondre à la présence d'une faible proportion du rotamère observé par RMN chez *E. coli*. Seule la conformation majeure observée dans la structure cristallographique a été modélisée ici.

Les résidus Phe52 et Trp53 forment une poche hydrophobe constituant un pan de la cavité du site actif, pendant que les chaînes latérales de Tyr82, Glu94 et Tyr134 constituent une région hydrophile du côté opposé, par rapport à la position de Cys51 (Figure 2). A la surface du site actif, l'orientation de Tyr197 vers Asp129 s'accompagne d'une orientation de la

chaîne latérale de Cys198 dos au site actif. En conséquence, la distance entre les atomes de soufre de Cys51 et Cys198 est de 8 Å.

Le site actif contient plusieurs molécules d'eau. En particulier, celle notée w1, observée dans les quatre autres structures cristallographiques de MsrA, interagit par liaisons hydrogène avec les chaînes latérales de Tyr82 (2.6 Å), Glu94 (2.7 Å) et Tyr134 (2.7 Å) (Figure 2). Elle a été proposée refléter la façon dont l'atome d'oxygène de la fonction sulfoxyde du substrat pourrait être stabilisée (Taylor *et al.* 2003). Une seconde molécule d'eau w2, située à 2.9 Å de w1, se trouve à 3.5 Å de l'atome de soufre S γ de Cys51. Elle n'a pas d'équivalent dans les structures de MsrA précédemment résolues. En effet, toutes ces structures voient leur site actif occupé par une espèce exogène empêchant la présence d'une molécule d'eau similaire.

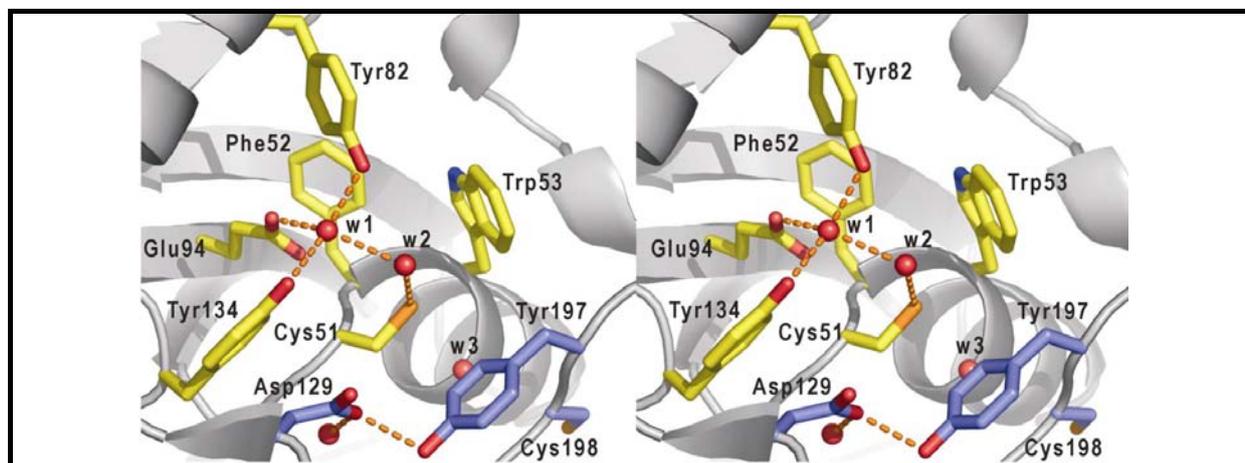


Figure 2 Représentation stéréo du site actif du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis* sous forme réduite. Les résidus formant les parois du site actif sont en jaune, tandis que la paire de résidus Asp129-Tyr197, située à l'entrée du site, est en bleu.

1.3. Le complexe MsrA-substrat

La structure globale de la MsrA réduite est conservée dans le complexe avec le substrat. De plus, les chaînes latérales des résidus du site actif gardent des positions similaires, y compris dans la région de la sérine 51 qui remplace ici la cystéine catalytique.

La densité électronique du substrat est clairement définie au niveau de sa chaîne latérale (Figure 3). En revanche, elle est beaucoup plus ténue au niveau de la chaîne principale. Cette observation met en lumière l'aptitude du site actif à stabiliser fortement l'extrémité de la chaîne latérale du substrat. En accord avec la stéréospécificité des MsrA, la configuration observée pour l'atome de soufre correspond sans conteste à l'isomère Ac-Met-S-

SO-NHMe, bien que le mélange Ac-Met-S,R-SO-NHMe ait été utilisé pour cette expérience. Le groupement méthyle C ϵ du substrat pointe vers la poche hydrophobe formée par Trp53 et Phe52. Le groupement méthylène C γ se substitue à w2 observée dans la structure de la forme réduite (voir paragraphe précédent). Ces deux groupements sont en contact avec le noyau indole de Trp53. L'oxygène de la fonction sulfoxyde remplace la molécule d'eau w1 observée dans la structure de MsrA_{red}. En conséquence, elle interagit par liaisons hydrogène avec Tyr82, Tyr134 et Glu94, de la même façon que le faisait w1. Il s'ensuit une distance courte de 2.7 Å entre l'oxygène du sulfoxyde et l'atome O ϵ 2 de Glu94, ce qui implique nécessairement la présence d'une forme protonée de l'un ou l'autre de ces deux atomes d'oxygène afin d'établir cette liaison hydrogène. La stabilisation de la fonction sulfoxyde par la poche hydrophobe formée par Trp53 et Phe52 d'une part, et la zone hydrophile constituée par Tyr82, Glu94 et Tyr134 d'autre part, place l'atome de soufre du substrat à 3.4 Å de l'atome O γ de Ser51.

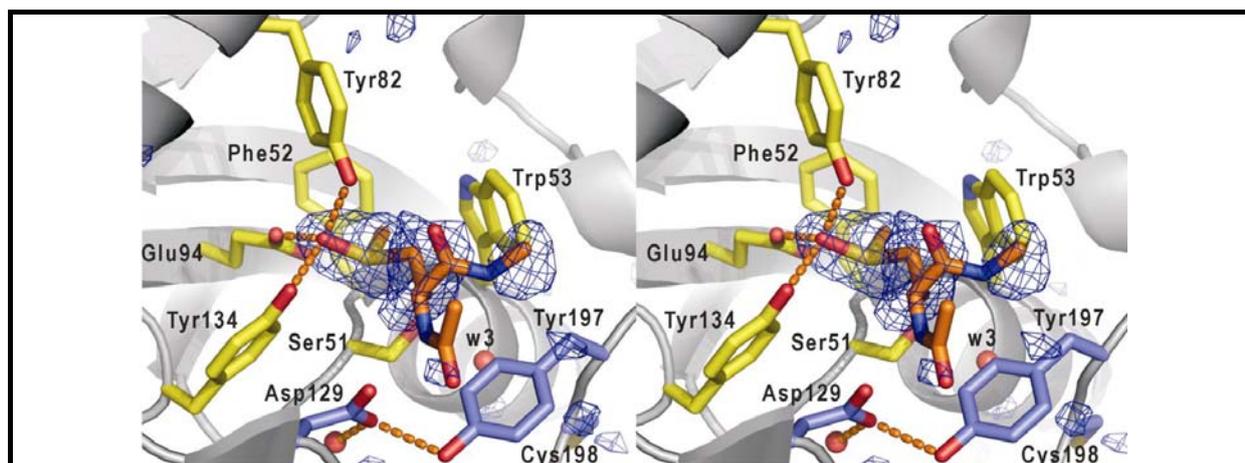


Figure 3 Représentation stéréo du site actif du mutant C51S du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis* en complexe avec le substrat Ac-Met-S-SO-NHMe.

Les résidus formant les parois du site actif sont en jaune, tandis que la paire de résidus Asp129-Tyr197, située à l'entrée du site, est en bleu. La densité électronique de type "omit Fo-Fc", calculée sur la structure affinée par recuit simulé en l'absence de substrat, est représentée contournée à 3.0 σ .

Contrairement à la chaîne latérale du substrat Ac-Met-S-SO-NHMe, la chaîne principale n'est impliquée dans aucune interaction stabilisatrice marquée. Cependant, si la densité électronique de cette zone est peu définie, celle du résidu proche Tyr197 (en interaction avec Asp129) est, par comparaison, beaucoup plus claire que dans le cas de la forme réduite, marquant probablement l'intervention de cette chaîne latérale dans l'interaction avec le substrat. La chaîne latérale du résidu voisin Cys198 conserve la position observée dans la forme réduite.

1.4. L'intermédiaire réactionnel acide sulfénique de la MsrA

Dans la structure de la forme $\text{MsrA}_{\text{CysOH}}$, l'observation d'une excroissance de la densité électronique au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale de Cys51 s'interprète aisément en positionnant le groupement hydroxyle de la forme acide sulfénique, de sorte que sa présence et sa conformation ne font aucun doute (Figure 4). Ainsi, dans ce cas, l'expérience de cristallographie semble avoir permis de surmonter les divers problèmes rencontrés en solution pour caractériser la structure de l'acide sulfénique par RMN, par exemple. En effet, ce groupement chimique est instable : des réactions ultérieures peuvent avoir lieu, soit avec le groupement thiol d'autres résidus cystéine et donner un pont disulfure, soit avec un autre acide sulfénique et donner un thiosulfinate ($-\text{S}-\text{S}(=\text{O})-$). Cela se traduit par l'observation de dimères, en solution (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). C'est ainsi qu'une stratégie de diffusion du DMSO dans les cristaux a été envisagée pour oxyder Cys51 au lieu d'une expérience de co-cristallisation (voir partie B, paragraphe 3.3.1.) : l'empilement cristallin devait empêcher les différentes cystéines de réagir entre elles. En outre, en présence d'oxygène notamment, l'acide sulfénique peut évoluer vers des états d'oxydation supplémentaires, en acide sulfinique ($-\text{SO}_2\text{H}$) ou sulfonique ($-\text{SO}_3\text{H}$). La technique de cristallisation en gouttes à l'huile a manifestement aidé à préserver l'acide sulfénique, puisque l'huile de paraffine séparait les gouttes de l'air ambiant. En effet, aucune des cartes de densité calculées lors de l'affinement n'a révélé de sur-oxydation, qui se serait manifestée par d'autres renflements que celui interprété par l'oxygène de la fonction acide sulfénique.

Dans cette structure encore, aucun changement n'est observé quant à la conformation. De même, aucun déplacement de chaîne latérale des résidus du site actif n'apparaît nécessaire pour accommoder la présence de l'acide sulfénique. En particulier, aucun changement d'orientation n'est observé pour la chaîne latérale de Cys51 (Figure 4). L'oxygène $\text{O}\delta$ de la forme acide sulfénique de Cys51 est alors situé à 3.4 Å de l'oxygène $\text{O}\epsilon 1$ de Glu94 et à 2.7 Å de la molécule d'eau $w2$, observée comme dans la structure de la MsrA_{red} (le substrat n'étant plus présent). De même, $w1$ retrouve les interactions qu'il réalisait dans cette structure (voir paragraphe 1.2.2). La chaîne latérale de Ser198 (substituant ici Cys198) conserve la position et l'orientation prise par Cys198 dans les structures de MsrA_{red} et $\text{MsrA}_{\text{MetSO}}$ décrites précédemment, de sorte que la distance entre le soufre $\text{S}\gamma$ de Cys51 et l'oxygène $\text{O}\gamma$ de Ser198

est de 7.5 Å. Notons enfin que Tyr197 et Asp129 conservent leur position, et ils forment ici aussi une liaison hydrogène.

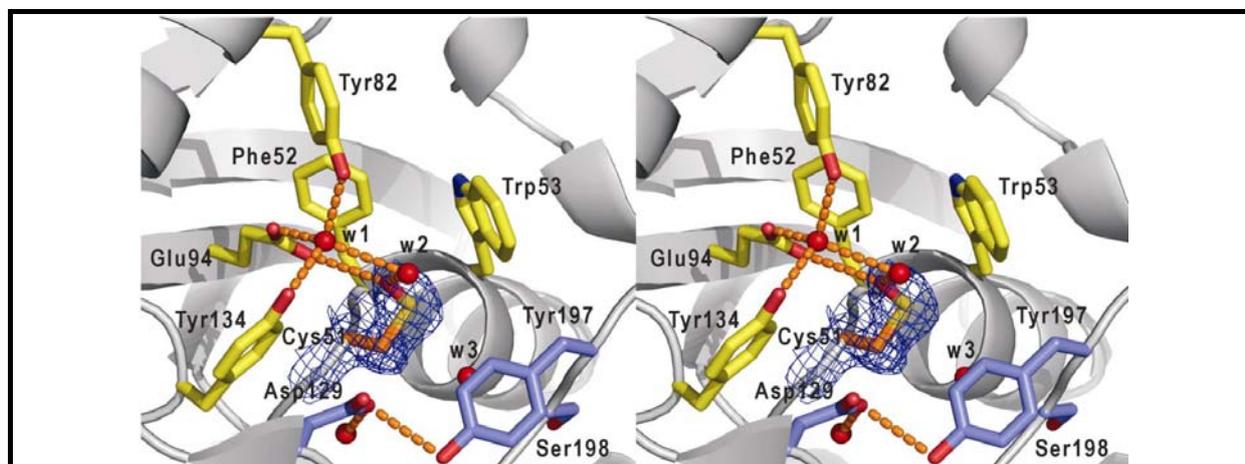


Figure 4 Représentation stéréo du site actif du mutant C198S du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis*, dans laquelle Cys51 est sous forme acide sulfénique. Les résidus formant les parois du site actif sont en jaune, tandis que la paire de résidus Asp129-Tyr197, située à l'entrée du site, est en bleu. La densité électronique de type 3Fo-2Fc est représentée contournée à 1.2 σ .

1.5. La forme oxydée de la MsrA

1.5.1. La structure globale

Les structures des formes MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH} révèlent toutes une distance entre les atomes de soufre de Cys51 et Cys198 incompatible avec la formation du pont disulfure nécessaire au recyclage de l'enzyme (voir partie A, paragraphe 3.2). Aussi, comme attendu, un changement de conformation est observé dans la structure de MsrA_{ox} (Figure 5).

En premier lieu, le mouvement affecte l'extrémité C-terminale du segment ₁₉₄PNGYCH₁₉₉, dont la définition par les cartes de densité électronique devient très pauvre, malgré la présence du pont disulfure qui constitue un point d'ancrage pour Cys198. Tyr197 paraît très désordonné, à tel point qu'aucune densité électronique n'est observée pour sa chaîne latérale, et son interaction avec Asp129 est perdue.

Mais surtout, un mouvement global restructure complètement la région Thr121-Thr132, contenant les deux petits brins $\beta 3'$ et $\beta 3''$ dans les structures précédentes, qui adopte une conformation tout à fait nouvelle. Asp129 est ainsi déplacé de plus de 10 Å par rapport à

sa position initiale commune aux structures de MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH} (Figure 5). Le carbone C α du résidu 128, qui subit le plus gros déplacement, est observé à 13.5 Å de sa position initiale. Ce mouvement semble majoritairement lié à des rotations au niveau des chaînes principales des résidus Thr121 et Thr132 qui agissent comme deux charnières : ψ_{121} est modifié de 180 ° et ψ_{132} de 177 °. Ces rotations amples semblent "ouvrir" la boucle Thr121-Thr132 qui s'éloigne alors du site actif. La nouvelle conformation de ce segment, bien que stabilisée par plusieurs interactions (soit directes, soit par le biais de molécules d'eau) avec le cœur de la structure, montre une densité électronique un peu plus faible que dans la conformation "fermée" des formes MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH}, ce qui se traduit également par des facteurs d'agitation thermique en moyenne légèrement plus élevés. Précisons également que la zone Thr121-Thr132 n'est pas impliquée dans des contacts avec les monomères voisins au sein des cristaux, et ce dans aucune des deux conformations.

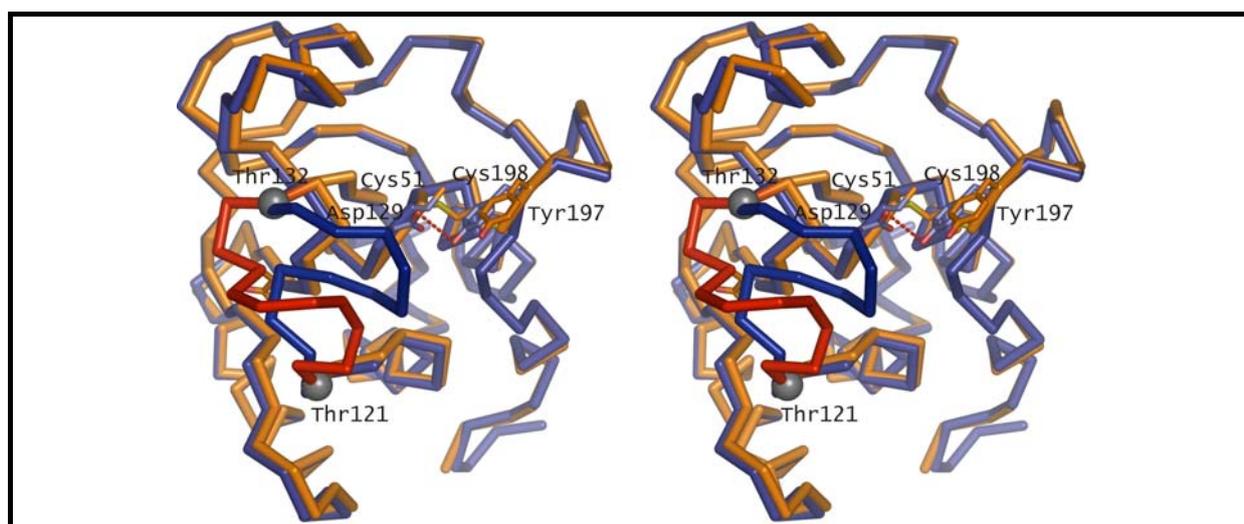


Figure 5 Représentation stéréo des traces C α superposées de la forme réduite et de la forme oxydée du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis*. La forme réduite est en bleu clair/foncé, la forme oxydée en rouge/orangé. Les résidus Cys51, Asp129, Tyr197 et Cys198 sont représentés en mode bâtons. Les atomes C α des résidus jouant le rôle de rotule dans le mouvement du segment 121-132 sont représentés par des sphères grises.

1.5.2. Le site actif

Comparé à ce qui est observé dans les structures des formes MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH}, la chaîne latérale de Cys51 subit ici une réorientation *via* une rotation autour de la liaison C α -C β dont l'angle χ_1 est modifié de 90°, à laquelle s'ajoute une translation générale de la chaîne principale de Cys51 d'environ 0.6 Å. Il s'ensuit un déplacement de l'atome S γ de

Cys51 de 2.6 Å vers l'entrée du site actif. De légers mouvements des résidus avoisinants sont également observés. Le plus ample d'entre eux concerne Gln133 (dont l'atome C δ se déplace de 1.1 Å) et son voisin Tyr134. Leurs chaînes principales sont légèrement déplacées, probablement suite au changement conformationnel observé sur le segment Thr121-Thr132. Ces mouvements accompagnent un déplacement similaire de 1.1 Å de la molécule w1 liée à Tyr82, Tyr134 et Glu94. Une molécule d'eau additionnelle absente des trois structures précédentes, w4, est observée à 2.9 Å de l'atome O ϵ_2 de Glu94, et à 2.9 Å de w1.

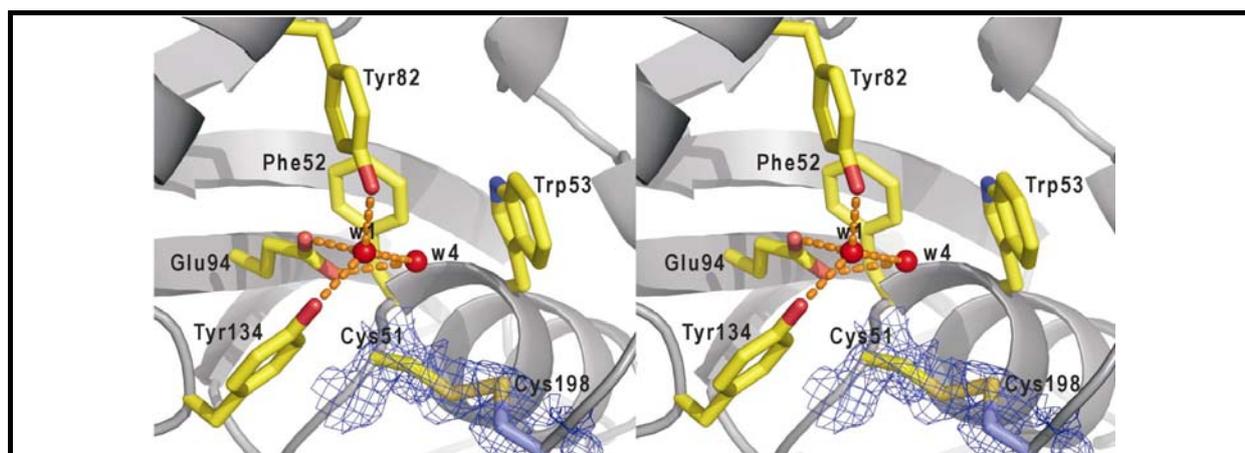


Figure 6 Représentation stéréo du site actif du domaine MsrA de la protéine PilB de *N. meningitidis* sous forme oxydée. Les résidus formant les parois du site actif sont en jaune, tandis que la paire de résidus Asp129-Tyr197, située à l'entrée du site, est en bleu. La densité électronique de type 3Fo-Fc est représentée contournée à 1.2 σ .

Le pont disulfure formé entre Cys51 et Cys198 s'étend contre l'extrémité N-terminale de l'hélice α_1 , c'est-à-dire qu'elle établit des contacts de van der Waals avec les atomes de la chaîne principale des résidus Trp53 et Gly54 inclus dans le segment $_{50}\text{GCFWG}_{54}$. Ce dernier est situé dans la boucle précédent l'hélice α_1 et est conservé chez les MsrA (voir partie A, paragraphe 3.3.1). L'atome S γ de Cys198 prend la position occupée par w3 dans les structures de MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH}. La faible densité électronique observée au niveau de l'atome C β de Cys198 et le manque de densité au niveau de la chaîne principale de ce résidu ainsi que des suivants semble indiquer l'existence de plusieurs conformations du pont disulfure. Il n'est pas impossible également que cette observation soit le fait d'un dommage par les rayons X. De ce fait, les résidus 199-201 n'ont pu être introduits dans le modèle final. Dans ce contexte, l'accessibilité des atomes S γ de Cys51 et Cys198 au solvant et par conséquent à la Trx pour la dernière étape de régénération de l'enzyme semble difficile à évaluer.

2. Discussion

2.1. Le mécanisme catalytique

Les quatre structures résolues dans le cadre de cette étude de la MsrA de *N. meningitidis* correspondent à quatre formes intermédiaires du cycle catalytique de cet enzyme, puisque sont disponibles les structures de :

- la forme MsrA_{red} pour laquelle le site actif est observé vide de toute espèce à part des molécules d'eau stabilisées; elle peut ainsi être interprétée comme représentant effectivement l'état de l'enzyme au début de l'acte catalytique, contrairement à toutes les autres structures cristallographiques dont le site actif est occupé par une espèce exogène ;

- la forme MsrA_{MetSO} correspondant au mutant C51S, dans le site actif duquel est observé un substrat réel ; cette structure peut donc être vue comme un mime d'un complexe de type michaelien, plus adapté que ne le sont les structures précédemment résolues;

- la forme MsrA_{CysOH}, obtenue pour le mutant C198S de la MsrA, première structure représentant l'intermédiaire acide sulfénique du mécanisme des Msr ;

- la forme MsrA_{ox} comportant le pont disulfure entre la cystéine catalytique Cys51 et la cystéine de recyclage Cys198, représentant ainsi l'enzyme prêt à interagir avec son partenaire de recyclage Trx.

Ces différentes structures peuvent ainsi être analysées en regard du mécanisme catalytique (voir partie A paragraphe 3.2.), et discutées en complément des données structurales et enzymologiques acquises auparavant concernant les MsrA en général et l'enzyme de *N. meningitidis* en particulier (décrites dans la partie A, paragraphes 3.4 et 3.6.3).

2.1.1. La fixation du substrat

La comparaison des structures des formes MsrA_{red} et MsrA_{MetSO} montre qu'aucun changement conformationnel n'est nécessaire à la fixation du substrat. La conformation du site actif de la MsrA_{red} est donc optimisée pour lier efficacement le substrat. Cette observation constitue ainsi une confirmation des hypothèses faites auparavant à partir des structures cristallographiques d'autres MsrA. Néanmoins, les résidus constituant le site actif d'une forme

libre de la MsrA semblent être sujets à une malléabilité intrinsèque, puisque l'étude par RMN de la forme réduite de l'enzyme d'*E. coli* a révélé des différences dans la conformation de Cys51, Glu94 et Tyr197, et Cys198 notamment, par rapport aux structures cristallographiques (Coudeville *et al.* 2007).

Ainsi, deux régions distinctes du site actif sont à considérer pour la description des interactions avec la chaîne latérale du substrat : d'une part, le groupement méthyle C ϵ et le groupement méthylène C γ de la chaîne latérale de la MetSO s'adaptent dans une poche hydrophobe formée par les résidus Phe52 et Trp53 ; d'autre part, les résidus Tyr82, Glu94 et Tyr134 interagissent par liaisons hydrogène avec l'oxygène de la fonction sulfoxyde. Cette situation reflète la stabilisation d'une forme polarisée de la fonction sulfoxyde du substrat, telle qu'Antoine et collaborateurs l'ont récemment proposée (voir paragraphe suivant) (Antoine *et al.* 2006).

Par ailleurs, la densité électronique faible observée au niveau de la chaîne principale du substrat Ac-Met-S-SO-NHMe correspond à un désordre apparent de cette partie de la molécule. Cette observation diffère de l'interaction observée dans le cas de la MsrA de *M. tuberculosis* (Taylor *et al.* 2003). En effet, cette structure voit de façon fortuite un contact cristallin placer un résidu méthionine d'un monomère voisin dans le site actif, de sorte que les résidus Asp129 et Tyr197 participent à sa stabilisation. Il a ainsi été proposé que la liaison hydrogène formée par Asp129 avec la chaîne principale du résidu MetSO d'une part, et l'empilement de type π - π du cycle aromatique de Tyr197 et de la liaison peptidique du résidu MetSO avec le résidu précédent, miment les interactions entre une MsrA et la chaîne principale du substrat. Dans la structure de la MsrA_{MetSO}, ce type d'interaction ne peut être clairement identifié ; tout au plus peut-on observer un renforcement de la densité électronique autour du cycle aromatique de Tyr197 par rapport à la structure de la MsrA_{red}, indiquant l'implication éventuelle de ce résidu dans la stabilisation du substrat. Ces résultats ne permettent pas d'expliquer pourquoi l'enzyme présente une meilleure affinité avec un résidu MetSO incorporé dans une protéine plutôt qu'avec l'acide aminé libre (Olry *et al.* 2002). Par ailleurs, Asp129 et Tyr197 ne semblent pas intervenir dans une reconnaissance spécifique des liaisons amides de la chaîne principale, si l'on se réfère aux études enzymologiques utilisant des mutants de substitution de ces deux résidus : les effets des mutations sur les paramètres d'affinité sont similaires, que l'on utilise le substrat Ac-MetSO-NHMe ou MetSO (Gand *et al.* 2007).

2.1.2. Le déroulement de l'étape réductase

Suite à la fixation du substrat, la cystéine catalytique Cys51 attaque le soufre de la fonction sulfoxyde du substrat pour conduire vraisemblablement à un état de transition de type sulfurane de géométrie bipyramide trigonale (Balta *et al.* 2006) ; le réarrangement de ce dernier permet le relargage du produit et la formation de l'acide sulfénique sur Cys51. Cette attaque nucléophile implique nécessairement une activation préalable de Cys51. En effet, dans la forme MsrA_{red}, le pKa de Cys51 est de 9.5, révélant que le dipôle de l'hélice $\alpha 1$ ne contribue pas, dans ce cas, à une stabilisation de la forme thiolate (Antoine *et al.* 2006). En outre, la structure ne montre aucune chaîne latérale chargée positivement à proximité de Cys51, ce qui contribue à expliquer la valeur relativement élevée de ce pKa.

Or, Cys51 voit son pKa chuter à 5.7 lors du déroulement de l'étape réductase. Il a donc été proposé que l'activation de Cys51 soit probablement liée à un mécanisme assisté par le substrat. Ce mécanisme met certainement à contribution la charge partiellement positive de l'atome de soufre dans la fonction sulfoxyde ; charge amplifiée par l'interaction de l'oxygène avec les résidus Tyr134, Tyr82 et Glu94. Dans la structure de la forme MsrA_{MetSO}, le positionnement du substrat dispose, en effet, l'atome de soufre dans une situation où sa charge positive est en mesure de stabiliser la forme thiolate de Cys51. Des liaisons hydrogène entre l'oxygène du sulfoxyde et les trois résidus Tyr134, Tyr82 et Glu94 sont effectivement observées. En outre, la présence de la dernière des trois (avec une distance de 2.7 Å) semble indiquer que la fonction sulfoxyde est protonée dans cette interaction. En effet, une protonation possible de Glu94 n'a pas été détectée dans les expériences d'enzymologie. Cette interaction permet d'envisager que, dans la forme sauvage de l'enzyme, le proton de Cys51 soit transféré à l'oxygène du groupement sulfoxyde de façon concomitante à la fixation du substrat, via une intervention directe ou non de Glu94, puisqu'il est manifeste que ce dernier intervient dans l'activation de Cys51 (Antoine *et al.* 2006). Cependant, dans la structure observée pour MsrA_{MetSO} dans laquelle le mutant Cys51Ser a été utilisé, l'hydrogène impliqué dans l'interaction entre le sulfoxyde et Glu94 ne peut provenir de Ser51, le pKa de ce type d'acide aminé n'étant probablement pas adapté au transfert d'un proton.

Le positionnement du soufre du substrat est contraint par les nombreuses interactions que forment les résidus du site actif avec ses substituants. Ainsi, la poche hydrophobe formée par Phe52 et Trp53 fixe C ϵ , avec également une interaction entre la chaîne latérale de Trp53 et le groupement méthylène C γ ; Tyr82, Glu94 et Tyr134 interagissent avec l'oxygène du

sulfoxyde, en stabilisant la forme hautement polarisée de ce groupement chimique. Ces interactions devraient ainsi favoriser l'attaque nucléophile de cet atome de soufre par la cystéine catalytique Cys51 activée. Une modélisation par simple substitution de Ser51 en Cys sans changement des angles dièdres du résidu permet d'observer l'atome S_{γ} s'alignant avec les atomes de soufre et d'oxygène du groupement sulfoxyde pour former un axe dans lequel le soufre du sulfoxyde se positionnerait entre l'atome nucléophile S_{γ} de Cys51 et l'oxygène nucleofuge du substrat (Figure 7). Suite à l'attaque par Cys51, un état de transition de type sulfurane se formerait. Une telle réactivité covalente de Cys51 est révélée par l'adduit diméthyl-arsenate observé dans la structure de la MsrA d'*E. coli* (Tete-Favier *et al.* 2000), la molécule de DTT liée à la forme sélénométhionine de la MsrA de boeuf (Lowther *et al.* 2000) et le β -mercaptoéthanol observé dans la MsrA de peuplier (Rouhier *et al.* 2007) (voir partie A paragraphe 3.4) ; ces structures sont alors jugées mimétiques de l'état de transition, comme cela l'avait été proposé par Taylor et collaborateurs (Taylor *et al.* 2003).

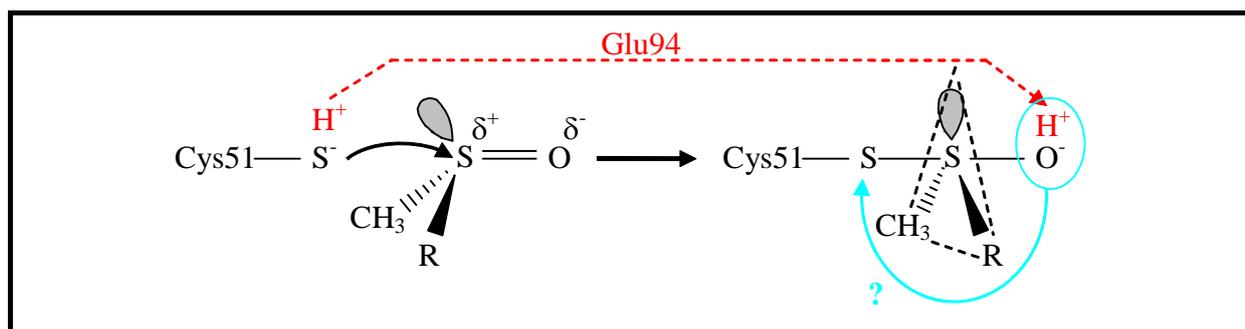


Figure 7

L'attaque nucléophile du groupement thiolate de la cystéine catalytique Cys51 sur le groupement sulfoxyde polarisé du substrat (un résidu méthionine oxydé), et la géométrie bipyramide trigonale de l'état de transition sulfurane à laquelle elle conduit.

Le transfert (en rouge) du proton de Cys51 vers l'oxygène du sulfurane pourrait se dérouler simultanément à l'attaque nucléophile, et serait assisté par Glu94, soit directement, soit *via* une molécule d'eau. Le réarrangement de l'état de transition vers la forme acide sulfénique de Cys51, avec transfert (en cyan) du groupement hydroxyle sur le soufre de Cys51, est incompatible avec la géométrie de l'état de transition.

Modélisant un résidu cystéine à la position occupée par Ser51 dans la structure de la forme MsrA_{MetSO}, il apparaît que seuls de légers réarrangements locaux seraient nécessaires à la formation de la liaison covalente entre Cys51 et le substrat pour obtenir un sulfurane de géométrie bipyramide trigonale (Figure 7). Le soufre du thiol et le groupement OH y seraient en position apicale, tandis que le groupement méthyle, le groupement méthylène et la paire libre d'électrons seraient dans le plan équatorial, comme des études en chimie théorique l'ont récemment suggéré (Balta *et al.* 2006). Une bonne efficacité de l'acte catalytique pourrait être expliquée par une stabilisation du groupement OH de cet état de transition par les trois résidus

Tyr134, Tyr82 et Glu94. En effet, il a été montré que la substitution de l'un de ces trois résidus affecte sensiblement l'acte catalytique mais peu l'affinité apparente avec le substrat (Antoine *et al.* 2006). En revanche, reste posée la question de savoir comment cet état de transition sulfurane se réarrange et conduit à la formation d'un acide sulfénique de géométrie tétraédrique. En effet, les dispositions en apical des deux atomes d'oxygène et de soufre au sein de la géométrie bipyramide trigonale sont incompatibles avec un transfert direct du groupement OH vers l'atome de soufre de Cys51.

2.1.3. La formation du pont disulfure Cys51-Cys198

Faisant suite à l'étape réductase, le cycle catalytique se poursuit par l'attaque de Cys198 sur la forme sulfénique de Cys51, ce qui conduit à un pont disulfure entre ces deux résidus, ainsi qu'au départ d'une molécule d'eau (voir Partie A, paragraphe 3.2). Dans la structure de MsrA_{CysOH}, le voisinage de Cys51 révèle qu'aucune chaîne latérale chargée positivement ne fait face au groupement sulfénique, qui est donc probablement sous forme protonée et non sous forme sulfénate. L'orientation observée pour l'acide sulfénique est cohérente avec son attaque nucléophile par la cystéine de recyclage Cys198. En effet, dans la structure de la MsrA_{CysOH}, son atome de soufre semble "s'offrir" à la zone occupée ensuite par la chaîne latérale de Cys198 dans la forme oxydée. Dans les structures de MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH}, cette zone est occupée par une molécule d'eau w3 qui pourrait alors marquer l'aptitude de cette région de la structure à accueillir un atome de soufre nucléophile (voir Figures 2 à 4).

Au contraire de l'orientation de la chaîne latérale de l'acide sulfénique Cys51, adaptée à l'attaque nucléophile par la cystéine de recyclage, la chaîne latérale de Cys198 (mutée en sérine dans la forme MsrA_{CysOH}) n'est pas orientée pour son attaque sur le groupement hydroxyle de Cys51. En effet, l'extrémité C-terminale conserve dans la structure de MsrA_{CysOH} la même conformation que dans les structures des formes MsrA_{red} et MsrA_{MetSO}. La distance entre les résidus 51 et 198 est donc largement trop élevée pour permettre la formation du pont disulfure. Ce constat est commun à toutes les structures cristallines de MsrA résolues à ce jour. La structure de la MsrA d'*E. coli* obtenue par RMN (Coudeville *et al.* 2007) montre une certaine flexibilité des résidus 195-204, mais cependant avec une amplitude insuffisante pour permettre la formation du pont disulfure. Au problème de l'orientation du résidu 198 s'ajoute celui de sa déprotonation préalable à l'attaque de Cys51.

Aucun résidu capable de réaliser une catalyse acide-base n'est observé dans le voisinage de Cys198 (ou Ser198 dans le cas de la forme MsrA_{CysOH}). Le plus proche d'entre eux, His199, est distant de 5.0 Å de l'oxygène O_γ de Ser198. Par ailleurs, l'attaque nucléophile de Cys198 doit s'accompagner d'une catalyse acide, de sorte que le groupement hydroxyle de l'acide sulfénique soit relargué sous la forme d'une molécule d'eau (voir Figure 19 page 44). Dans la structure de la forme MsrA_{CysOH}, la position de Glu94 convient pour ce rôle d'assistant acide, soit directement, soit par le biais de la molécule d'eau w1. Un renforcement de cette hypothèse est que, dans le mutant C198S, ce résidu semble favoriser un échange entre l'hydroxyle de l'acide sulfénique et une molécule d'eau du solvant, alors qu'une substitution par Gln ne montre pas un tel comportement (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). Une hypothèse intéressante serait qu'un transfert de proton se déroule à partir de Cys198 vers le groupement hydroxyle nucléofuge de l'acide sulfénique Cys51, en un mécanisme concerté ; Glu94 pourrait participer (peut-être indirectement) à ce transfert. Cependant, la géométrie de la chaîne latérale de Cys198 et du groupement hydroxyle de l'acide sulfénique Cys51, placés en opposition l'un de l'autre par rapport à l'atome de soufre de Cys51 dans la structure de la forme MsrA_{CysOH}, n'est pas favorable à cette hypothèse : un transfert direct entre ces deux groupements ne peut se dérouler, sauf accompagné d'un changement conformationnel qui le permette.

2.2. Analyse conformationnelle

Les structures des formes MsrA_{red}, MsrA_{MetSO} et MsrA_{CysOH} correspondent toutes au même repliement global, approprié à la première partie du mécanisme catalytique incluant la reconnaissance du substrat et la catalyse de l'étape réductase. Au contraire, ce repliement requiert un changement conformationnel en vue de la formation du pont disulfure Cys51-Cys198. Tout d'abord, la région Gly50-Gly54 subit un léger déplacement en accompagnement du mouvement de Cys51 vers Cys198. D'autre part, une réorganisation complète de la région de Cys198 permet une rotation de cette chaîne latérale vers Cys51. Bien que la présence du pont disulfure Cys51-Cys198 représente une forte contrainte sur la position de Cys198, les résidus contigus à Cys198 restent très désordonnés. Les résidus du fragment ₁₉₄PNGYCH₁₉₉ apparaissent déjà légèrement désordonnés dans la structure de la forme MsrA_{red}, quoique dans une moindre mesure. La mobilité apparente de cette région, également observée dans la structure RMN de la MsrA d'*E. coli* (Coudeville *et al.* 2007), explique probablement que le

changement conformationnel puisse se dérouler rapidement, au point que la formation du pont disulfure ne soit pas l'étape limitante du cycle catalytique complet (Olry *et al.* 2002).

Un mouvement de la région Thr121-Thr132 est observé simultanément. Deux conformations de cette zone sont observées. La première, dite "fermée", est commune à toutes les structures de MsrA de *N. meningitidis* présentées dans cette étude, excepté celle de la MsrA_{ox}. Elle est associée à l'interaction observée entre Asp129 et Tyr197, ces deux résidus s'associant en une paire bordant le site actif. La seconde est observée dans la structure de la forme MsrA_{ox}, dite "ouverte" : elle rejette Asp129 loin du site actif, de sorte que l'interaction avec Tyr197 soit rompue.

Ce mouvement de la région Thr121-Thr132 peut paraître étonnant, puisqu'il concerne des résidus éloignés du voisinage de Cys51 et Cys198. Cependant, il semble bel et bien corrélé à l'acte catalytique, et non à un artefact inhérent à la méthode expérimentale utilisée, puisqu'un mouvement similaire est également observé dans la structure RMN de la MsrA d'*E. coli* oxydée en un pont disulfure Cys51-Cys198 (Coudeville *et al.* 2007). Ce résultat soulève plusieurs questions. Tout d'abord, quand ce changement se déroule-t-il ? Cette étude suggère qu'il soit corrélé à la formation du pont disulfure Cys51-Cys198, puisqu'il est absent de la structure de la forme MsrA_{CysOH}, représentant la fin de l'étape réductase. Mais de quelle manière ? En même temps, ou après la formation du pont disulfure ? Dans le premier cas, il pourrait provenir de la contrainte imposée sur la chaîne polypeptidique par le retournement de Cys198 vers Cys51, contrainte qui romprait l'interaction Asp129-Tyr197, relâchant ainsi la boucle Thr121-Thr132 qui adopterait alors une nouvelle conformation. Dans la seconde hypothèse, l'environnement électrostatique du pont disulfure formé pourrait être incompatible avec la conformation initiale de Asp129 et le fragment auquel il appartient. Par ailleurs la structure de MsrA_{CysOH}, telle qu'elle est obtenue, ne permet pas de rejeter complètement l'hypothèse selon laquelle l'ouverture de la boucle Thr121-Thr132 s'effectue à la fin de l'étape réductase, lors du relargage du produit. En effet, dans cette étude, le DMSO a été utilisé comme substrat pour préparer la forme MsrA_{CysOH}, pour permettre la diffusion de ce composé dans le cristal. Les tentatives effectuées avec l'utilisation de Ac-MetSO-NHMe ont abouti à une perte de l'intégrité des cristaux. D'autres expériences sont ainsi à prévoir dans le but de lever cette incertitude.

Des réponses apportées à une autre question pourraient aider à résoudre ce problème : le changement conformationnel a-t-il un rôle ? Coudeville et collaborateurs proposent que la zone hydrophobe découverte au solvant suite au déplacement des résidus Thr121-Thr132 pourrait préparer l'interaction ultérieure avec la Trx lors de l'étape suivante du processus de

recyclage de l'enzyme (Coudeville *et al.* 2007). La conformation fermée de la boucle observée dans la structure de la forme MsrA_{CysOH} serait alors justifiée dans le cadre de cette hypothèse. En effet, la Trx a été montrée incapable de réduire efficacement l'intermédiaire acide sulfénique de Cys51 (Boschi-Muller *et al.* 2005). Si telle est la raison du changement de conformation mis en évidence dans la MsrA de *N. meningitidis* et dans la MsrA d'*E. coli*, l'observation doit pouvoir être étendue aux autres MsrA, ou du moins à celles appartenant aux mêmes sous-classes. Les deux résidus Gln126 et Asp129, strictement conservés dans toutes les séquences de MsrA, participent à la stabilisation de la boucle dans sa conformation "fermée" : la chaîne latérale du premier est impliquée dans deux liaisons hydrogène avec des résidus du cœur de l'enzyme, et l'atome Oδ1 du deuxième établit une interaction avec l'azote de la chaîne principale de Cys51, *via* une molécule d'eau (voir paragraphe 1.2.1). Cette conformation est donc probablement maintenue dans toutes les formes de MsrA, une conformation visiblement adaptée pour le déroulement efficace de l'étape réductase comme le confirment les structures discutées jusqu'ici. La séquence Thr121-Thr132 est hautement conservée au sein de chacune des deux sous-classes 1 et 2 de MsrA, c'est à dire celles possédant leur cystéine de recyclage en position 198 (Figure 8) ; on peut ainsi émettre l'hypothèse que la conformation "ouverte" est envisageable pour la forme oxydée de ces MsrA. La séquence du fragment Thr121-Thr132 diffère nettement dans les MsrA de la sous-classe 3, celles qui possèdent leur cystéine de recyclage en position 54. L'existence de la conformation "ouverte" de la boucle dans la forme oxydée de ces MsrA est donc incertaine. Il convient cependant de mentionner que, du fait de la position prédite de Cys54 avec l'examen des structures disponibles, le pont disulfure Cys51-Cys54 qui se forme dans cette sous-classe de MsrA est probablement situé dans un environnement différent ; l'interaction avec la Trx pourrait donc différer.

Ainsi, la mobilité de l'extrémité C-terminale et la réorganisation de la boucle Thr121-Thr132 pourraient être une propriété commune au moins à toutes les MsrAs qui possèdent Cys198. Elles seraient associées à la formation du pont disulfure et pourraient permettre sa réduction par un système de type Trx/Trx réductase.

	120	130	139		120	130	139		
MSA1_SYNY3	HNP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSG	IY	145	
MSA2_ANASP	HNP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSG	IY	144	
MSRA_PSESM	HNP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	146	
MSRA_PSEAE	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	146	
MSRA_BRUSU	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	145	
MSRA_BRUME	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	145	
MSRA_OCHAN	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	145	
MSA1_RHIME	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSA	IY	145	
MSA1_CAUCR	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSG	IY	142	
MSRA_XYLFT	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IH	142	
MSRA_XANCH	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	142	
MSRA_XANAC	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	142	
MSRA_XANCP	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	142	
MSRA_VIBCH	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	139	
MSRA_VIBVU	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	139	
MSRA_VIBPA	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	139	
MSRA_HUMAN	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	162	
MSRA_BOVIN	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	160	
MSRA_RAT	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	160	
MSRA_MOUSE	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	160	
MSRA_ECOLI	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	139	
MSRA_SALTY	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	140	
MSRA_ERWCH	HNP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	141	
MSRA_YERPE	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	140	
MSRA_CORML	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IY	144	
MSRA_BRANA	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSG	IY	187
MSRA_ARATH	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSG	IY	188
MSRA_LACSA	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSG	IY	188
MSRA_LYCES	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSG	IY	125
MSRA_FRAAN	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSG	IY	120
MSRA_METTH	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSV	IF	104
MSA1_ANASP	HDP	TTL	NRO	GN	IVG	TQY	RSV	IF	109
MSA2_RHILO	HNP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RST	IF	107	
MSA2_SYNY3	HDP	QGM	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	134	
MSA3_RHIME	HDP	TKD	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	95	
MSRA_STRCO	HDP	TKN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	98	
MSA1_RHILO	HDP	TRN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	98	
MSRA_MYCLE	HDP	TRN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	99	
MSRA_MYCTU	HDP	TKD	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	97	
MSRA_PSEFL	HDP	STP	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	98	
MSRA_SCHPO	HDP	TSN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	102	
MSAB_TREPA	HDP	SLN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	187	
MSRA_CLOAB	VDP	LKN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSRA_CLOPE	IDP	SLN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSRA_MYCGE	IDP	TRN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSRA_MYCPN	IDP	TRN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSAB_NEIMA	VDP	SLN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	294	
MSAB_NEIGO	VDP	SLN	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	294	
MSAB_HELPE	VDP	VSV	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSAB_HAEIN	IDP	SVN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSAB_ACTAC	IDP	SVN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MSAB_STRGC	IDP	LSV	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	98	
MAB1_STRPN	IDP	LSI	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	96	
MAB2_STRPN	INP	SKN	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	96	
MSAB_CAMFE	IDP	FSV	RQGN	IVG	TQY	RTG	IY	122	
MSRA_UREPA	IDP	FSV	RQGN	IVG	TQY	RSV	IF	99	
MSRA_MYCPU	INP	YSL	RQGN	IVG	TQY	RIG	LY	98	
MSRA_LISMO	TDP	DAAG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	103	
MSRA_LISIN	TDP	DAAG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	103	
MSRA_BACSU	IDP	DAGG	CFV	DRG	DSY	RAA	IF	102	
MSRA_BACHD	IDP	DDG	CFV	DRG	DSY	RTA	IF	102	
MSA2_STAAN	FDP	DDG	CFV	DRG	DSY	QPV	IF	100	
MSA2_STAAM	FDP	DDG	CFV	DRG	DSY	QPV	IF	100	
MSRA_STRP8	TDP	DAFG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	98	
MSRA_STRPY	TDP	DAFG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	98	
MSA2_LACLA	TDP	DAFG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	100	
MSA1_LACLA	IDP	DAFG	CFV	DRG	DSY	RPV	IF	100	
MSA1_STAAM	IDP	DTG	CFV	DRG	DSY	QTA	IF	100	

Figure 8

Quelques exemples de séquences de MsrA (caractérisées ou putatives), autour de la région Thr121-Thr132.

La numérotation référence est indiquée en haut de chaque colonne, la numérotation propre à chaque organisme est à droite. Dans la colonne de gauche figurent les MsrA de la sous-classe 1 (trois cystéines en 51, 198, 206) ; les plantes étant toutefois isolées sous le pointillé compte tenu de la particularité de leur cas (voir partie A, paragraphe 3.4.4). Dans la colonne de droite sont rassemblées les MsrA à deux cystéines, en haut la sous-classe 2 (cystéines en 51 et 198), et en bas la sous-classe 3 (cystéines en 51 et 54). Les acides aminés surlignés en rouge sont strictement conservés, les autres couleurs aident à la lecture des acides aminés les plus fréquemment rencontrés à chaque position, au sein du segment Thr121-Thr132.

SECTION IV

Les MsrB

1. Description du domaine MsrB de PilB

1.1. Bilan des résultats expérimentaux

Les structures cristallographiques de la forme réduite, la forme oxydée, et d'un complexe entre le mutant Cys117Ser et un substrat ont été déterminées dans le cadre de l'étude du domaine MsrB de la protéine PilB de *N. meningitidis*.

Comme dans le cas de la MsrA, les structures des formes réduite et oxydée avaient été résolues par le docteur Brice Kauffmann durant son stage doctoral. Elles seront présentées et discutées ici en même temps que les résultats nouvellement acquis.

Les protéines produites pour ces différentes études comprennent 146 résidus correspondant à la portion de séquence de la protéine PilB allant du résidu Thr376 au résidu Lys521 (voir Section I, paragraphe 1.1); il y sera désormais référé en tant que MsrB de *N. meningitidis*.

La forme réduite est en fait une forme contenant des résidus sélénométhionine, préparée pour une résolution de la structure par la méthode MAD. Des cristaux orthorhombiques appartenant au groupe d'espace $P2_12_12_1$ ont permis d'obtenir une structure à 1.82 Å de résolution ($R = 18.8\%$ et $R_{\text{free}} = 23.7\%$) ; quatre monomères sont présents dans l'unité asymétrique.

Des cristaux hexagonaux (groupe d'espace $P622$) obtenus pour la forme oxydée ont donné lieu à une structure à une résolution de 3 Å affinée provisoirement ($R = 25.5\%$, $R_{\text{free}} = 29.2\%$). Un seul monomère est présent dans l'unité asymétrique. Malgré la résolution modeste, le modèle obtenu permet de visualiser et de décrire le pont disulfure intra-moléculaire, ainsi que les implications structurales dues à sa formation. Par ailleurs, un pic de densité résiduelle est présent dans le site actif, pouvant correspondre à une molécule de MetSO ou de Met (voir paragraphe 1.4.2 ci après).

Enfin, des cristaux cubiques (groupe d'espace $P4_332$) obtenus pour la forme complexée avec le substrat (utilisant le double mutant C63S/C117S) ont permis d'obtenir une structure à 2.1 Å de résolution ($R = 20.0\%$, $R_{\text{free}} = 24.3\%$). Deux monomères sont présents dans l'unité asymétrique et il semble que plusieurs molécules de PEG sont fixées par la

protéine dans ces cristaux. Le substrat adopte deux conformations dans le monomère A et une seule conformation dans le monomère B.

1.2. La structure de la forme réduite

1.2.1. La structure globale

Comme attendu au vu du pourcentage d'identité entre leurs deux séquences (97 %), le repliement adopté par le domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* est identique à celui observé chez *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.* 2002). Il repose sur un cœur constitué de deux feuillets β antiparallèles, l'un à trois brins β 1, β 2 et β 9 (ordonnés 9-1-2) et l'autre à six brins β 3 à β 8 (ordonnés 3-4-8-7-6-5), avec trois hélices α en périphérie (voir partie A, paragraphe 3.5). Ainsi, les différentes superpositions possibles entre les monomères de ces deux structures aboutissent à des r.m.s.d. compris entre 0.45 Å et 0.81 Å pour un minimum de 140 atomes C α superposés (voir Tableau 1), reflétant la forte similarité des deux repliements.

		<i>N. meningitidis</i>			
		A	B	C	D
<i>N. gonorrhoeae</i>	A	0.513 Å 140 C α	0.680 Å 143 C α	0.717 Å 140 C α	0.518 Å 141 C α
	B	0.580 Å 140 C α	0.709 Å 141 C α	0.812 Å 140 C α	0.446 Å 140 C α

Tableau 1 R.m.s.d (Å) obtenus en superposant les atomes de carbone C α de l'un des quatre monomères A, B, C ou D contenus dans l'unité asymétrique de la MsrB de *N. meningitidis* (sous forme réduite) à ceux de l'un des deux monomères A ou B contenu dans l'unité asymétrique de la MsrB de *N. gonorrhoeae* (sous forme réduite). Les superpositions ont été réalisées avec l'option Brute du module Al_Lsqman (Kleywegt 1996). Le nombre d'atomes C α alors superposés est indiqué dans chaque cas.

Par ailleurs, peu de différences sont observées entre les quatre monomères de l'unité asymétrique : une superposition des monomères deux à deux conduit à un r.m.s.d. entre atomes de carbone C α toujours inférieur à 0.8 Å, avec une prise en compte systématique de la quasi-totalité des résidus de la séquence (Tableau 2).

Une des seules différences notables concerne la boucle reliant les brins β 5 et β 6, observée sous deux conformations distinctes de coudes β . Les monomères A et D correspondent à la même conformation de ce coude et les monomères B et C en présentent une seconde (Figure 1). Cette observation est corrélée au fait que ces boucles sont impliquées

dans des interactions entre monomères mettant en jeu les résidus du site actif d'un monomère voisin ; les interactions établies par les boucles des monomères A et D sont comparables, de même que celles observées pour les monomères B et C. La description de ces interactions est détaillée dans le paragraphe suivant.

	A	B	C	D
A	-	0.566 Å 144 C α	0.732 Å 144 C α	0.378 Å 142 C α
B		-	0.534 Å 144 C α	0.544 Å 140 C α
C			-	0.717 Å 140 C α
D				-

Tableau 2 R.m.s.d (Å) obtenus en superposant deux à deux (voir Tableau 1) les monomères contenus dans l'unité asymétrique du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* sous forme réduite.
Le nombre d'atomes de carbone C α alors superposés est indiqué dans chaque cas.

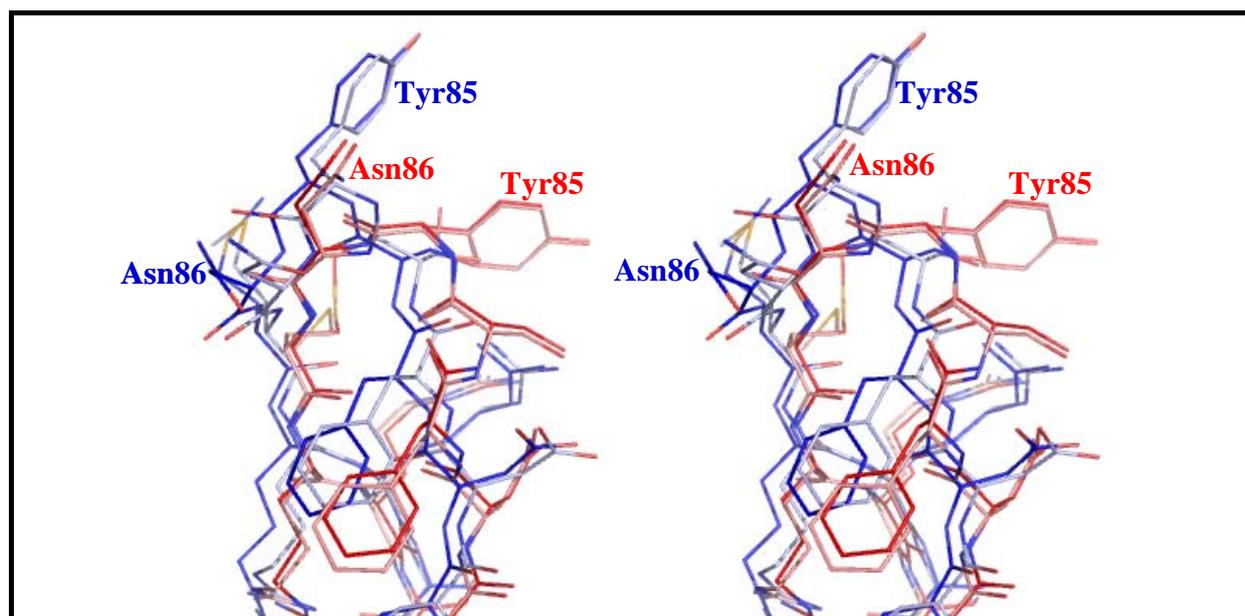


Figure 1 Vue stéréo de la boucle reliant les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ dans chacun des quatre monomères contenus dans l'unité asymétrique de la forme réduite de la MsrB de *N. meningitidis*, et superposés entre eux
(En bleu clair le monomère A, en rouge le monomère B, en rose le monomère C et en bleu le monomère D)

1.2.2. Sites actifs et interactions entre monomères

Parmi les interactions entre les différents monomères de l'unité asymétrique, certaines impliquent la boucle reliant les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ et le site actif d'un monomère voisin, d'une telle

manière que l'on peut considérer deux dimères équivalents : le dimère A-C et le dimère B-D. Au sein de chaque dimère, la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ d'un monomère interagit avec les résidus du site actif de l'autre monomère, mais en mettant à contribution des résidus différents. Dans l'exemple du dimère A-C, Tyr85_A est impliqué dans l'interaction avec les résidus du site actif du monomère C, alors que les résidus du site actif du monomère A interagissent avec Asn86_C. Néanmoins, les interactions établies sont de nature similaire. L'atome d'oxygène de la chaîne latérale du résidu "externe" est en liaisons hydrogène avec l'atome N δ_1 de His103 d'une part, et une molécule d'eau stabilisée par les trois résidus His100, Asn119 et Thr26 d'autre part ; cette molécule d'eau est retrouvée dans toutes les structures cristallographiques de MsrB disponibles. En addition, les atomes de la chaîne aliphatique ou aromatique de Tyr85 ou Asn86 sont en interaction hydrophobe avec Trp65. Les mêmes observations sont valables pour le dimère B-D ; le monomère B est équivalent au monomère C et le monomère A au D (Figure 2 et Figure 3).

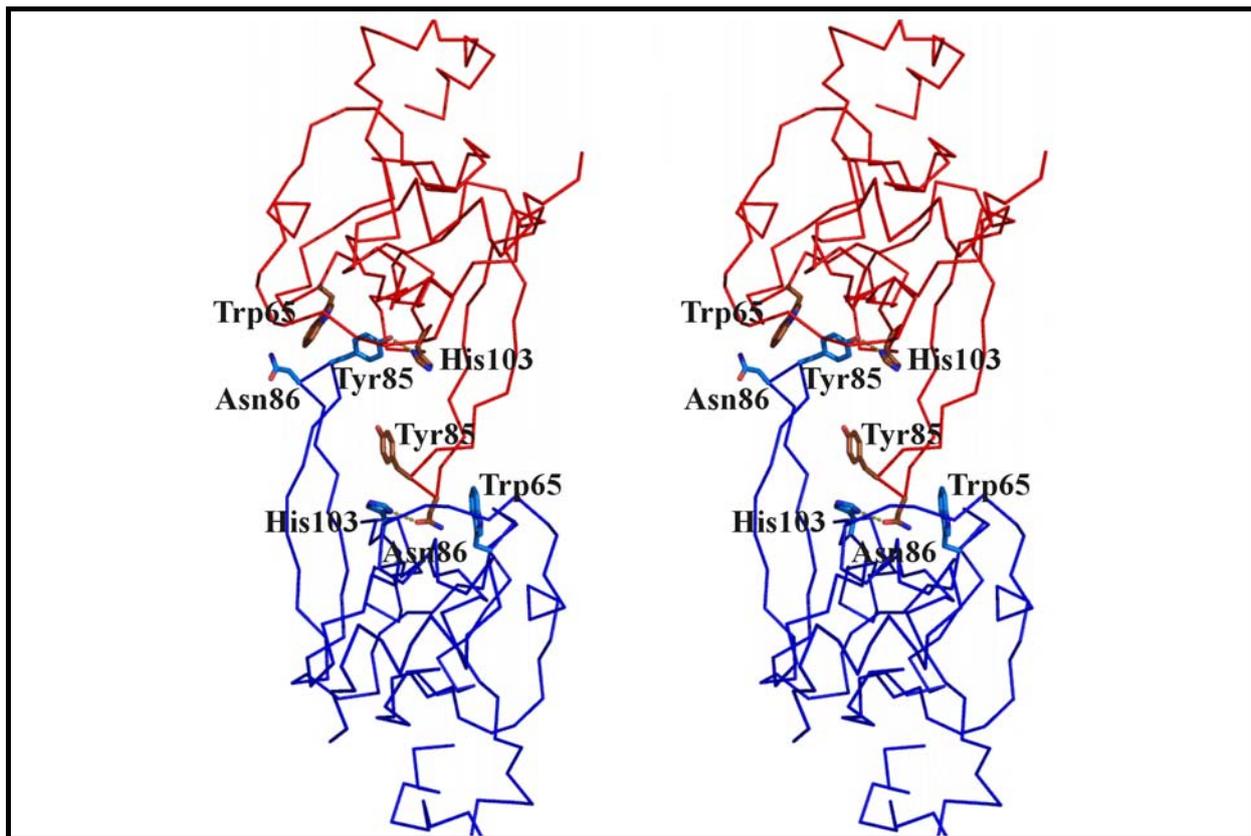


Figure 2

Représentation stéréo des traces Ca des monomères B (rouge) et D (bleu) de la forme réduite du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis*, en interaction au sein de l'unité asymétrique du cristal.

Les résidus Tyr85 ou Asn86 de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ d'un monomère interagissent avec le site actif du monomère voisin, en particulier avec ses résidus Trp65 et His103.

Il se trouve que dans le cas de la protéine issue de *N. gonorrhoeae*, bien que seuls deux monomères soient présents dans l'unité asymétrique, les résidus du site actif établissent des interactions similaires (Lowther *et al.* 2002) (voir partie A paragraphe 3.4). En effet, une molécule de cacodylate est présente dans le site actif du monomère A. D'une part, l'un de ses atomes d'oxygène interagit avec His103 et une molécule d'eau, d'une manière comparable aux atomes d'oxygène des chaînes latérales de Tyr85 ou Asn86, tel que décrit ci-dessus. D'autre part, ses deux groupements méthyles interagissent avec Trp65. Le site actif du monomère B, quant à lui, accueille Asn86 issu d'un voisin symétrique, d'une manière identique à ce qui est observé chez *N. meningitidis*, au niveau du monomère D par exemple. Ces interactions au sein du site actif sont mimétiques de l'association entre l'enzyme et le substrat, comme il le sera détaillé dans le paragraphe 1.3.2 de cette section.

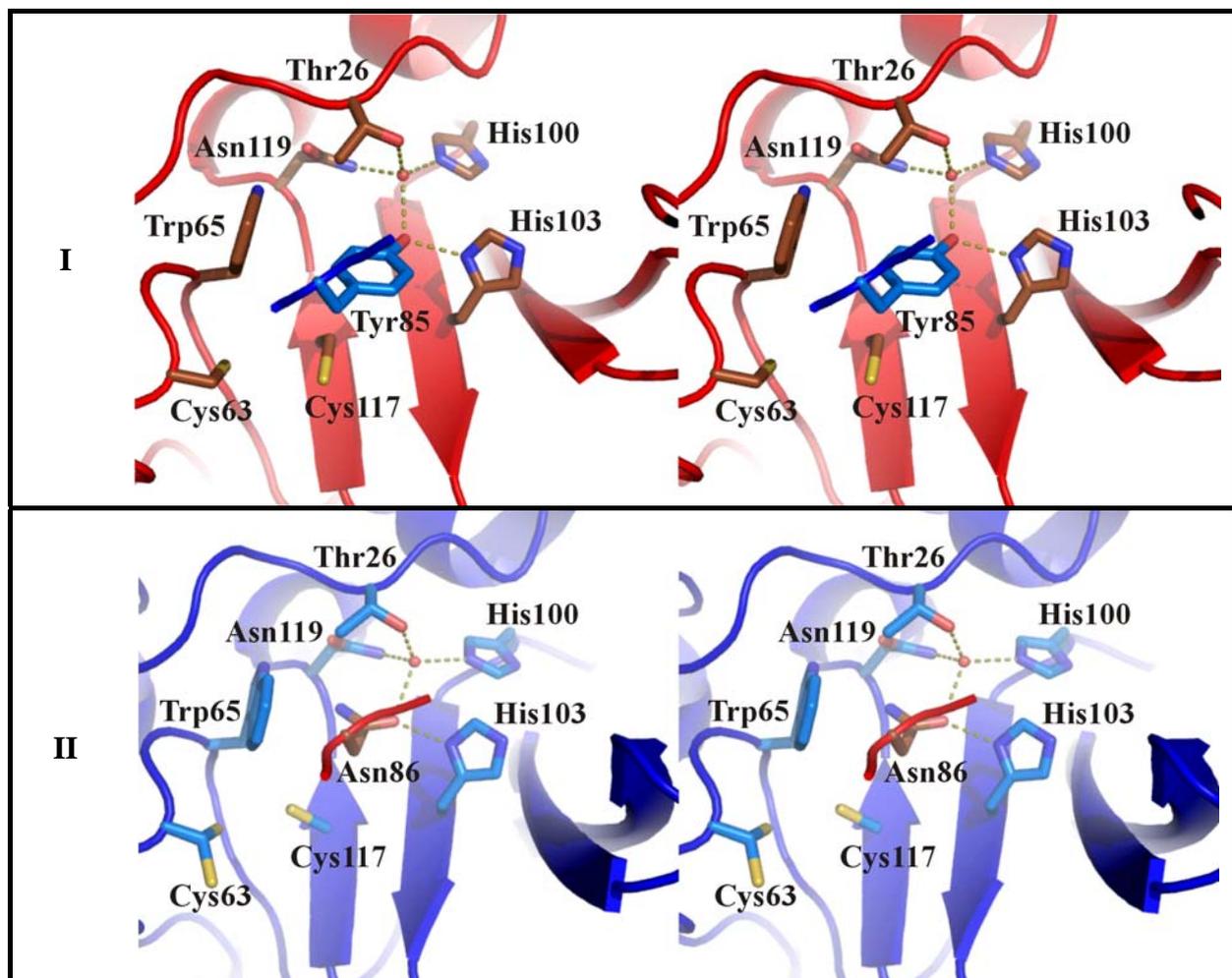
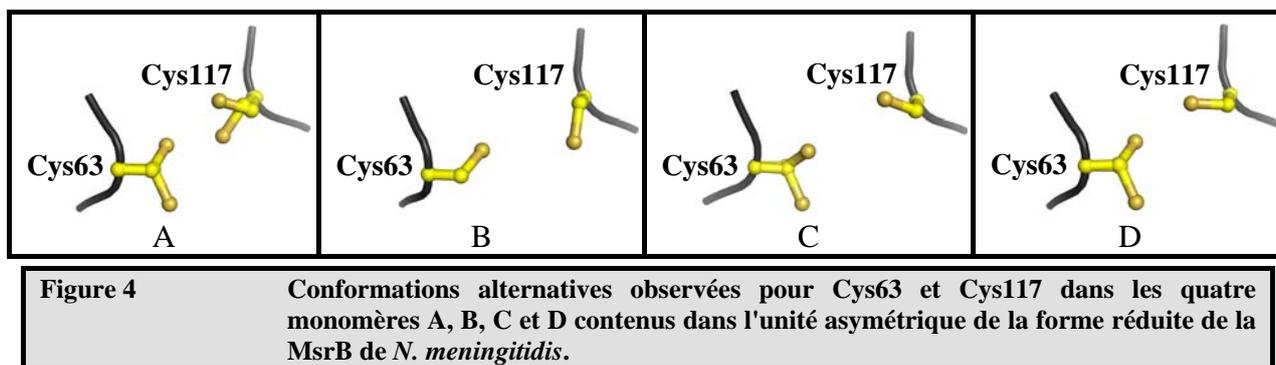


Figure 3

Vues stéréo détaillant l'interaction cristallographique entre les monomères B (rouge) et D (bleu) de la forme réduite de la MsrB de *N. meningitidis*.

La chaîne principale d'un monomère est représentée en mode flèches et rubans et les chaînes latérales des résidus de son site actif sont en mode bâtons. Dans chaque site actif interagit soit le résidu Tyr85 (I), soit Asn86 (II) (représentés en mode bâtons) de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ du monomère voisin.

Enfin, les deux résidus cystéine intervenant dans le mécanisme catalytique sont relativement proches l'un de l'autre pour pouvoir former le pont disulfure amorçant l'étape de recyclage sans nécessiter un remaniement de la conformation globale (distance moyenne entre les C β dans les quatre monomères : 6.1 Å). Par ailleurs, plusieurs conformations de ces cystéines se distinguent d'un monomère à un autre, différant entre elles par l'orientation du groupement thiol (Figure 4) : il semble donc que ces deux cystéines puissent aisément tourner autour de l'angle χ_1 (c'est-à-dire autour de la liaison C α -C β) de sorte que les atomes de soufre puissent se rapprocher suffisamment pour réagir entre eux et former le pont disulfure. Ainsi, les deux atomes S γ pourraient être distants de seulement 2.75 Å, distance minimale mesurée entre l'une des deux positions alternatives occupées par S γ_{63} et l'une des deux positions de S γ_{117} dans le monomère A.



1.3. La structure du complexe avec le substrat

1.3.1. Structure globale et empilement cristallin

Comparée à la forme réduite, la structure globale observée pour le complexe MsrB/substrat n'est affectée ni par le changement des conditions de cristallisation, ni par la fixation du substrat.

Contrairement à la structure du complexe utilisant le simple mutant C117S de la même protéine, résolue antérieurement à cette étude, et dans laquelle le substrat était impliqué dans des interactions entre monomères voisins (voir partie A, paragraphe 4), l'empilement cristallin du double mutant C63S/C117S utilisé ici expose le site actif de chacun des deux monomères de l'unité asymétrique à un large canal de solvant (Figure 5), de sorte que la

fixation du substrat observée dans cette structure devrait être plus représentative de l'association naturelle entre l'enzyme et son substrat.

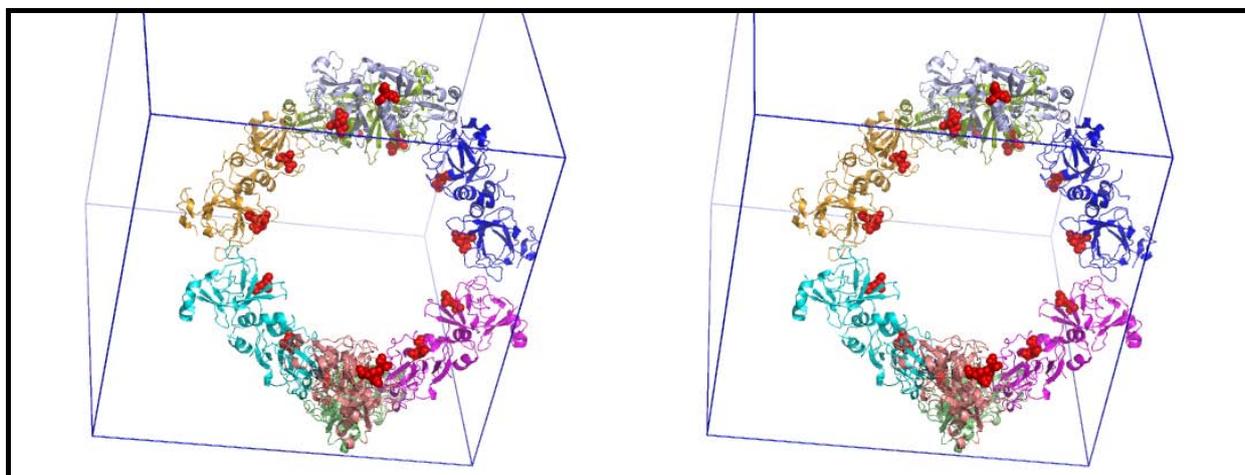


Figure 5 Représentation d'une partie de l'empilement cristallin de la structure du complexe avec le substrat révélant un large canal de solvant (diamètre : 80 Å environ). Le dimère contenu dans l'unité asymétrique est représenté en mode ruban, les équivalents cristallographiques ayant des couleurs distinctes. Le substrat fixé dans le site actif de chaque monomère est représenté en mode sphères, en rouge.

1.3.2. Analyse de la fixation du substrat

Dans le monomère A, la chaîne principale du substrat est stabilisée sous deux conformations bien identifiables. Dans le monomère B, il semble qu'une unique conformation soit définie, similaire à l'une de celles observées dans A, tandis que la région occupée par les atomes de la deuxième conformation observée dans le monomère A accueille ici une molécule de PEG (Figure 6).

Certaines des interactions établies entre les résidus du site actif et le substrat utilisé ici sont du même type que celles observées dans le site actif de la forme réduite, du fait des interactions entre monomères voisins (voir paragraphe 1.2.2).

Ainsi, concernant la fixation de la fonction sulfoxyde, deux régions du site actif peuvent être définies : (i) une zone hydrophile, formée par His103 et la molécule d'eau stabilisée par His100, Asn119 et Thr26, qui voit s'établir deux liaisons hydrogène avec l'oxygène du sulfoxyde et, (ii) de l'autre côté du site actif, une région hydrophobe formée par Trp65 dont le rôle est de stabiliser les groupements aliphatiques de la chaîne latérale du substrat, en particulier le méthyle C ϵ et le méthylène C γ (Figure 6). Ces interactions sont

conformes à l'analyse de Lowther et collaborateurs à partir de l'examen de la fixation de la molécule de cacodylate dans l'enzyme de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.* 2002).

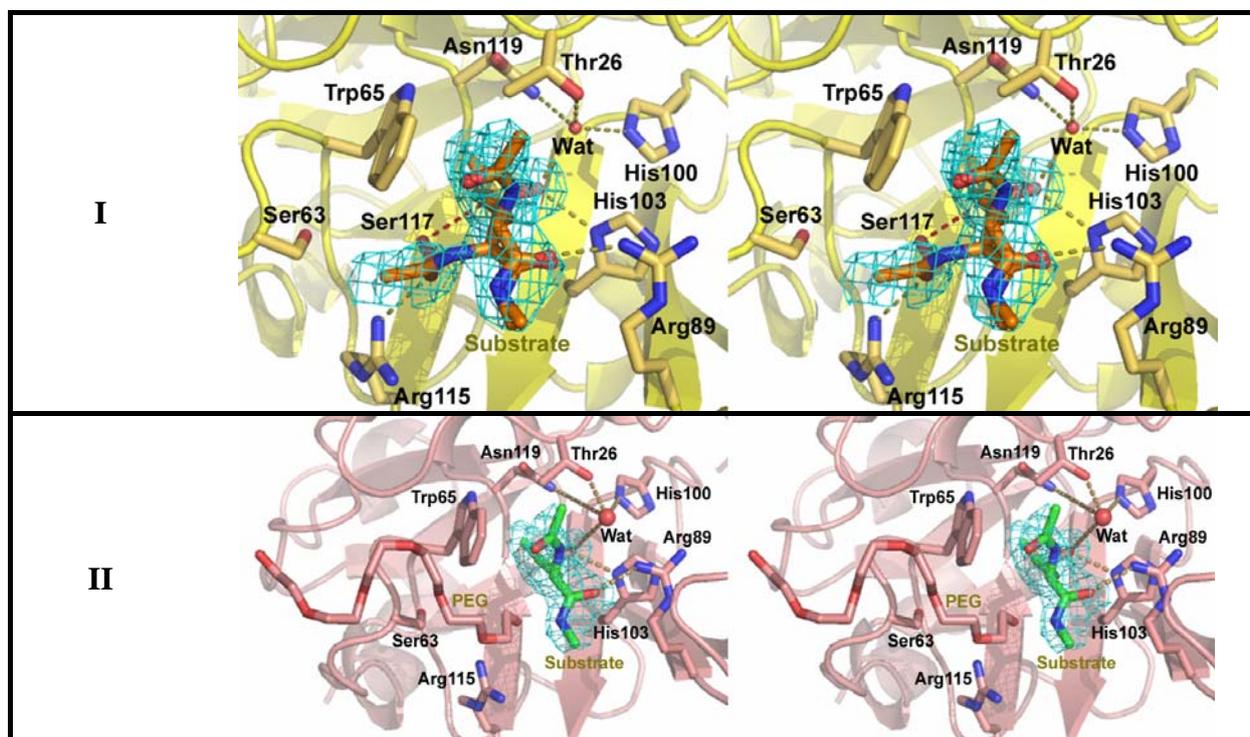


Figure 6 Vues stéréo détaillant les sites actifs des monomères A (I) et B (II) observés dans l'unité asymétrique du complexe entre la MsrB de *N. meningitidis* et le substrat. Dans A, deux conformations du substrat sont observées, dans B, une seule. Dans B, une molécule de PEG est également présente. Les cartes sont de type Fo-Fc (niveau de contours 2.8 σ) calculées à partir d'un modèle affiné en l'absence des substrats et de la molécule de PEG modélisés dans les sites actifs.

En ce qui concerne les interactions avec la chaîne principale du substrat, dans les deux monomères, quelle que soit la conformation considérée, l'oxygène carbonyle du résidu MetSO établit une liaison hydrogène avec l'atome N η 1 de Arg89. De plus, dans la conformation observée uniquement dans le monomère A, l'oxygène carbonyle du "résidu" précédent (un acétyle dans ce substrat artificiel) interagit également avec N η 1 de Arg115. Dans le monomère B, Arg115 interagit à la place avec une molécule de PEG (voir précédemment).

Ces résultats seront comparés à ceux observés pour un complexe de même nature, cette fois dans le cas de la MsrB de *X. campestris* (paragraphe 2.2.2).

1.4. La structure de la forme oxydée

1.4.1. Comparaison avec la forme réduite

Les données de diffraction collectées dans le cas de la forme oxydée étaient de faible qualité mais ont néanmoins permis de reconstruire 141 résidus. Le pont disulfure entre les résidus cystéine Cys63 et Cys117, en particulier, est bien défini en densité. La structure globale garde la conformation observée dans la forme réduite (Figure 7) : la superposition des monomères donne lieu à un r.m.s.d compris entre 0.73 et 0.93 Å pour un minimum de 129 atomes de carbone C α alignés (Tableau 3).

		Forme réduite			
		A	B	C	D
Forme oxydée	A	0.771 Å 135 C α	0.840 Å 137 C α	0.927 Å 129 C α	0.725 Å 135 C α

Tableau 3 R.m.s.d (Å) obtenus en superposant (voir Tableau 1) les atomes de carbone C α de la MsrB de *N. meningitidis* sous forme oxydée à ceux de l'un des quatre monomères A, B, C ou D contenus dans l'unité asymétrique de la forme réduite correspondante. Le nombre d'atomes C α superposés est indiqué dans chaque cas.

		Forme réduite			
		A	B	C	D
Forme oxydée	A	1.48 Å	2.24 Å	2.85 Å	1.53 Å

Tableau 4 Déplacement de l'atome C α du résidu Cys63 lors de la formation du pont disulfure Cys63-Cys117 dans la MsrB de *N. meningitidis*. Les valeurs indiquées représentent la distance mesurée entre l'atome C α de Cys63 dans la structure de la forme oxydée, et le même atome considéré tour à tour dans les quatre monomères observés pour la forme réduite, après superposition globale des structures (voir Tableau 3).

Le rapprochement des deux résidus cystéine nécessaire à l'établissement du pont disulfure (Figure 8) a impliqué, semble-t-il, essentiellement un déplacement de Cys63, dont le carbone C α est alors à environ 2 Å de sa position initiale dans la forme réduite (Tableau 4) ; la chaîne principale de Cys117 n'est en revanche pas modifiée.

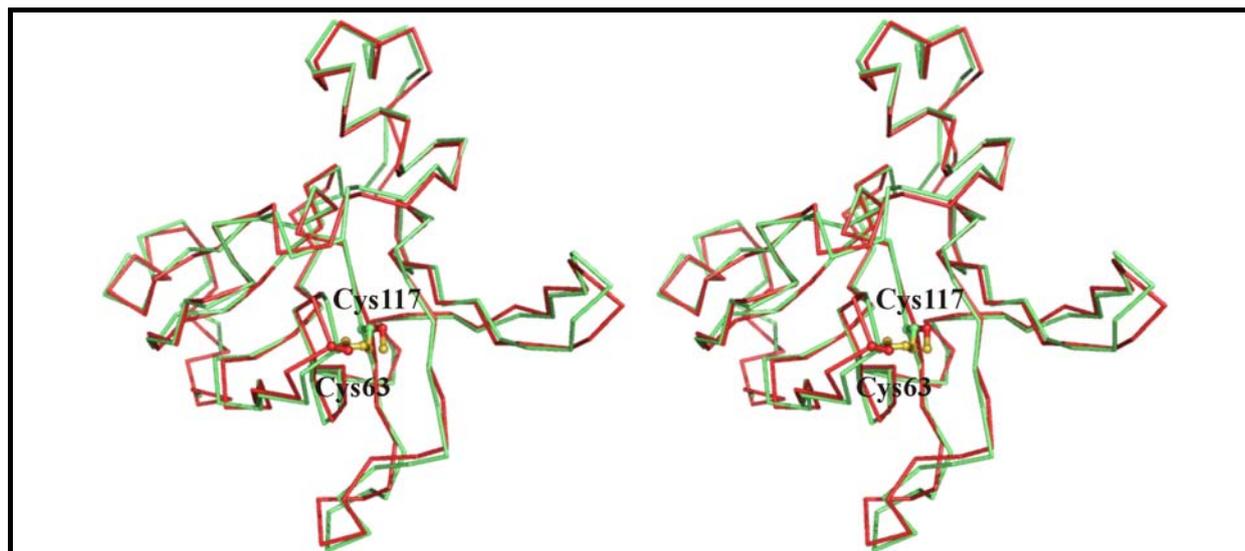


Figure 7 Représentation stéréo de la superposition des traces C α des formes réduite (monomère B; rouge) et oxydée (vert) du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis*. Les résidus Cys63 et Cys117, représentés en mode sphères et bâtons, y sont respectivement observés libres ou formant le pont disulfure.

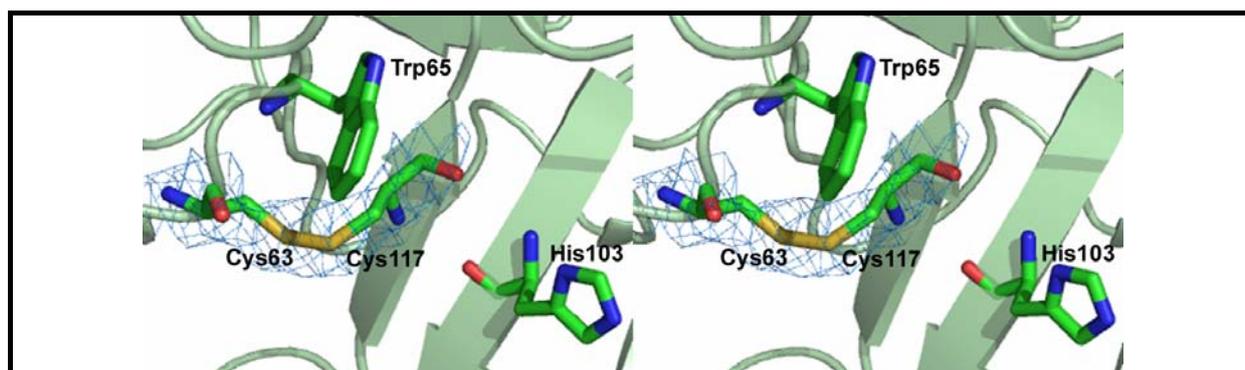


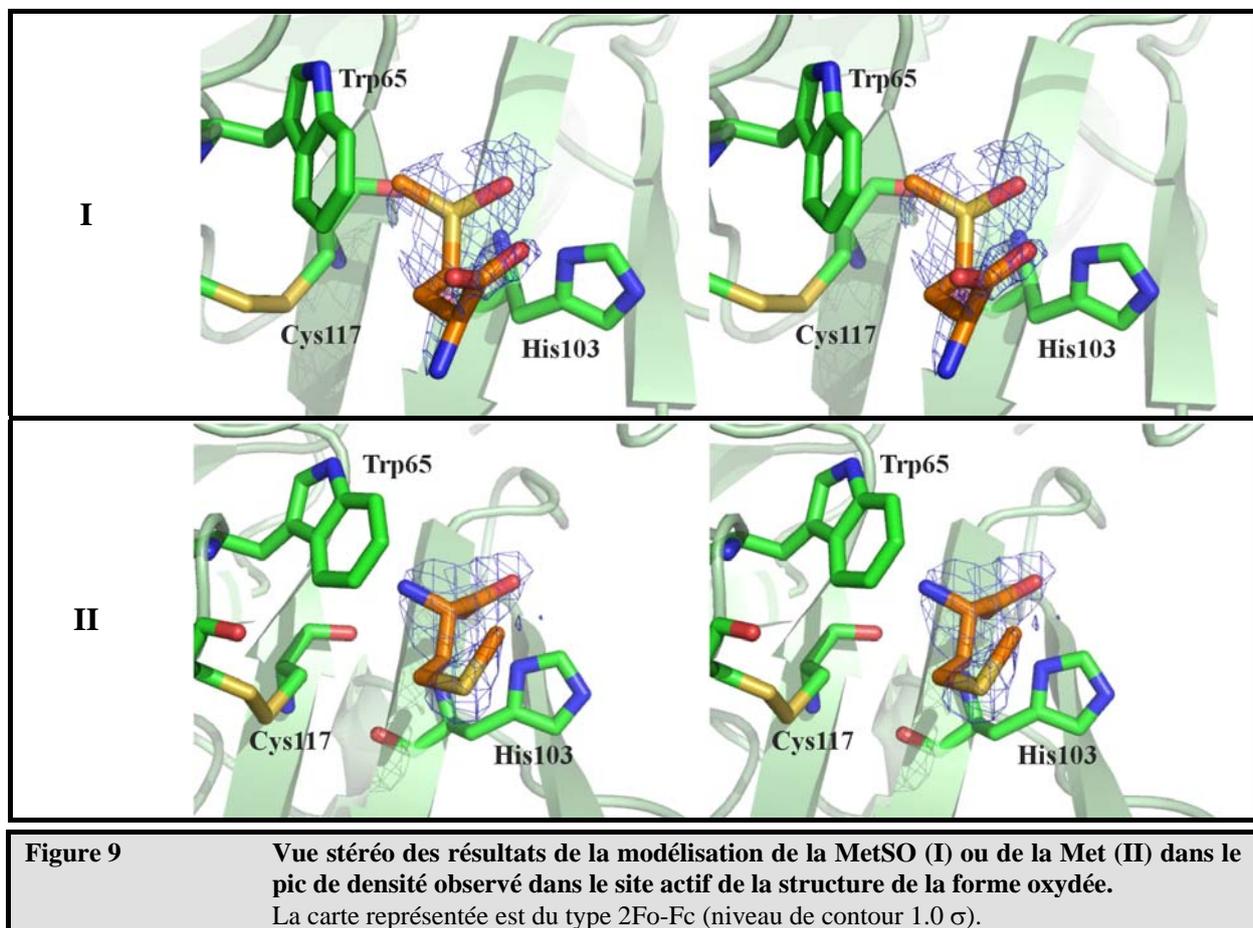
Figure 8 Vue stéréo détaillée du pont disulfure formé entre les résidus Cys63 et Cys117 de la forme oxydée du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis*, superposée à la carte de densité électronique 2Fo-Fc correspondante (niveau de contour 1.5 σ).

1.4.2. L'espèce hétérogène présente dans le site actif

Pour préparer la forme oxydée, l'enzyme sauvage a été mis en présence de substrat (l'acide aminé MetSO libre, en large excès) sans réducteur, puis l'excès du substrat et le produit formé ont été éliminés par chromatographie par exclusion de taille ; une analyse par spectrométrie de masse sur un échantillon identiquement préparé n'avait alors pas révélé la présence de l'un ou l'autre de ces deux composés (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). Néanmoins, le pic de densité positive observé dans le site actif (voir section I, paragraphe 4.1.2) pouvait être expliqué soit avec le substrat, soit avec le

produit ; aucun des autres composés mis en présence de la protéine lors de sa préparation ou lors de sa cristallisation ne permettait de l'expliquer de manière satisfaisante.

Or, les essais de modélisation de ces deux composés ont conduit à deux positionnements inversés, tête-bêche l'un de l'autre. En effet, la chaîne latérale de la MetSO serait orientée vers l'intérieur du site actif, et sa chaîne principale disposée à l'entrée ; dans le cas de la Met, ce serait la chaîne principale qui serait orientée vers l'intérieur (Figure 9). En regard du rôle biologique, la situation la plus plausible serait la première. En effet, le rôle des Msr implique des interactions avec des résidus intégrés dans une séquence polypeptidique ; une disposition du type de la Met serait alors à exclure car l'encombrement apporté par une chaîne polypeptidique positionnerait la chaîne principale nécessairement à l'entrée du site actif, et non à l'intérieur (Kauffmann, 2003).



Bien que la faible résolution de 3 Å et les cartes de densité obtenues en l'état actuel de l'affinement de la structure ne permettent pas de le certifier, la chaîne latérale de la MetSO ainsi positionnée semble établir les mêmes interactions que ce qui est observé dans la

structure du complexe inactif décrit dans le paragraphe 1.3.2, c'est-à-dire, l'oxygène du sulfoxyde en liaisons hydrogène avec His103 et la molécule d'eau stabilisée par les trois résidus His100, Thr26 et Asn119, tandis que les groupements aliphatiques interagissent avec Trp65. Le groupement carboxyle semble s'orienter vers Arg89, ce qui tend, ici également, à impliquer ce résidu dans les interactions avec la chaîne principale du substrat.

2. Description de la MsrB de *Xanthomonas campestris*

2.1. Bilan des résultats expérimentaux

La protéine a été produite à partir du gène *msrB* de la souche ATCC 13951 de *X. campestris* (Neiers *et al.* 2004). Rappelons que la cystéine de recyclage n'est pas en position 63 comme dans le cas de *N. meningitidis*, mais en position 31 (voir partie A paragraphe 4).

Bien que des cristaux aient pu être obtenus pour la forme réduite de l'enzyme et que des données de diffraction aient pu être collectées jusqu'à une résolution de 2.0 Å, des difficultés dans la résolution de la structure ne permettent pas, à l'heure actuelle, de disposer d'un modèle de cette forme de l'enzyme. En revanche, la structure du mutant C117S en complexe avec le substrat ainsi que la structure de la forme oxydée comportant le pont disulfure Cys31-Cys117 ont été déterminées.

Tout d'abord, les cristaux monocliniques (groupe d'espace P2₁) de la forme oxydée ont donné lieu à une collecte de données de diffraction de bonne qualité jusqu'à 1.66 Å. La structure a alors été résolue en utilisant la méthode SAD exploitant la présence naturelle d'un ion zinc dans la protéine (modèle final : R = 19.2 %, R_{free} = 23.7 %). Deux monomères sont présents dans l'unité asymétrique et leur conformation globale présente des différences substantielles par rapport aux modèles issus de *Neisseria*, certainement à l'origine des échecs dans les tentatives de remplacement moléculaire, malgré une identité de séquence de 39 % et une similarité de 50 %.

En comparaison, bien qu'utilisant un jeu de données de qualité médiocre au-delà de 2.5 Å de résolution, la détermination de la structure de la forme complexée avec le substrat par remplacement moléculaire s'est avérée aisée, à partir de l'un ou l'autre des modèles

disponibles, issu de *Neisseria* ou de *X. campestris* (forme oxydée ci-dessus) (modèle final : $R = 17.8\%$, $R_{\text{free}} = 25.8\%$). Deux monomères sont également présents dans l'unité asymétrique des cristaux orthorhombiques obtenus dans ce cas (groupe d'espace $P2_12_12_1$), mais seul l'un des deux interagit avec le substrat ; le site actif du deuxième est impliqué dans une interaction entre monomères.

2.2. La structure du complexe avec le substrat

2.2.1. Le repliement global

Le repliement adopté par la MsrB de *X. campestris* dans cette forme complexée avec le substrat est tout à fait semblable à celui de la MsrB de *N. meningitidis* dans la même situation (Figure 10). Les structures de ces deux MsrB se superposent sur environ 115 C α avec un r.m.s.d. voisin de 0.9 Å (Tableau 5). En particulier, les deux feuillets β mixtes de 3 et 6 brins sur lesquels repose l'architecture des MsrB sont conservés.

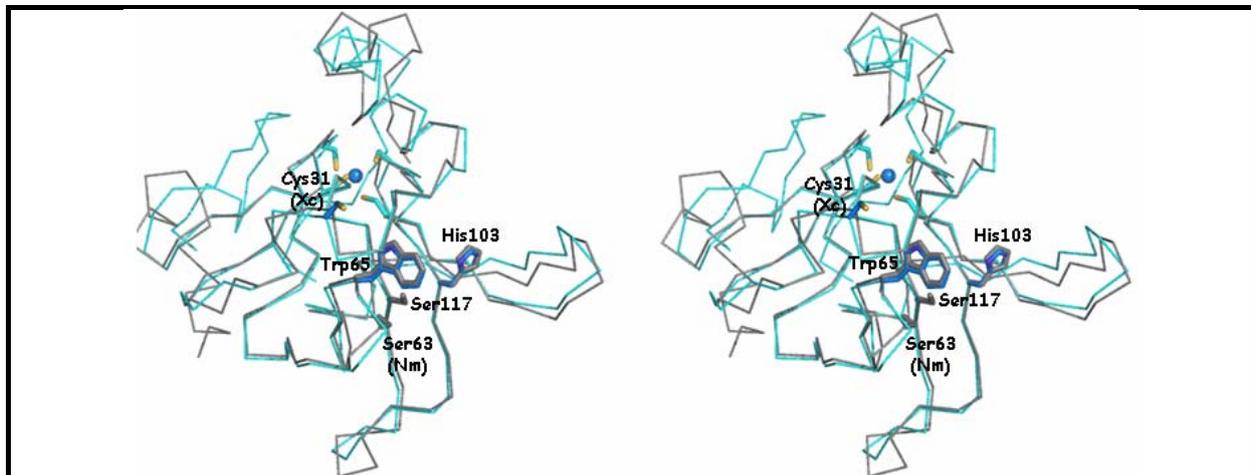


Figure 10 Superposition entre la MsrB de *X. campestris* (gris) sous sa forme complexée avec le substrat (monomère A) et la MsrB de *N. meningitidis* également complexée au substrat (monomère A, cyan).

Les traces C α des deux structures sont représentées, ainsi que quelques résidus en mode sphères et bâtons. Cys117 a été mutée en Ser pour la préparation des complexes; Cys63 est présent uniquement chez *N. meningitidis*, Cys31 uniquement chez *X. campestris*.

Contrairement à la MsrB de *N. meningitidis*, la MsrB de *X. campestris* fixe un cation Zn^{2+} par le biais de deux motifs CXXC impliquant Cys45, Cys48, Cys94 et Cys97. Il est tout à fait remarquable que cette différence de propriété n'ait pas de conséquence sur le repliement observé dans cette région (Figure 11). Que ce soit dans la structure de l'enzyme de *N.*

meningitidis ou dans celle de *X. campestris*, la région en question correspond aux coudes reliant le brin $\beta 1$ à $\beta 2$, d'un côté et celui reliant $\beta 6$ à $\beta 9$ de l'autre, conduisant les deux feuillets β à venir l'un au contact de l'autre, comme une sorte de "point de convergence" dans le cœur de la protéine. Dans cette région du repliement, les MsrB présentent une homologie avec d'autres protéines contenant un Zn^{2+} à rôle structural, comme la protéine Mss4, un facteur d'échange entre GDP et GTP, impliqué dans la régulation de la protéine G Ras (code PDB : 1HXR, (Zhu *et al.* 2001)). C'est ainsi qu'une recherche de voisins structuraux avec DALI fait ressortir la Mss4 parmi les protéines structurellement proches. Cette zone de fixation de Zn^{2+} est éloignée du site actif, dans une partie opposée à ce dernier dans la structure tertiaire (voir Figure 10 et Figure 12).

		Domaine MsrB de <i>N. meningitidis</i> en complexe avec le substrat	
		A	B
MsrB de <i>X. campestris</i> en complexe avec le substrat	A	1.004 Å 121 C α	0.888 Å 117 C α
	B	0.936 Å 116 C α	0.884 Å 115 C α

Tableau 5 R.m.s.d (Å) obtenus en superposant (voir Tableau 1) les atomes de carbone C α de l'un des deux monomères A ou B contenus dans l'unité asymétrique du cristal de la MsrB de *X. campestris* en complexe avec le substrat, à ceux de l'un des deux monomères A ou B contenu dans l'unité asymétrique du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* en complexe avec le substrat.
Le nombre d'atomes C α superposés est indiqué dans chaque cas.

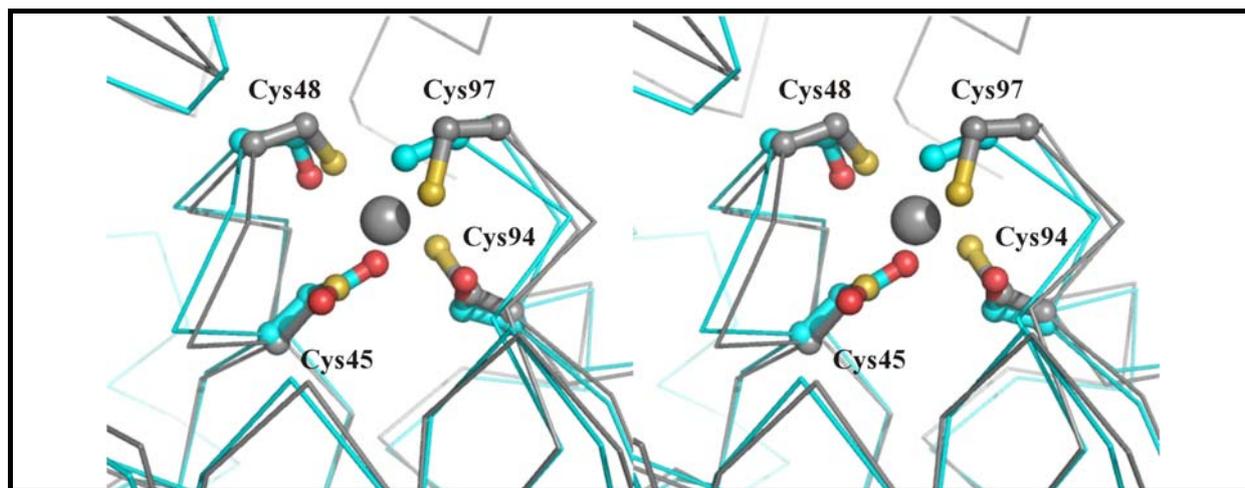


Figure 11 Vue détaillée de la superposition de la MsrB de *X. campestris* (gris) et de la MsrB de *N. meningitidis* (cyan), dans la région du cation Zn^{2+} . Chez *N. meningitidis*, Cys45 est un résidu Asp, Cys48 est une Ser de même que Cys94, et Cys97 est une Ala.

La conformation du site actif est ici la même que celle observée dans les différentes structures de la MsrB de *N. meningitidis*. Néanmoins, dans cette structure, si Cys117 a été

substitué en sérine, Cys31 est toujours présent, et il a réagi pour former un pont disulfure inter-moléculaire. Ainsi, Cys31 du monomère A d'une unité asymétrique forme un pont disulfure avec Cys31 du monomère B d'une unité asymétrique voisine. Cette liaison ne semble pas avoir d'influence sur la structure globale, puisque Cys31 présente une position tout à fait similaire à celle de la sérine équivalente dans la structure du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis*. En revanche, contrairement au cas de la MsrB de *N. meningitidis* (où le pont disulfure inter-moléculaire entre les deux cystéines de recyclage positionnait les deux sites actifs face à face et avait conduit à cristalliser la structure du double mutant C117S/C63S pour l'étude du complexe), ici le pont disulfure est associé à une interface entre monomères éloignée du site actif, de sorte que l'association avec le substrat observée n'implique pas de contacts dus à l'empilement cristallin (voir ci-après).

2.2.2. Interactions au sein du site actif

Les interactions observées au sein du site actif mettent en jeu des espèces différentes suivant le monomère considéré. Alors que le site actif du monomère A stabilise le substrat, celui du monomère B est en interaction avec une boucle du monomère A (Figure 12).

Le substrat fixé ici est moins bien défini en densité que dans le cas de la MsrB de *N. meningitidis*, mais on distingue néanmoins sa conformation globale, et il est possible de décrire les interactions qu'il établit avec les résidus du site actif (Figure 13). Les résidus impliqués et le type d'interactions établies sont les mêmes que dans le cas de *N. meningitidis*, à savoir (i) deux liaisons hydrogène établies par l'oxygène du sulfoxyde, avec l'atome N δ 1 du résidu His103 et une molécule d'eau stabilisée par le triplet (His100, Asn119, Thr26), (ii) une interaction hydrophobe du méthyle ϵ et du méthylène γ avec le noyau indole de Trp65 et (iii) une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène carbonyle de la chaîne principale du résidu MetSO et l'atome N η 1 du résidu Arg89. Arg115 n'est pas impliquée, dans ce cas, dans les interactions avec le substrat : le groupement acétyle ("résidu" précédant le résidu MetSO) est, ici orienté différemment que dans le cas de *N. meningitidis*, plus proche de Arg89, et positionnant sa fonction carbonyle à distance de liaison hydrogène de la chaîne latérale de Thr26 (3.1 Å entre les deux oxygènes).

Les résidus du site actif du monomère B, quant à eux, sont en interaction avec une boucle du monomère A (Figure 12), d'une manière qui fait penser à la structure de la forme réduite de la MsrB de *N. meningitidis* (voir paragraphe 1.2.2). Cependant, la boucle mise en

jeu, ici, est celle qui connecte les brins $\beta 7$ et $\beta 8$ et non plus celle qui connecte $\beta 5$ et $\beta 6$. Dans la séquence de la MsrB de *X. campestris*, cette boucle est constituée de trois résidus proline successifs (Pro109, Pro110 et Pro111), et Pro111 y est en configuration *cis*. Le résidu qui pénètre dans le site actif est Pro110, ses atomes $C\beta$ et $C\gamma$ étant en collapse hydrophobe avec la chaîne latérale de Trp65. Toutefois, comme ce résidu, par nature, ne contient pas d'atome d'oxygène dans sa chaîne latérale, une entité additionnelle vient occuper la zone hydrophile du site actif, en interaction avec His103 et la molécule d'eau invariante. Les cartes de densité électronique indiquent que c'est une espèce plus riche en électrons qu'un oxygène, et qui pourrait bien correspondre à un ion calcium issu du milieu de cristallisation.

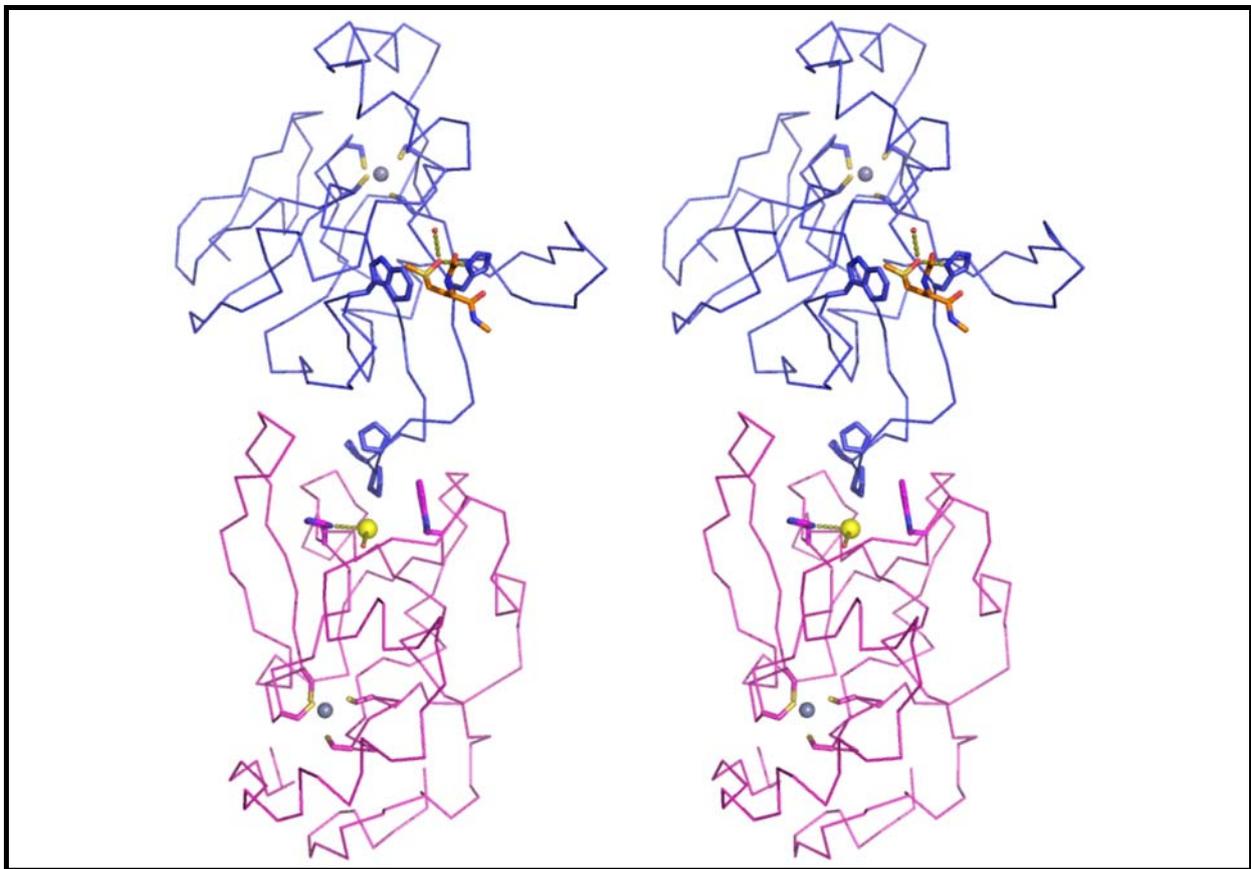


Figure 12

Représentation stéréo des traces $C\alpha$ des monomères A (bleu) et B (violet) contenus dans l'unité asymétrique de la structure du mutant C117S de la MsrB de *X. campestris* en complexe avec le substrat.

Une molécule de substrat (en orange) est fixée dans le site actif du monomère A dont les résidus Trp65 et His103 sont représentés. L'extrémité de la boucle $\beta 7$ - $\beta 8$ du monomère A, comportant trois résidus proline successifs, interagit avec le site actif du monomère B qui contient par ailleurs une espèce correspondant probablement à un ion calcium (en jaune).

Enfin, il est à rappeler que le résidu cystéine Cys31 se positionne très similairement à son équivalent Ser31 dans la MsrB de *N. meningitidis* et ce, malgré son engagement dans un pont disulfure intermoléculaire. Il s'ensuit une distance entre Cys117 et Cys31 voisine de 13.5

Å (distance entre atomes de soufre), incompatible avec la formation d'un pont disulfure entre ces deux résidus, d'autant que la chaîne latérale de Trp65 sépare ces deux protagonistes (Figure 10).

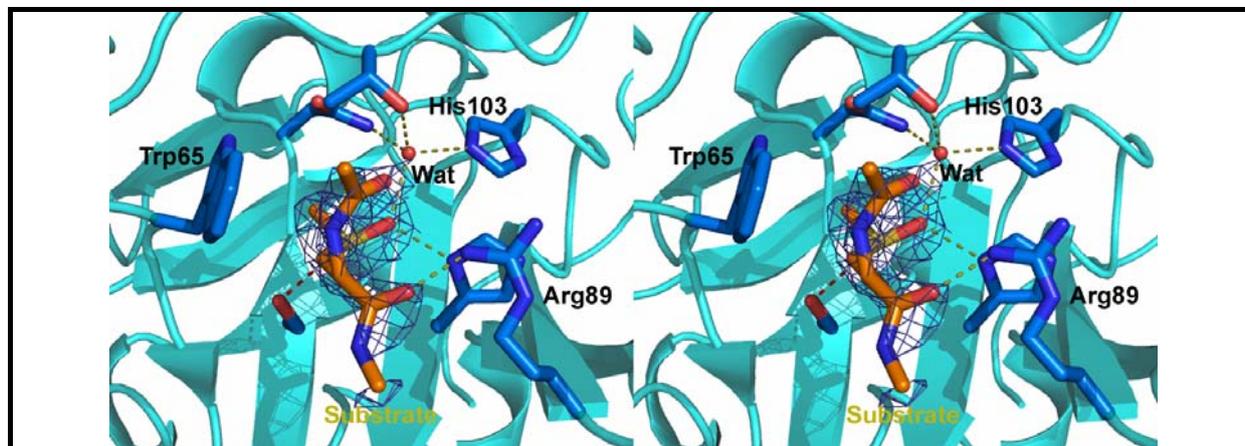


Figure 13 Vue stéréo détaillée du site actif de la MsrB de *X. campestris* (monomère A, en bleu) en complexe avec le substrat (en orange), superposé à la carte de densité électronique de type 2Fo-Fc correspondante (contourée à 0.8 σ).

2.3. La structure de la forme oxydée

2.3.1. Le repliement global et le pont disulfure

Chez *X. campestris*, la présence du pont disulfure Cys31-Cys117 est associée à un remaniement important dans le repliement (Tableau 6 et Figure 14).

		MsrB de <i>X. campestris</i> sous forme oxydée	
		A	B
MsrB de <i>X. campestris</i> en complexe avec le substrat	A	0.945 Å 108 C α	0.875 Å 103 C α
	B	0.806 Å 105 C α	0.864 Å 106 C α

Tableau 6 r.m.s.d (Å) obtenus en superposant (voir Tableau 1) les atomes de carbone C α de l'un des deux monomères A ou B contenus dans l'unité asymétrique du cristal de la MsrB de *X. campestris* sous forme oxydée à ceux de l'un des deux monomères A ou B contenu dans l'unité asymétrique de la protéine en complexe avec le substrat. Le nombre d'atomes C α superposés est indiqué dans chaque cas.

En effet, les deux feuillets β de cœur ne sont plus constitués de 3 et 6 brins comme dans toutes les structures décrites jusqu'ici, mais de 4 et 4 brins, respectivement (Figure 14).

Ainsi, le fragment allant de Ser55 à Pro71, qui se repliait de façon à former les deux petits brins β_3 (Lys58-Phe59)* et β_4 (Ser67-Phe68) à l'extrémité du feuillet à 6 brins, se replie différemment dans la forme oxydée : il forme un unique brin β_3' (Phe69-Pro71) qui n'a pas d'équivalent spatial dans les structures précédentes. Il s'ensuit une numérotation des brins qui, pour rester cohérente à celle introduite pour la structure originale, ne comporte plus de brin β_4 .

Cette restructuration de la zone Ser55-Pro71 s'accompagne du réarrangement du fragment His24-Asp40 contenant Cys31. En effet, la chaîne principale de Cys117 n'ayant pas été modifiée, la formation du pont disulfure a nécessité le rapprochement de Cys31, qui se trouvait à 13.5 Å de Cys117 dans le complexe avec le substrat (voir paragraphe précédent). De façon imagée, ces changements de conformation peuvent être vus comme un double mouvement, avec d'une part la boucle contenant Trp65 qui se retire, et d'autre part la boucle contenant Cys31 qui se rapproche de Cys117 (également visible sur la Figure 15).

Par ailleurs, les structures des deux monomères de l'unité asymétrique sont relativement similaires mis à part la boucle β_5 - β_6 . Dans le cas du monomère A, cette boucle paraît "écrasée" par l'empilement cristallin (du fait d'un contact avec un voisin symétrique) de sorte que le coude β et certaines des liaisons hydrogène entre les deux brins sont rompus ; ces deux brins sont, de fait, plus courts, respectivement de deux et un résidu, que dans le monomère B (β_4 : Val77-Ile80 dans A, Val77-Asp82 dans B; β_5 : Thr90-Cys94 dans A, Arg89-Cys94 dans B).

La situation des deux résidus cystéine impliqués dans la catalyse diffère également entre les deux monomères. Dans les deux cas, le pont disulfure est manifestement présent sous deux conformations, dues à deux positions différentes prises par le Sy de Cys31. Mais dans le monomère A, en addition de cela, le Sy de Cys117 prend également deux positions distinctes ; l'examen des cartes de densité électronique laisse penser que cela correspond à une fraction des deux résidus Cys non liés covalamment. L'exposition aux rayons X a vraisemblablement rompu partiellement le pont disulfure dans le monomère A.

* L'assignation des structures secondaires a été réalisée en utilisant le programme DSSP (Kabsch et Sander 1983); une portion de séquence est considérée former un brin β lorsque le programme DSSP l'assigne "E".

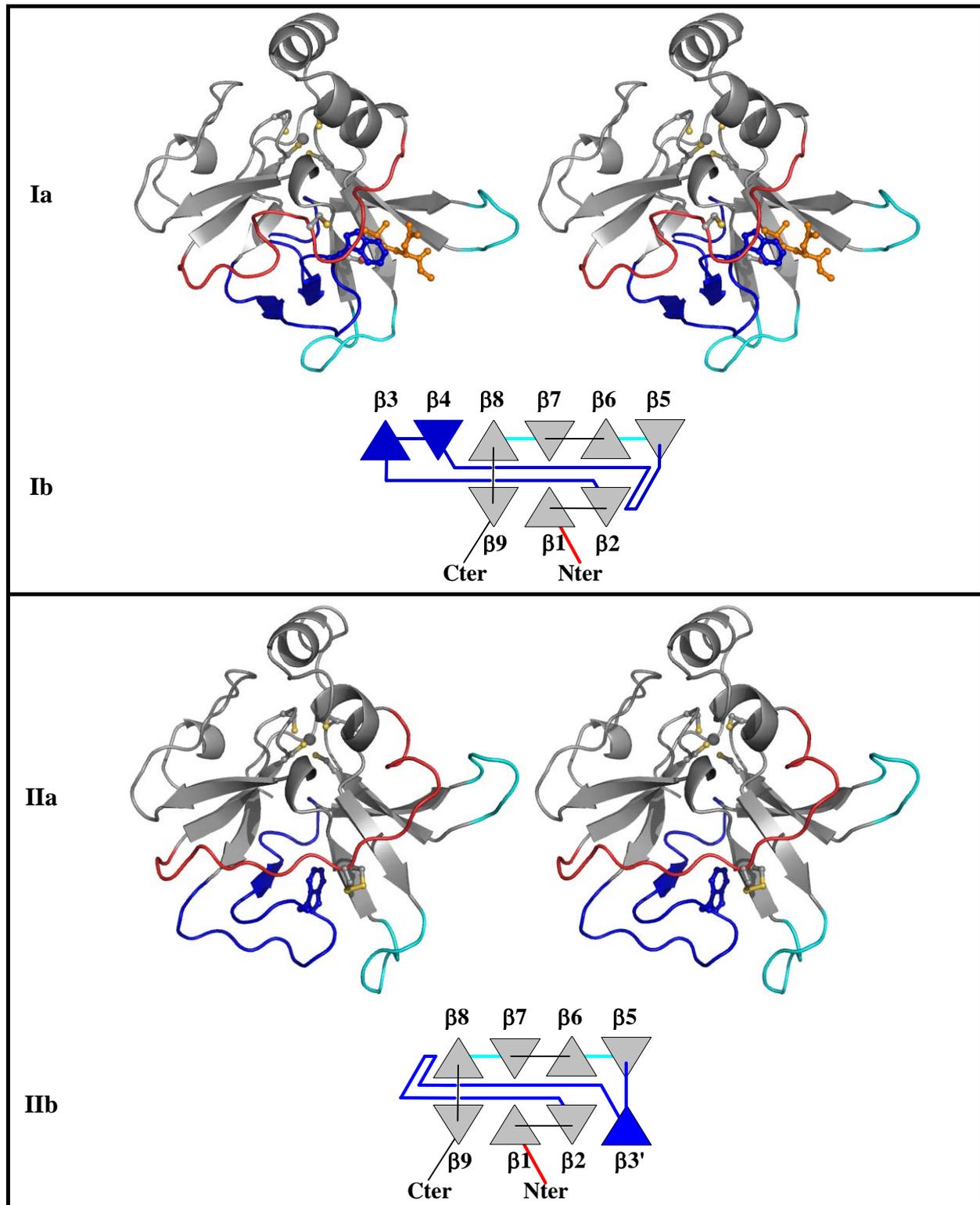


Figure 14

Représentations en flèches et rubans (a) de la MsrB de *X. campestris* en complexe avec le substrat (I) et sous forme oxydée (II), accompagnées de schémas topologiques des feuillets β de cœur (b), avec mise en évidence des différences structurales mettant en cause les deux cystéines impliquées dans la catalyse.

Les boucles représentées en rouge (contenant Cys31) et en bleu (contenant Trp65) subissent des restructurations majeures qui pourraient être à l'origine des réarrangements observés au niveau des boucles $\beta 5$ - $\beta 6$ et $\beta 7$ - $\beta 8$ (cyan). Dans (Ia), le substrat est représenté en orange.

2.3.2. Conformation du site actif comparativement à la structure du complexe MsrB-substrat

Le nouveau positionnement de Trp65, et plus généralement de celui pris par le fragment Ser55-Pro71 dans sa globalité, apporte une différence conséquente dans la forme des sites actifs des deux formes de la MsrB de *X. campestris*. Au lieu de l'invagination relativement étroite formée dans le complexe avec le substrat (ou dans la MsrB de *N. meningitidis*), on observe une surface ouverte très exposée (Figure 15) dans le cas de la forme oxydée de la MsrB de *X. campestris*.

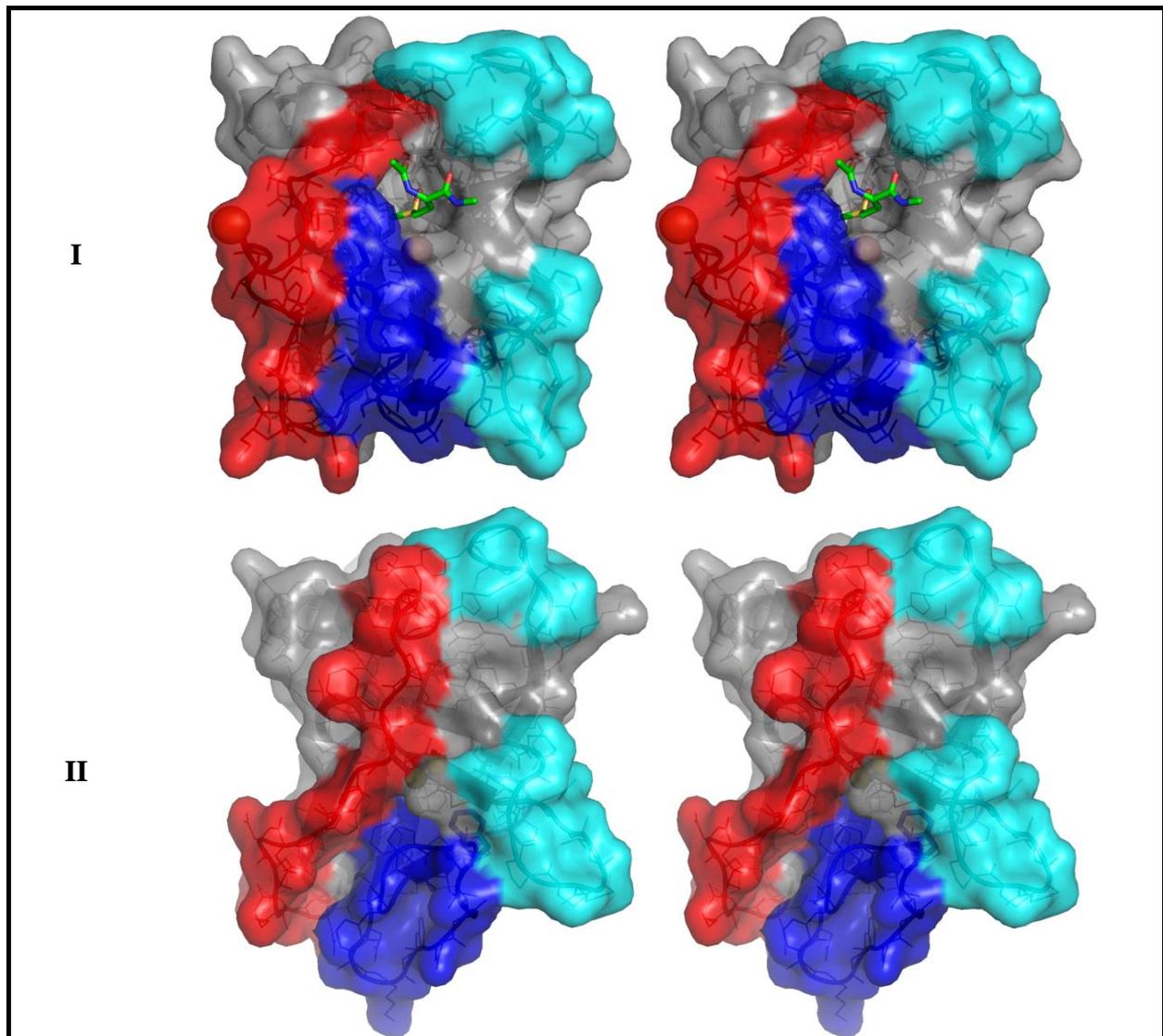


Figure 15

Comparaison des surfaces moléculaires de la MsrB de *X. campestris* en complexe avec le substrat (représenté en vert) (I) et sous forme oxydée (II).

Le code couleur est identique à celui de la Figure 14. L'orientation a été choisie de manière à rendre visible la poche formée par le site actif, elle diffère donc de celle des autres figures. Les sphères représentent à gauche l'atome S de Cys31, et à droite l'atome O de Ser117 (I) ou l'atome S de Cys117 (II).

Dans la structure de la MsrB de *X. campestris* en complexe avec le substrat (ainsi que chez *N. meningitidis*), dans l'espace entre Cys117 et Cys31 (ou Ser31) se trouve notamment le noyau indole de Trp65, de sorte que l'établissement d'un pont disulfure entre ces deux positions n'est envisageable que si ce résidu est susceptible d'être déplacé. C'est ainsi que dans la forme oxydée de la MsrB de *X. campestris*, le nouveau repliement du fragment Ser55-Pro71 (voir paragraphe précédent) s'accompagne d'un positionnement très différent de Trp65 : au lieu de former un côté du site actif et constituer la face hydrophobe qui interagit avec le substrat tel que décrit précédemment (paragraphe 1.3.2), il se trouve enfoui dans le cœur de la protéine, sa chaîne latérale pointant vers la face intérieure du brin β 7, au contraire de la situation observée dans le complexe avec le substrat ou chez *N. meningitidis*. Le restant des deux conformations de site actif est comparable, à l'instar de His103 représenté sur la Figure 16.

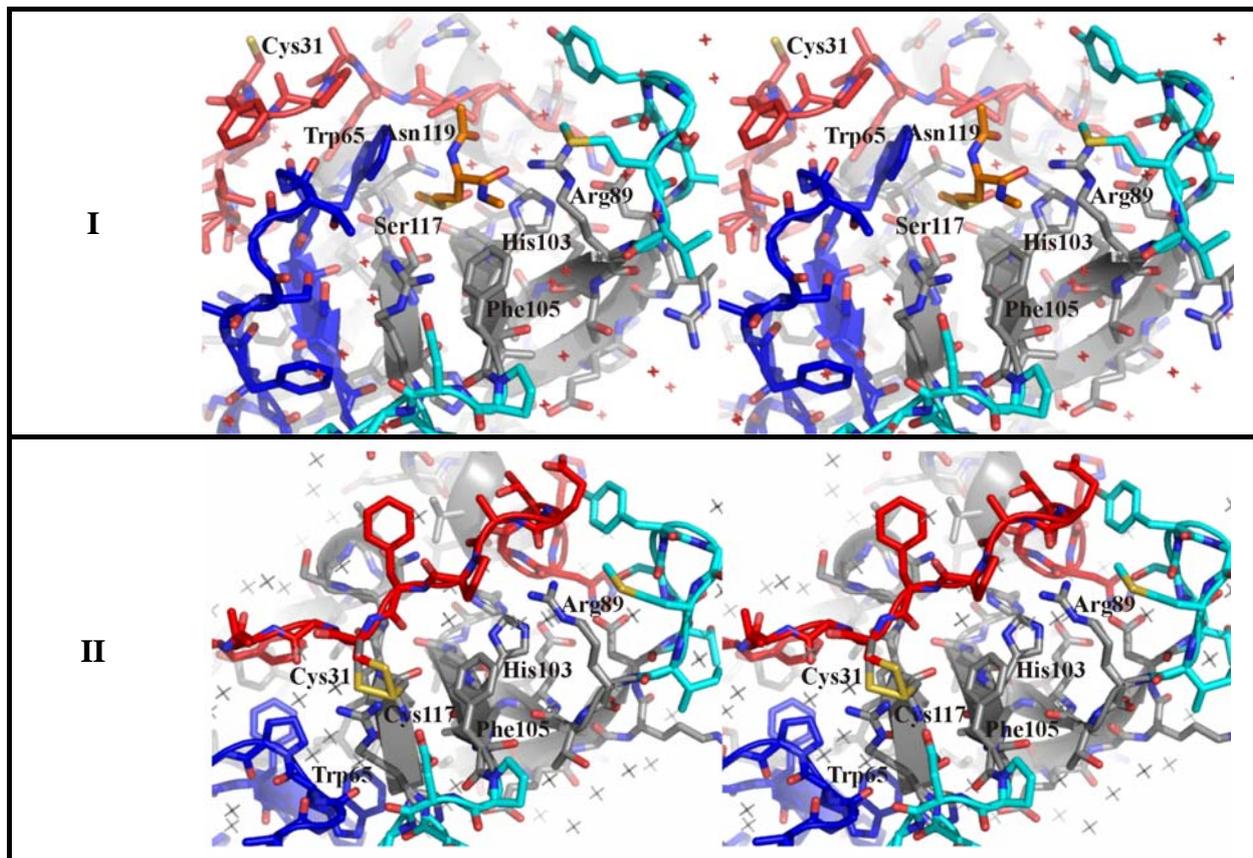


Figure 16 Comparaison des sites actifs de la MsrB de *X. campestris* sous forme de complexe avec le substrat (I) ou sous forme oxydée (II). Le code couleur est identique à celui de la Figure 14. Dans (I), Cys117 a été muté en Ser, et le substrat est représenté en bâtons orange. Dans (II), le pont disulfure Cys31-Cys117 est observé sous deux conformations. Trp65 (en bleu), en interaction avec le substrat dans (I), est rejeté loin du site actif dans (II).

3. Discussion : analyse des structures en regard du mécanisme catalytique

D'une manière similaire au cas de la MsrA, les différentes structures de MsrB décrites ci-dessus vont pouvoir être discutées en regard du mécanisme catalytique, dans la mesure où les résultats obtenus permettent de "retracer", d'une certaine manière, les premiers événements de l'acte catalytique.

En effet, dans le cas de l'enzyme de *N. meningitidis*, ont été décrites les structures de :

- la forme réduite, présentant notamment des résidus cystéine *a priori* bien positionnés pour former le pont disulfure nécessaire pour la régénération de l'activité après l'étape réductase ;

- le complexe de type michaelien avec le substrat Ac-Met-R-SO-NHMe (mutant C63S/C117S) à comparer avec la molécule de cacodylate fixée dans le site actif de l'enzyme de *N. gonorrhoeae*, et décrite par Lowther et collaborateur mimant le substrat fixé par l'enzyme (Lowther *et al.* 2002) ;

- la structure de la forme oxydée, confirmant en effet que peu de changements conformationnels ont lieu, dans ce cas, pour établir le pont disulfure, mais qui présente une espèce exogène interprétée comme étant une MetSO au sein de son site actif.

La MsrB de *X. campestris* quant à elle a donné lieu à deux structures :

- celle du complexe avec le substrat à partir du mutant C117S, dont les caractéristiques structurales sont à comparer avec le même type de complexe obtenu avec l'enzyme de *N. meningitidis* ;

- celle de la forme oxydée, dans laquelle la présence du pont disulfure intramoléculaire révèle la nature et l'ampleur du changement conformationnel sous-jacent à la présence d'une cystéine de recyclage en position 31 au lieu de la position 63, comme c'est le cas chez *N. meningitidis*.

L'analyse effectuée alors prend en considération les différents résultats enzymologiques et structuraux acquis auparavant, et décrits dans la partie A, paragraphes 3.5 et 3.6.4.

3.1. Le repliement MsrB

Si l'on devait définir un repliement de référence pour les MsrB, ce serait celui révélé par les structures cristallographiques du domaine MsrB de PilB de *Neisseria*, observé à la fois chez *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.* 2002) et chez *N. meningitidis* ((Kauffmann *et al.* 2002) et résultats à publier). Dans les quatre structures de MsrB de *Neisseria*, (formes réduites des deux espèces, ainsi que les formes oxydée et en complexe avec le substrat de *N. meningitidis*), ce repliement est conservé, et il est également observé chez *X. campestris* dans le cas du complexe avec le substrat. Cependant, dans tous ces cas, le site actif est en interaction avec une espèce exogène et les interactions observées, de nature similaire, reflètent au moins en partie l'association de l'enzyme avec le substrat, comme le confirment les structures des complexes. Aussi, il semble que dans ce repliement de référence, la conformation du site actif lui confère une propension naturelle à interagir avec une espèce externe, ce qui est certainement la manifestation d'une stabilisation de la structure due à la fixation du substrat. En ce sens, il paraît inadéquat de dénommer "forme réduite" l'une de ces structures cristallographiques, si l'on considère que sous une telle forme la protéine est à son état initial dans le mécanisme catalytique, c'est-à-dire avant l'association avec le substrat. Comme il apparaît que le repliement des MsrB est intrinsèquement malléable – tel qu'illustré par les deux conformations adoptées par la MsrB de *X. campestris* – il serait envisageable que certains détails de la structure de l'enzyme à son état initial diffèrent de ceux observés dans ces structures cristallographiques.

Une structure de MsrB en solution a été récemment obtenue par RMN, celle de *Bacillus subtilis* (code PDB : 1XM0, Zheng *et al.* ^{*}). Dans la mesure où aucune espèce n'y est présente dans le site actif et que la méthode permet de s'affranchir des contacts dus à un empilement cristallin, celle-ci serait plus révélatrice d'une "forme réduite" libre. Une comparaison entre cette structure (10 modèles) et celle de la MsrB de *N. meningitidis* (Figure 17) montre de larges différences au niveau des boucles, qui, sur l'ensemble des conformations observées, apparaissent extrêmement flexibles. En particulier, l'extrémité N-terminale (portant le résidu Thr26 appartenant au site actif), la boucle $\beta 2$ - $\beta 3$ (contenant Cys63 et Trp65) et, dans une moindre mesure, la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ confèrent au site actif une conformation beaucoup plus

^{*} Zheng, D., Cort, J.R., Swapna, G.V.T., Aramini, J., Chiang, Y., Acton, T., Kennedy, M.A., Montelione, G.T. "Solution NMR Structure of Methionine Sulfoxide Reductase B Using Minimal Constraint Strategy; Northeast Structural Genomics Target SR10" To be Published.

ouverte. Trp65, crucial pour la fixation du substrat, est alors dans une position très éloignée de celle observée chez *N. meningitidis*.

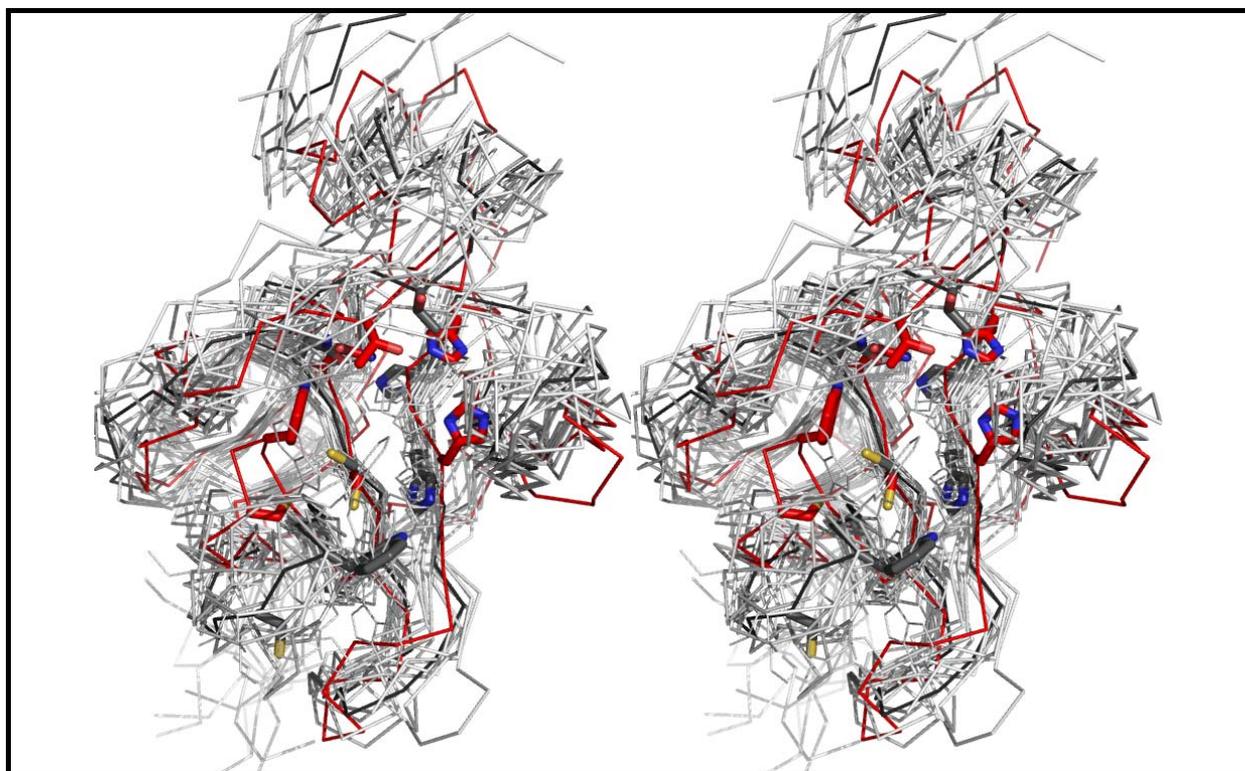


Figure 17

Représentation stéréo montrant les traces C α des structures globales superposées du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* (en rouge) et de la MsrB de *Bacillus subtilis* (en gris).

Dans ce dernier cas, 10 modèles issus de l'étude RMN sont représentés (gris clair), de même que la structure moyenne affinée (gris foncé).

3.2. Interactions entre le substrat et les résidus du site actif

Dans le site actif des structures en complexe avec le substrat (voir paragraphes 1.3.2 et 2.2.2), l'analyse de la stabilisation de la fonction sulfoxyde conduit aux mêmes types de conclusions que celles faites avec la MsrA (voir section III, paragraphe 1.3) : le substrat se positionne d'une manière optimale pour une attaque nucléophile par la cystéine catalytique Cys117 sur le soufre du sulfoxyde. En effet, en remplaçant juste l'hydroxyle en γ de Ser117 par un thiol dans les structures de complexes, l'atome S γ se positionnerait selon l'axe S-O, dans une position opposée à l'oxygène. Du reste, le site actif ainsi organisé convient pour une

interaction et une réaction avec le stéréoisomère *R*-sulfoxyde ; l'isomère *S* aboutirait à une association non optimale pour l'acte catalytique.

D'après les résultats obtenus par l'équipe du Professeur Guy Branlant sur des mutants de substitution des résidus impliqués dans les interactions avec le substrat, Trp65 est déterminant pour la reconnaissance du substrat, ce qui est révélé notamment avec des affinités apparentes de mutants Trp65Ala et Trp65Phe extrêmement réduites en comparaison de l'enzyme sauvage. Il est à noter que le caractère aromatique de ce résidu paraît important dans cette propriété, puisque l'effet de la substitution en Phe est moins drastique que celui de la substitution en Ala (Neiers *et al.* 2007). His103 semble non essentielle pour l'affinité avec le substrat, mais serait plutôt impliquée dans l'acte catalytique, et ceci d'une manière dépendant du pH ; un pKa apparent de 8.3 a ainsi été attribué à ce résidu. Aussi, la liaison hydrogène observée entre His103 et l'oxygène du sulfoxyde dans les structures de complexes serait la manifestation d'un rôle d'assistance acide-base effectué par His103 dans l'étape réductase. L'ensemble des données semblent donc désigner His103 comme la chaîne latérale qui transférerait un proton à l'oxygène du sulfoxyde lors de la première attaque nucléophile (voir la Figure 19 présentant le mécanisme dans la partie Introduction, page 42). En outre, il a été mis en évidence que, comme dans le cas de la cystéine catalytique Cys51 de la MsrA, l'activation nécessaire de Cys117 pour l'attaque nucléophile est sous la dépendance de la fixation du substrat (le pKa apparent attribué à Cys117 dans l'enzyme libre est voisin de 9.3 alors qu'il serait de 6.6 en présence du substrat) et vraisemblablement de la même manière, en mettant à contribution la charge partiellement positive sur l'atome de soufre. Une hypothèse probable est que la fixation du substrat s'accompagne d'un départ du proton de Cys117 qui se retrouverait alors lié à l'oxygène du sulfoxyde, suivant un processus concerté et assisté par His103.

La substitution de His100, Thr26 ou Asn119 en Ala a également un effet sur les paramètres cinétiques de l'étape réductase, mais, comme pour His103, essentiellement sur la constante de vitesse et non sur l'affinité apparente avec le substrat, (Neiers *et al.* 2007). Ceci confirme l'importance dans la catalyse de la molécule d'eau stabilisée par ces trois résidus, toujours observée dans les structures cristallographiques.

Ainsi, en ce qui concerne la fonction sulfoxyde et l'étape réductase, la prise en compte globale des données structurales et enzymologiques permet de préciser le rôle des deux zones hydrophobe et hydrophile du site actif. D'un côté, Trp65 a un rôle essentiel dans la reconnaissance du substrat ; il servirait à positionner le substrat d'une manière optimale pour l'attaque nucléophile réalisée par Cys117, de par le collapse hydrophobe qu'il forme avec le

méthyle ϵ et le méthylène γ de la chaîne latérale, additionné à une interaction électrostatique entre le nuage π du noyau indole et la charge positive fortement prononcée sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde. D'autre part, His103, et indirectement (par le biais d'une molécule d'eau) His100, Asn119 et Thr26 sont utiles pour la catalyse, vraisemblablement en stabilisant l'état de transition de type sulfurane, avec, en addition, un rôle de catalyseur acide-base pour His103.

Par ailleurs, en ce qui concerne les interactions entre l'enzyme et la chaîne principale du substrat, les structures des complexes inactifs révèlent une implication des deux résidus Arg89 et Arg115 (voir paragraphes 1.3.2 et 2.2.2). Le fait d'observer deux conformations du substrat dans un monomère de l'enzyme de *N. meningitidis*, et de révéler une interaction avec Arg115 uniquement avec un conformère est sans doute révélateur de la capacité qu'a l'enzyme d'interagir naturellement avec diverses protéines oxydées. Il est à noter que l'observation de la structure issue de *N. gonorrhoeae* avait conduit Lowther et collaborateurs à envisager un rôle pour Arg115 dans l'activation de Cys117 au sein d'une triade Cys117-Arg115-Asp107 (Lowther *et al.* 2002). Au vu des structures des complexes, une substitution de l'un et/ou l'autre de ces deux résidus Arg par une Ala a été effectuée dans l'enzyme de *N. meningitidis*, mais il s'est avéré que les mutations n'affectent pas de manière substantielle les paramètres cinétiques mesurés (Neiers, 2007). Ainsi, bien qu'ils soient conservés au sein des MsrB, ces deux résidus ne semblent pas nécessaires dans la reconnaissance avec le substrat (ni, du reste, dans l'activation de Cys117), soit parce que les interactions observées s'établissent d'une manière fortuite, soit parce qu'en leur absence, d'autres résidus non identifiés lors de ces travaux sont mis à contribution. Ainsi, les structures résolues ici ne permettent pas de donner une explication claire de l'observation selon laquelle l'enzyme a une meilleure affinité pour un substrat intégré dans un polypeptide en comparaison avec l'acide aminé libre (Olry *et al.* 2002). Il est probable que les charges portées par les groupements ammonium et carboxylate de l'acide aminé libre affectent l'interaction avec Trp65 et conduisent ainsi à une fixation non optimale du substrat, et donc à une diminution de l'efficacité catalytique. Une meilleure résolution que la valeur de 3.0 Å obtenue pour la structure de la forme oxydée de la MsrB de *N. meningitidis* (qui contiendrait une MetSO libre dans son site actif) aurait pu donner des éléments de réponse confirmant ou infirmant cette hypothèse. En effet, des procédures d'affinement supplémentaires ne permettront sans doute pas d'obtenir une bien meilleure définition de la position de cette espèce présente dans le site actif (voir paragraphe 1.4.2).

3.3. Formation du pont disulfure

Le repliement du domaine MsrB des *Neisseria* positionne le résidu cystéine catalytique Cys117 et la cystéine de recyclage Cys63 suffisamment proches l'un de l'autre pour la formation du pont disulfure, de sorte qu'aucune modification de la structure globale n'est observée dans la forme oxydée de la MsrB de *N. meningitidis*, comparativement à la forme dite réduite. Dans le cas de la structure en solution de la MsrB de *B. subtilis* (qui contient également sa cystéine de recyclage en position 63), la conformation plus ouverte du site actif (voir paragraphe 3.1) conduit à une distance plus élevée entre ses deux résidus cystéine : il y a 12.6 Å entre les S γ dans la structure moyenne de *B. subtilis* (de 9.6 à 15.0 Å selon les modèles analysés), au lieu de 3.5 Å environ dans celle de *N. meningitidis* (de 2.8 à 4.4 Å selon les monomères de l'unité asymétrique, voir paragraphe 1.2.2). Dans le déroulement du mécanisme catalytique, la formation du pont disulfure est un événement qui se déroule après la fixation et la réduction du substrat (étape réductase). Aussi, ayant admis que la structure issue de *B. subtilis* représente plus justement la forme réduite, et celle de *N. meningitidis* la forme en association avec le substrat (paragraphe 3.1), la comparaison entre ces deux structures amène à considérer que la fixation du substrat est associée à un rapprochement entre les deux résidus Cys117 et Cys63 de sorte que, pendant le déroulement de l'étape réductase, ils prennent d'ores et déjà une position adéquate pour l'étape suivante, celle de la formation du pont disulfure.

Dans le cas de la MsrB de *X. campestris*, le scénario proposé ci-dessus n'est plus valable, puisque d'après la structure du complexe avec le substrat, les deux résidus cystéine intervenant dans la catalyse seraient éloignés l'un de l'autre. En effet, si l'on y substituait Ser117 en Cys, et en admettant que sans le pont disulfure inter-moléculaire observé (voir paragraphe 2.2.1), Cys31 conserve la même position dans la structure globale, la distance entre les deux S γ serait voisine de 14 Å. Manifestement, le rapprochement entre les deux cystéines se déroule après la fixation du substrat. Comme Trp65 doit nécessairement changer de position lors du rapprochement entre ces deux résidus (voir paragraphe 2.3.1), et que ce résidu semble crucial dans le déroulement de l'étape réductase, le rapprochement entre Cys31 et Cys117 doit certainement se dérouler à la fin de cette étape, voire au-delà, après le relargage du produit. En outre, la réduction du substrat aboutit à l'oxydation de Cys117 en acide sulfénique ; il est possible que l'apparition de cette espèce apporte une perturbation au

niveau du site actif, de nature à rapprocher les deux cystéines afin qu'elles réagissent entre elles, d'une manière qui reste à être précisée.

Il est intéressant de constater que, malgré les deux comportements structuraux différents notés ci-dessus entre une MsrB ayant sa cystéine de recyclage en 63 et une autre ayant sa cystéine de recyclage en position 31, les paramètres cinétiques sont similaires. En effet, dans les premiers événements du mécanisme des deux MsrB issues de *N. meningitidis* et *X. campestris*, la formation du pont disulfure est limitée par l'étape réductase (Neiers *et al.* 2004 ; Olry *et al.* 2004). Il est possible que cette propriété de l'enzyme de *X. campestris* soit imputable à la présence du Zn^{2+} , qui jouerait un rôle dans la stabilisation du repliement du cœur de la protéine, afin que les amples mouvements nécessaires pour former le pont disulfure 31-117, ne se répercutent pas sur les propriétés cinétiques de sa formation.

Les deux mutants Ser31Cys/Cys63Ser de la MsrB de *N. meningitidis* et Cys31Ser/Thr63Cys de la MsrB de *X. campestris* ont été étudiés en enzymologie (Neiers *et al.* 2004), afin de mettre en évidence les effets d'une interversion des positions de la cystéine de recyclage entre les deux enzymes sur les différentes étapes du mécanisme. Dans un souci de clarté, les notations nmMsrB₃₁ et xcMsrB₆₃ seront introduites pour désigner respectivement ces deux protéines mutantes. Dans tous les cas, les paramètres cinétiques des deux premières étapes sont comparables à ceux de l'enzyme sauvage, indiquant que Cys31 peut pallier l'absence de Cys63 et inversement, en ce qui concerne l'établissement du pont disulfure, même si les cystéines sont introduites artificiellement. Aussi, une possible implication de l'ion Zn^{2+} dans l'efficacité de la formation d'un pont disulfure Cys31-Cys117 n'est pas établie, puisque dans l'enzyme nmMsrB₃₁, cet ion n'est pas présent.

Par ailleurs, la nmMsrB₃₁ se comporte, d'un point de vue cinétique, similairement à la forme sauvage tout au long du cycle catalytique, au contraire de la xcMsrB₆₃ qui voit l'intervention de la thioredoxine compromise. Il semble que, dans ce cas, l'échange de pont disulfure avec la thioredoxine ne se fait plus aussi efficacement que dans l'enzyme sauvage, de sorte que le processus cinétiquement limitant n'est plus associé au relargage de la thioredoxine oxydée, mais à une étape en amont, c'est-à-dire une fixation adéquate de la thioredoxine réduite pour un échange de pont disulfure efficace. Or rien ne laisse penser que la disposition du pont disulfure Cys63-Cys117 soit différente dans la xcMsrB₆₃, comparativement à l'enzyme sauvage de *N. meningitidis*. Il semble alors que l'efficacité de l'intervention de la thioredoxine sur un pont disulfure Cys63-Cys117 nécessite des déterminants structuraux, en plus du pont disulfure en lui-même, qui la rendent efficace chez *N. meningitidis*, et non dans le mutant artificiel issu de *X. campestris*. L'intervention de l'ion

Zn²⁺ dans cette propriété semble peu probable étant donné sa position diamétralement opposée à la région de l'espace potentiellement occupée par le pont disulfure Cys63-Cys117 dans la structure globale. En comparaison, un pont disulfure Cys31-Cys117 est efficacement réduit par la thiorédoxine dans la nmMsrB₃₁. La structure de la forme oxydée de l'enzyme de *X. campestris* révèle un site actif très élargi comparativement aux autres structures, avec un pont disulfure Cys31-Cys117 beaucoup plus exposé que dans le cas de *Neisseria meningitidis* (voir paragraphe 2.3.2 et Figure 16). On peut supposer que cette accessibilité accrue rende plus aisée la reconnaissance et la réaction avec la thiorédoxine, et conduise à une efficacité inchangée d'un échange avec un pont disulfure Cys31-Cys117, que ce soit chez *X. campestris* ou chez *N. meningitidis*. Malheureusement, les structures étudiées lors de ces travaux ne permettent pas de préciser plus avant les aspects structuraux mis en jeu dans ces échanges de ponts disulfures, qui nécessitent certainement l'étude structurale de complexes entre une MsrB et la thiorédoxine.

Partie C

Bilan et perspectives

1. Relations Structure-Fonction au sein des Msr de types A et B

La protéine PilB de *N. meningitidis* a été retenue comme source de MsrA et MsrB en vue de l'analyse du mécanisme catalytique de ces deux classes de méthionine sulfoxyde réductases. Les structures cristallographiques de quatre formes de la partie MsrA de PilB ont été établies, pour l'enzyme réduit, un complexe de type michaelien avec le substrat, une forme présentant un acide sulfénique au niveau de la cystéine catalytique CysA, et une forme oxydée. Avec l'appui des expériences d'enzymologie moléculaire menées par l'équipe du Professeur Guy Branlant au MAEM, elles contribuent à retracer pour partie le déroulement de l'acte catalytique (voir la discussion de la partie B, section III). Un travail similaire a été mené sur le domaine MsrB de PilB, sans toutefois parvenir à obtenir la structure de la forme acide sulfénique de CysA. Trois structures ont donc été déterminées, pour la forme réduite, le complexe de type michaelien avec le substrat, et la forme oxydée. Les séquences des MsrB présentant une grande variabilité dans la position de la cystéine de recyclage, il était intéressant d'effectuer un travail comparatif avec une MsrB possédant le résidu CysB nettement déplacé. L'enzyme de *X. campestris* a ainsi été exploré, avec l'établissement des structures de la forme complexée avec le substrat et de la forme oxydée. L'ensemble de ces résultats permet lui aussi la discussion du mécanisme catalytique, cette fois pour les Msr de type B (voir partie B, section IV).

L'analyse des structures déterminées, couplée aux résultats de l'équipe d'Enzymologie du MAEM, a contribué à la connaissance plus ou moins fine des différentes étapes du mécanisme enzymatique de ces trois Msr et plus généralement des sous-classes de Msr auxquelles elles appartiennent, une partie des résultats étant probablement généralisable au-delà avec l'appui de l'ensemble des structures déterminées à ce jour chez les Msr. Ainsi, parmi les trois étapes majeures du cycle catalytique (1-étape réductase, 2-formation du (des) pont(s) disulfure(s) intra-moléculaire(s) et 3-échange de ponts disulfures avec le partenaire du type Trx), les éléments structuraux intervenant dans la première étape sont le mieux caractérisés, en partie avec l'apport des résultats développés ici. Les résultats structuraux décrivant l'étape de formation du pont disulfure CysA-CysB commencent également à s'accumuler. Cependant

cette étape est définie de façon moins détaillée que la première, laissant plusieurs questions en suspens ; l'analyse structurale du pont CysB-CysC propre aux MsrA de la sous-classe 1 est beaucoup moins avancée. Enfin, les déterminants moléculaires intervenant dans l'interaction et la réduction avec le partenaire de recyclage du type Trx restent très peu connus, bien que certaines hypothèses puissent être émises à partir des résultats disponibles.

1.1. L'étape réductase

Bien que les structures associées aux deux types de Msr soient totalement différentes, et malgré des différences dans la nature des acides aminés formant le site actif, une synthèse des différents résultats obtenus sur ces deux classes d'enzymes conduit à observer une convergence des deux activités, jusque dans les détails moléculaires du mécanisme catalytique – tout au moins concernant la fixation et la réduction du groupement *S*-sulfoxyde dans un cas, et du groupement *R*-sulfoxyde dans l'autre. Ainsi, que ce soit dans le site actif de la MsrA ou celui de la MsrB, les différents résultats indiquent (i) que la zone hydrophobe (formée par l'environnement Trp53 et Phe52 dans les structures de MsrA et celui de Trp65 dans les structures de MsrB) intervient d'une manière importante dans la fixation et vraisemblablement dans l'orientation adéquate du substrat dont la fonction sulfoxyde est polarisée, (ii) tandis que la zone hydrophile (créée par l'environnement des chaînes latérales de Glu94, Tyr82 et Tyr134 dans les structures de MsrA et celui des chaînes latérales de His103, His100, Thr26 et Asn119 dans les structures de MsrB) intervient dans la catalyse à proprement parler en participant notamment à l'activation de la cystéine catalytique et son attaque nucléophile sur le sulfoxyde, et en stabilisant probablement l'état de transition du type sulfurane. Dans ce cadre, chez la MsrA, Glu94 doit certainement jouer un rôle dans les transferts de protons qui ont lieu au sein des différents partenaires, à savoir un départ de proton de Cys51 et une fixation de proton sur l'oxygène du sulfoxyde ; chez les MsrB, selon toute vraisemblance, His103 joue un rôle similaire.

Les interactions expliquant la sélectivité des Msr en faveur des résidus MetSO intégrés dans une chaîne polypeptidique ne sont pas définies sans ambiguïté. Les différentes expériences désignent des résidus pouvant intervenir à ce niveau (Asp129 et Tyr197 dans le cas de la MsrA et Arg115 et Arg89 dans le cas des MsrB), mais les manipulations visant à valider leur intervention n'apportent pas tous les éclaircissements attendus. Ainsi, la faible

définition en densité électronique au voisinage du carbone α du substrat dans la structure du complexe inactif avec la MsrA de *N. meningitidis* ne permet pas de conclure d'une manière convaincante à l'existence d'interactions stabilisatrices impliquant Tyr197 et Asp129. Leur implication dans la reconnaissance du substrat a été observée en enzymologie, en particulier pour Asp129, bien que celle-ci soit modeste, et ne permet pas d'expliquer pourquoi l'enzyme présente une meilleure affinité pour les résidus MetSO au sein des protéines, en comparaison de l'acide aminé libre. De même, la substitution de Arg89 et/ou Arg115, dans la MsrB de *N. meningitidis* n'apporte pas de modification des paramètres cinétiques, mettant ainsi en cause l'importance de ces deux résidus dans la reconnaissance du substrat, alors qu'ils sont observés interagir avec les atomes de la chaîne principale de ce dernier dans les structures de complexes inactifs. La résolution d'une structure de complexe entre une Msr et un résidu MetSO au sein d'une protéine peut aider à préciser ce point.

1.2. Le ou les pont(s) disulfure(s) intra-moléculaire(s)

Plusieurs structures ont été obtenues contenant un pont disulfure intra-moléculaire entre la cystéine catalytique et la cystéine de recyclage : celles de la MsrA et la MsrB de *N. meningitidis*, ainsi que celle de la MsrB de *X. campestris*. Ces structures révèlent les ajustements conformationnels effectifs au sein de chaque protéine, nécessaires pour l'établissement des ponts disulfures. Cependant, elles ne permettent pas toujours d'expliquer clairement quels éléments physiques et moléculaires dirigent le rapprochement des résidus cystéine réagissant entre eux.

Ainsi restent à découvrir les éléments moteurs du rapprochement des cystéines 51 et 198 dans la MsrA de *N. meningitidis*, dans laquelle un changement conformationnel impliquant une réorientation du résidu Cys198 a lieu, associé à l'ouverture de la boucle 121-134. Plus généralement, cette même question est à poser pour l'ensemble des structures de MsrA connues à ce jour, puisque toutes présentent des distances CysA-CysB incompatibles avec la formation d'un pont disulfure, dans des proportions plus ou moins grandes. Il convient cependant d'émettre une réserve quant à la généralisation de ce constat, puisque les MsrA possédant leur cystéine de recyclage en position 54 (sous-classe 3) n'ont pas encore été caractérisées. Dans ce cadre, l'enzyme issu de *B. subtilis* est en cours d'étude au sein de

l'équipe du professeur Guy Branlant, et la structure tridimensionnelle de cette protéine – en particulier sous sa forme oxydée – permettrait sans doute de révéler certaines caractéristiques propres à cette sous-classe ; malheureusement les essais de cristallisations effectués jusqu'ici n'ont pas abouti à des cristaux exploitables pour une expérience de diffraction (expériences menées au laboratoire par Sébastien Moniot). A l'exception de cette incertitude, il semble qu'une force motrice qui permettrait le rapprochement CysA-CysB chez un grand nombre de MsrA doive être découverte. La présence de la forme acide sulfénique de CysA résultant de l'étape réductase pourrait contribuer à ce rapprochement. En revanche, cette présence ne serait probablement pas la cause du déplacement de la boucle 121-134 observé chez *N. meningitidis* et *E. coli*, même si des expériences complémentaires sont vraisemblablement à prévoir pour renforcer cette hypothèse, notamment concernant la taille du substrat utilisé pour oxyder l'enzyme (voir partie B, section II). Seule la structure de la MsrA de *N. meningitidis* a été obtenue avec sa cystéine catalytique oxydée sous forme d'acide sulfénique. Toutefois, cette structure est similaire aux formes réduite et en complexe avec le substrat, à tel point qu'elle ne révèle pas dans quelle mesure le groupement sulfénique interviendrait dans le rapprochement de Cys198 et Cys51. La substitution de Cys198 en Ser ou l'utilisation d'un substrat non physiologique constitue peut-être un obstacle à une telle observation.

A partir de l'analyse combinée de la structure cristallographique de la MsrB de *N. meningitidis* et de la structure RMN de la MsrB de *B. subtilis*, il apparaît que dans les cas des MsrB ayant leur cystéine de recyclage en position 63, ce soit la fixation du substrat qui conduise les deux résidus Cys117 et Cys63 à se rapprocher l'un de l'autre. Mais il est plus difficile d'identifier ce qui conduit au rapprochement des deux résidus dans la structure de la MsrB de *X. campestris* où l'existence du pont disulfure 31-117 s'accompagne d'un remaniement important du repliement global. Comme chez les MsrA, il est possible que l'apparition du groupement acide sulfénique à la fin de l'étape réductase soit au centre de ce processus. La façon dont de telles observations/conclusions peuvent être étendues à l'ensemble des Msr possédant CysB en des positions très variables reste à être établie, par l'exploration structurale d'autres MsrB.

Aucune structure de MsrB possédant CysB sous forme d'acide sulfénique n'est actuellement connue. Afin de pouvoir mener des études similaires à celles de la MsrA de *N. meningitidis*, des expériences de cristallographie visant à isoler Cys117 oxydé sous forme d'acide sulfénique sont donc à envisager dans les MsrB. Il s'agirait d'expériences de diffusion de substrat dans des cristaux de mutants du type CysBSer (*i.e.* des mutants du résidu cystéine de recyclage), attendu qu'une expérience de co-cristallisation conduirait à des dimérisations

inopinées en solution, de par la réactivité des groupements sulféniques entre eux ou avec des cystéines réduites (voir partie B, section I). Cependant, étant donné les interactions entre monomères observées dans la plupart des structures résolues, l'on peut s'attendre à des perturbations sévères de l'empilement cristallin, et ainsi à des difficultés d'obtenir des cristaux de qualité suffisante pour une expérience de diffraction. Toutefois, il pourrait être envisageable d'obtenir des formes cristallines dans lesquelles les résidus du site actif ne seraient pas impliqués dans les interactions entre monomères. Par exemple il pourrait être tenté de saturer le système par un composé inactif qui se logerait au sein du site actif – à l'instar de la molécule de cacodylate au niveau du site actif de la MsrB de *N. gonorrhoeae* – et qui, une fois les cristaux formés, pourrait être déplacé par le substrat (du DMSO, par exemple) lors de sa diffusion.

Enfin, rappelons que les MsrA de la sous-classe 1 présentent une troisième cystéine CysC en position 206 qui réalise une attaque nucléophile du pont disulfure CysA-CysB pour résulter en une liaison disulfure intramoléculaire CysB-CysC. Aucune donnée structurale n'existe concernant ce pont disulfure 198-206. Aussi, outre la présence de plusieurs résidus glycine dans les séquences contenant ces deux cystéines, les structures disponibles ne permettent pas d'expliquer clairement leur rapprochement nécessaire pour former un pont disulfure. La forte agitation de la région en question observée dans la structure RMN de la MsrA d'*E. coli* en pont disulfure 51-198 donne cependant une indication sur ce point (Coudeville *et al.* 2007) : il semble que l'existence du premier pont disulfure apporte une agitation dans la région de la structure contenant Cys206, aidant sans doute au rapprochement de Cys206 vers Cys198.

1.3. Intervention du partenaire de recyclage de type thiorédoxine

Les résidus intervenant dans la reconnaissance moléculaire avec le partenaire de recyclage des Msr ne sont pas connus, or, il est clair que des déterminants spécifiques existent, à l'origine d'une certaine sélectivité plus ou moins prononcée en fonction de la nature des protéines mises en présence l'une de l'autre. A titre d'illustration, citons la meilleure efficacité du domaine N-terminal de PilB vis-à-vis du domaine MsrB comparativement au domaine MsrA chez *N. meningitidis*. Chez *F. nucleatum*, une sélectivité inverse est observée,

c'est-à-dire en faveur du domaine MsrA (G. Branlant et collaborateurs, communication personnelle). On peut également citer le cas de la Trx1 d'*E. coli*, qui est aussi efficace avec le mutant S31C/C63S de la MsrB de *N. meningitidis* (notée nmMsrB₃₁) qu'avec la protéine sauvage ; situation à comparer avec le mutant C31S/T63C de l'enzyme de *X. campestris* (xcMsrB₆₃) avec lequel Trx1 est moins efficace qu'avec la forme sauvage (voir partie B section IV). En outre, il semble que d'une façon générale, aussi bien dans les MsrA que dans les MsrB dont le mécanisme est caractérisé, l'étape cinétiquement limitante soit associée à la dissociation du partenaire de recyclage oxydé. Ce processus est donc plus lent que l'association entre une Msr oxydée et un partenaire réduit, ainsi que l'échange de ponts disulfures (Boschi-Muller *et al.* 2005). Les différents résultats disponibles permettent d'émettre certaines hypothèses sur le mode d'interaction entre les deux types de partenaires protéiques. Par exemple, l'exposition des résidus hydrophobes due à l'ouverture de la boucle 121-132 dans les MsrA pourrait être un élément permettant un recrutement efficace du partenaire de recyclage. De même, l'exposition du pont disulfure intra-moléculaire dans la MsrB de *X. campestris* au sein d'un site actif de conformation très ouverte pourrait faciliter une interaction et une réaction efficace avec le partenaire. Mais les détails moléculaires restent inconnus. Aussi, des études structurales de complexes entre une Msr et un des partenaires de recyclage connus nécessitent d'être entreprises. Ces études peuvent être menées en cristallographie des rayons X, mais il n'est pas certain d'obtenir des conditions de cristallisation donnant lieu à des cristaux exploitables, d'autant que peu de structures de complexes similaires ont été obtenues et décrites par ailleurs. Elles peuvent également être menées par d'autres méthodes expérimentales, comme la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS : "Small Angle X-ray Scattering"), mais les faibles résolutions obtenues généralement pour les modèles issus de telles expériences peuvent compromettre l'analyse fine de l'association moléculaire. De fait, des mesures préliminaires de données SAXS ont été effectuées pour un complexe covalent entre la MsrB de *N. meningitidis* et la Trx1 d'*E. coli*, en collaboration avec l'équipe du docteur Dimitri Svergun (EMBL, Hambourg), mais les conditions expérimentales nécessitent d'être améliorées. Enfin, les études structurales de ces complexes peuvent être entreprises *in silico* par modélisation, en imposant des contraintes initiales comme un pont disulfure inter-moléculaire, ou une interaction avec un résidu aromatique comme Trp53 dans les MsrA ou Trp65 dans les MsrB, par exemple. Cependant, les larges changements conformationnels dont les Msr semblent capables pointent sur la nécessité d'employer des procédures élaborées de modélisation, et de maintenir une grande

prudence dans l'évaluation des résultats issus de méthodes telles que le "docking" par exemple.

1.4. Les mécanismes alternatifs

Le cas des Msr n'obéissant pas au mécanisme catalytique étudié ici est également à considérer (voir partie Introduction, paragraphe 3.2).

Le mécanisme employé par les enzymes ne possédant pas d'autres cystéines que la cystéine catalytique, par exemple, est méconnu. Aucune MsrA présentant cette caractéristique (comme la MsrA putative de *Rhodobacter capsulatus*) n'a encore été caractérisée. Dans le cas des MsrB, celle de *Mycoplasma pulmonis* a révélé être active dans un processus dépendant de la Trx ou du glutathion (Neiers, 2007). Cependant les résultats laissent encore beaucoup de questions en suspens, comme, par exemple, la nature du partenaire de régénération utilisé *in vivo*, étant donné que la Trx1 du même organisme est moins efficace que le système glutathion/glutarédoxine. Aucune donnée structurale n'est disponible concernant une telle protéine, or une structure de ce type serait intéressante à explorer, notamment parce que l'intermédiaire acide sulfénique est, ici, réductible par la Trx, alors qu'il semble ne pas l'être dans le mécanisme mettant en jeu un pont disulfure intra-moléculaire (Boschi-Muller *et al.* 2005).

Il y a également les Msr ayant un résidu sélénocystéine catalytique. Dans les deux exemples de Msr présentés dans la partie A (paragraphe 3.2) dont l'activité a été révélée, la MsrA de *C. reinhardtii* (Kim *et al.* 2006) et la MsrB-1 humaine nécessitent la formation d'un pont sélénylsulfide (Kim et Gladyshev 2005). Les différences structurales potentielles apportées par la présence du sélénium au lieu du soufre, aussi bien dans les MsrA que dans les MsrB, comparativement aux différentes structures établies, sont à rechercher. Dans le cas de la MsrB-1, certains des résidus du site actif identifiés comme indispensables dans les MsrB ayant une cystéine catalytique (notamment la MsrB de *N. meningitidis*) ne sont pas conservés; il s'agit des résidus Asn119, Thr26 et His100. La conformation du site actif d'une telle protéine, en particulier en présence du substrat, est alors en question.

2. La protéine PilB

Il convient d'intégrer les différentes conclusions apportées par les études structurales effectuées sur chaque domaine isolé de PilB dans le contexte de la protéine entière. Par ailleurs, PilB nécessite des études spécifiques, en regard de son rôle et de sa localisation cellulaire.

En addition du comportement particulier du domaine N-terminal de PilB vis-à-vis des domaines Msr qui demande des éclaircissements plus poussés (voir Partie B, section II, paragraphe 2), un des points nécessitant des approfondissements concerne le mécanisme de régénération de ce domaine une fois oxydé. La DsbD semble être un candidat potentiel pour catalyser cette étape (Brot *et al.* 2006) (Voir partie A, paragraphe 3.5.2). Si un tel rôle de la DsbD se confirme (notamment avec la levée de l'ambiguïté apportée par le fait que la DsbD appartient à la membrane interne tandis que PilB a été localisé dans la membrane externe de *Neisseria*), les déterminants structuraux mis en jeu dans l'association entre les deux partenaires pourraient être explorés par cristallographie, par exemple. En particulier, cela permettrait de vérifier une implication éventuelle des résidus $_{99}\text{FLHE}_{102}$ mis en lumière lors de l'analyse de la structure de Dom1_{PilB}.

Un autre aspect à prendre en considération concerne l'organisation relative des trois domaines au sein de la protéine globale. En effet, peu de choses sont connues permettant d'expliquer la possibilité d'interactions avec les protéines substrats de chaque domaine Msr, étant donné la présence proche des deux autres domaines au sein de la protéine globale. Par ailleurs la possibilité d'une interaction *in situ* entre Dom1_{PilB} et les domaines Msr lors du processus de recyclage de ces derniers reste également à être caractérisée. Des premiers résultats structuraux ont été obtenus par l'utilisation de la méthode SAXS, en collaboration avec l'équipe du docteur Dimitri Svergun (EMBL, Hambourg). Deux échantillons ont été analysés : une forme dite "réduite", c'est à dire où les six résidus cystéine de la séquence étaient sous une forme thiol libre, et une autre forme où les résidus cystéine des domaines Msr étaient en pont disulfure intra-moléculaire, avec, en addition, une substitution des résidus cystéine de Dom1_{PilB} en sérine (notée Msr_{ox}). Plusieurs constructions génétiques ont servi pour ces manipulations. Ainsi, pour obtenir une forme soluble et homogène de la protéine, le fragment N-terminal contenant la séquence d'adressage vers le périplasme et le segment

d'insertion dans la membrane a été délété, et le résidu Met195 (correspondant au site de réinitiation interne) a été substitué en un résidu alanine (voir partie A, paragraphe 3.5 et figure 31). En outre, deux protéines recombinantes additionnelles ont été produites et soumises aux expériences de diffusion, correspondant à des fusions des domaines de PilB deux à deux (Dom1_{PilB}-MsrA et MsrA-MsrB). Ces derniers ont aidé à l'identification de chaque domaine révélé par le modèle *ab initio*. Les différents échantillons ont été produits et purifiés par le docteur Fabrice Neiers (MAEM, UHP).

Les résultats obtenus présentent peu d'ambiguïté quant à la forme globale de la protéine en solution, notamment grâce à l'utilisation de solutions très pures et monodisperses, malgré les concentrations élevées en protéines (10 mg/mL pour la forme réduite et 15 mg/mL pour la forme Msr_{ox}) qui auraient pu conduire à l'apparition d'agrégats. Ainsi, les modèles *ab initio* obtenus (c'est-à-dire uniquement à partir des mesures de clichés de diffusion des rayons X) montrent une structure allongée, en forme de "L", avec trois domaines bien distincts, mais avec un décrochage plus prononcé de l'un d'entre eux par rapport aux deux autres (une distance plus grande entre les centres de giration) (Figure 1-I). La synthèse de toutes les mesures effectuées, additionnée à l'ajustement des structures cristallographiques de chaque domaine au modèle *ab initio*, a permis de les positionner les uns relativement aux autres. Ainsi, le domaine MsrB est plus espacé des deux autres modules, la distance entre Dom1_{PilB} et le domaine MsrA étant plus courte (Figure 1-II). Cependant, au vu de la forme grossièrement sphérique de chaque domaine, les différents essais d'ajustement ont donné lieu à plusieurs orientations plausibles de chacun d'entre eux, avec l'utilisation de la seule contrainte initiale imposée par la longueur des fragments lieurs. Par ailleurs, les deux formes réduite et Msr_{ox} ont abouti à des résultats en tout point semblables.

Ainsi, la forme globale de la protéine PilB a été observée en solution. La protéine est allongée, mais présente une courbure au niveau de son domaine MsrA. Les trois domaines sont identifiés et sont clairement séparés, même si les deux domaines Dom1_{PilB} et MsrA sont relativement proches l'un de l'autre. Une telle forme de la protéine est compatible avec une action non contrainte des domaines Msr vis-à-vis des protéines substrats potentiels. Cependant, dans ce contexte, il est difficile d'envisager un échange de pont disulfure entre Dom1_{PilB} et l'un des domaines Msr, et ce d'autant que l'oxydation de ces derniers ne semble pas une donnée suffisante pour voir apparaître une interaction nette avec Dom1_{PilB}. Aussi, au vu de ces premiers résultats, l'existence d'échanges de ponts disulfures au sein d'une même molécule PilB apparaît étonnante (processus intra-moléculaire) ; la possibilité d'un échange entre plusieurs molécules PilB (processus inter-moléculaire) n'est toutefois pas à exclure. Par

ailleurs, il n'est pas non plus à exclure que l'ancrage de la protéine à une membrane *in vivo* puisse apporter des différences structurales, par rapport à ce qui est observé à l'issue de cette expérience. Des expériences complémentaires sont à entreprendre visant à renforcer et préciser ces premières observations : par exemple, d'autres expériences utilisant la méthode SAXS avec de nouveaux échantillons, additionnées à des manipulations en cristallographie.

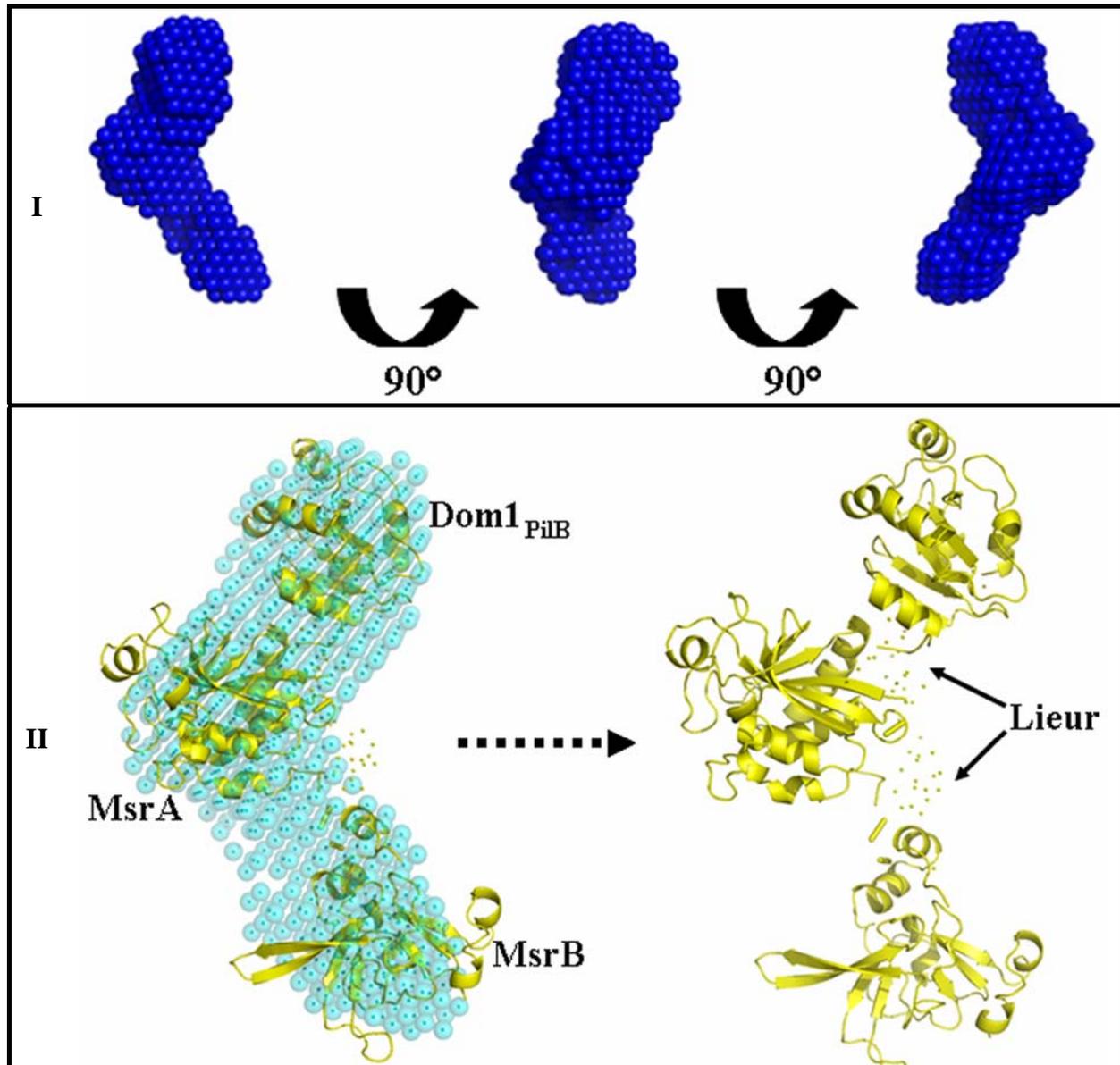


Figure 1

Forme de la protéine PilB en solution observée grâce à la méthode SAXS.

(I) Modèle *ab initio* en billes ("dummy residues"), obtenu grâce au programme GASBOR (Svergun *et al.* 2001), et (II) résultat d'un ajustement des structures cristallographiques des trois domaines isolés dans le modèle initial, obtenu grâce au programme BUNCH (Petoukhov et Svergun 2005). Les programmes utilisés font partie de la suite ATSAS, développée par l'équipe du Dr Dimitri Svergun (EMBL, Hambourg) (Konarev *et al.* 2006).

3. Conclusion générale

Les travaux développés lors de cette thèse ont contribué à la compréhension du fonctionnement des MsrA et des MsrB, des enzymes présentant un mécanisme original, basé sur la chimie du thiol et de l'acide sulfénique. Ils ont permis de mieux préciser le rôle des acides aminés constituant les sites actifs des enzymes modèles étudiés, tout en révélant certains comportements conformationnels autrement insoupçonnés. Par ailleurs, ils incluent l'une des premières analyses structurales de la protéine PilB, une protéine portant à la fois les deux activités MsrA et MsrB – nécessaires pour catalyser la réduction totale des résidus méthionine oxydés, en prenant en charge à la fois les stéréoisomères *S*- et *R*-sulfoxyde du substrat – et l'activité enzymatique permettant le recyclage des Msr. PilB serait donc susceptible d'assurer à ses domaines Msr un cycle catalytique ininterrompu. Il reste néanmoins à préciser le mécanisme de régénération du domaine N-terminal. Il est d'autant plus intéressant de caractériser en détail l'activité Msr que c'est l'une des premières activités enzymatiques découvertes permettant une réparation de protéines oxydées. En outre, il s'agit d'une activité essentielle pour la vie cellulaire, en particulier dans les situations de stress oxydant ; de plus en plus de résultats illustrent son importance au sein des organismes, par exemple en corrélant sa défaillance avec le processus de vieillissement et les pathologies associées. De ce point de vue une bonne compréhension de cette activité permet de compléter les connaissances des processus mis en jeu dans le cadre des luttes anti-oxydantes. Enfin, des visées thérapeutiques peuvent découler de la compréhension de cette activité, comme dans le cadre de la lutte contre les bactéries pathogènes *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*, au sein desquelles la protéine PilB est estimée importante lors du processus d'invasion.

Annexes

Annexe 1

Publication

Ranaivoson F.M., Kauffmann B., Neiers F., Wu J., Boschi-Muller S., Panjekar S., Aubry A., Branlant G., Favier F.

“The X-ray Structure of the N-terminal Domain of PILB from *Neisseria meningitidis* Reveals a Thioredoxin-fold.”

J Mol Biol. (2006), **358/2**, pp. 443-454.

The X-ray Structure of the N-terminal Domain of PilB from *Neisseria meningitidis* Reveals a Thioredoxin-fold

Fanomezana M. Ranaivoson¹, Brice Kauffmann², Fabrice Neiers³
Junzhu Wu³, Sandrine Boschi-Muller³, Santosh Panjikar², André Aubry¹
Guy Branlant^{3*} and Frédérique Favier^{1*}

¹LCM3B, Equipe
Biocristallographie, UMR 7036
CNRS-UHP, Faculté des
Sciences et Techniques, BP 239
54506 Vandoeuvre, France

²EMBL Hamburg Outstation
c/o DESY, Notkestr. 85
D-22603 Hamburg, Germany

³MAEM, Equipe Enzymologie
Moléculaire, UMR 7567
CNRS-UHP, Faculté des
Sciences et Techniques, BP 239
54506 Vandoeuvre, France

The secreted form of the PilB protein was recently shown to be bound to the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* and proposed to be involved in survival of the pathogen to the host's oxidative burst. PilB is composed of three domains. The central and the C-terminal domains display methionine sulfoxide reductase (Msr) A and B activities respectively, i.e. the ability to reduce specifically the S and the R enantiomers of the sulfoxide function of the methionine sulfoxides, which are easily formed upon oxidation of methionine residues. The N-terminal domain of PilB (Dom1_{PILB}) of *N. meningitidis*, which possesses a CXXC motif, was recently shown to recycle the oxidized forms of the PilB Msr domains *in vitro*, as the *Escherichia coli* thioredoxin (Trx) 1 does.

The X-ray structure of Dom1_{PILB} of *N. meningitidis* determined here shows a Trx-fold, in agreement with the biochemical properties of Dom1_{PILB}. However, substantial structural differences with *E. coli* Trx1 exist. Dom1_{PILB} displays more structural homologies with the periplasmic disulfide oxidoreductases involved in cytochrome maturation pathways in bacteria. The active site of the reduced form of Dom1_{PILB} reveals a high level of stabilization of the N-terminal catalytic cysteine residue and a hydrophobic environment of the C-terminal recycling cysteine in the CXXC motif, consistent with the pK_{app} values measured for Cys67 (<6) and Cys70 (9.3), respectively. Compared to cytochrome maturation disulfide oxidoreductases and to Trx1, one edge of the active site is covered by four additional residues (⁹⁹FLHE₍₁₀₂₎). The putative role of the resulting protuberance is discussed in relation to the disulfide reductase properties of Dom1_{PILB}.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: PilB; X-ray structure; cytochrome maturation protein; thioredoxin; methionine sulfoxide reductase

*Corresponding authors

Introduction

Neisseria are Gram-negative aerobic bacteria, among which the two obligate human pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* are responsible for diseases that affect millions of people world wide. Like many other bacterial pathogens, these two bacteria possess several

defence mechanisms against the host's oxidative burst. Recently, the secreted form of the PilB protein of *N. gonorrhoeae*, which is bound to the outer membrane, was shown to be involved in surviving hydrogen peroxide and superoxide anions.¹

PilB is composed of three domains. The central and the C-terminal domains of *N. meningitidis* PilB display methionine sulfoxide reductase (Msr) A and B activities, respectively.² Recently, the soluble form of the N-terminal domain (hereinafter denominated Dom1_{PILB}) devoid of amino acids 1–32 which correspond to the signal and addressing sequence peptides was produced and its biochemical properties were determined.³ It possesses a disulfide redox-active site constituted of a CXXC

Abbreviations used: Msr, methionine sulfoxide reductase; Trx, thioredoxin; Dom1_{PILB}, N-terminal domain of PilB; CMP, cytochrome maturation proteins.

E-mail addresses of the corresponding authors: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr; frederique.favier@lcm3b.uhp-nancy.fr

signature with a redox potential similar to that of thioredoxin (Trx) 1 from *Escherichia coli*. Moreover, Dom1_{PILB} is able to recycle the oxidized forms of the isolated MsrA and MsrB domains as does Trx1 from *E. coli*.³

The organization of PilB seems specific to a very small number of organisms, since to date, it is only observed in the *Neisseria* genus and in *Fusobacterium nucleatum*, a human opportunistic pathogen.³ The uniqueness of the organization and the outer membrane localization of PilB make the Dom1_{PILB} domain an attractive target to selectively block the invasion of the *Neisseria* pathogens. This would offer an alternative to the use of the current antibiotics, as *Neisseria* rapidly develops resistance to an increasing number of them,^{4,5} and this is alarming given the lack of a vaccine against some serogroups of *N. meningitidis*. In regards to that, knowledge of the three-dimensional structure of Dom1_{PILB} appears as a prerequisite. The fact that (1) Dom1_{PILB} displays biochemical properties similar to those of *E. coli* Trx1³ and, (2) the *E. coli* Trx reductase is not able to recycle the oxidized form of Dom1_{PILB}³ while it efficiently reduces the *E. coli* oxidized Trx1 suggests a Dom1_{PILB} fold that belongs to the Trx superfamily but with substantial structural differences as compared to Trx.

Here, the X-ray structure of the reduced form of Dom1_{PILB} determined at a resolution of 1.9 Å is described. It reveals an overall Trx-fold, in accordance with the observed ability of Dom1_{PILB} to act *in vitro* as a disulfide oxidoreductase. Dom1_{PILB} possesses, however, additional features to the canonical Trx-fold closer to that observed in periplasmic disulfide oxidoreductases of cytochrome maturation pathways, such as DsbE, ResA and TlpA. Analysis of the Dom1_{PILB} overall-fold and of its active site is discussed in relation to its biochemical properties.

Results

Sequence alignments

N. meningitidis and *N. gonorrhoeae* Dom1_{PILB} share 97% of identical residues. These *Neisseria* sequences have homologues in other organisms; however, their degree of similarity with Dom1_{PILB} is much lower. The function associated with these proteins, when identified, mainly corresponds to thiol: disulfide interchange proteins of the bacterial periplasm, some of them involved in cytochrome biogenesis, such as TlpA, DsbE, or ResA proteins. The sequence closest to Dom1_{PILB}, identified in the sequence of the *F. nucleatum* genome,⁶ is assigned a TlpA function (Uniprot entry name Q8RGU0_FUSNN; 39% of identity for 111 aligned residues). Three-dimensional structures of TlpA, ResA and DsbE enzymes are available in the RCSB Protein Data Bank (PDB⁷). Consequently, the search for the sequence closest to Dom1_{PILB} in the PDB shows the ResA protein from *Bacillus subtilis* as the first match

(PDB entries 1SU9 and 1ST9 for the reduced and oxidized forms, respectively)⁸ which shares 27% of identity with Dom1_{PILB} for 111 aligned amino acid residues (Figure 1).

Dom1_{PILB} seems to possess the major characteristics of these Trx-like proteins. In particular, the amino acid residues from positions 67 to 70 ((₆₇)CPLC(₇₀)) correspond to the Trx-like CX₁X₂C motif. To our knowledge, Dom1_{PILB} constitutes the only sequence with a proline and a leucine as X₁ and X₂.

Structure solution and quality of the model

The structure was solved from tetragonal crystals of the selenomethionine-substituted form of the L100M/S158M Dom1_{PILB} double mutant, which diffracted to 2.6 Å, using the SAD methods. It was completed and refined using the diffraction data collected to a resolution of 1.9 Å from monoclinic crystals of wild-type Dom1_{PILB} (Table 1). The final model corresponds to residues from Val33 to Leu175, with respective *R* and *R*-free factors of 19.9% and 22.4%. Analysis of the model with PROCHECK⁹ and CNS_SOLVE¹⁰ showed a good stereochemistry and no residue in disallowed regions of the Ramachandran plot¹¹ (Table 2). The main-chain is very well defined in the sigma-A weighted 3F_o–2F_c electron density map and only very few surface residues have poorly defined side-chains. One of them, Leu69, is the X₂ residue of the CX₁X₂C motif. No electron density is observed for its C^γ, C^{δ1} and C^{δ2} atoms, which display relatively high thermal motion factors. Although it could express a natural mobility, it could also result from the inability of the side-chain to adopt the conformation of one of the three usually observed rotamers: two of them would give unfavorable interactions with other side-chains of the monomer, while the third one would approach a carbonyl group of a facing monomer. Thus, the crystal packing could prevent stabilization of the Leu69 side-chain in a defined conformation.

Crystal packing only generates a small number of direct interactions with symmetry-related monomers, either through hydrogen bonding or hydrophobic forces. Supplementary interactions are mediated by water molecules. Due to the 2-fold axis of the space group C2, the active sites of two monomers face each other, generating a few direct interactions among which the one previously discussed for Leu69. These few inter-subunit interactions are probably caused by the crystal packing and therefore have likely no functional role. This is in agreement with the biochemical studies of Dom1_{PILB}, which was shown to be active as a monomer *in vitro*.³

Overall structure of the N-terminal domain of PilB

The canonical Trx-fold¹² is the basis motif of the Dom1_{PILB} architecture. It consists of four β-strands

Table 1. Data collection statistics for the wild-type Dom1_{PILB} monoclinic crystals, and for the [SeMet]Dom1_{PILB} tetragonal crystals

	Wild-type Dom1 _{PILB}	[SeMet] Dom1 _{PILB}
Rotation range (deg.)	180	360
Oscillation range (deg.)	1	0.5
Wavelength (Å)	0.811	0.975
Space group	C2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters (Å)	$a=57.0, b=45.1,$ $c=59.2,$	$a=b=52.5,$ $c=144.3$
(deg.)	$\beta=112.0$	
Resolution (Å)	30–1.9 (2.05–1.9)	30–2.6 (2.8–2.6)
Reflections	40,907	181,969
Unique reflections	11,079	6730
Redundancy	3.7	27.0
$I/\sigma I$	8.9 (2.3)	9.4 (2.6)
Completeness (%)	99.9 (100)	100 (100)
R_{merge} (%)	8.0 (32.6)	6.8 (30.1)
$R_{\text{r.i.m}}$ (%)	9.3 (38.3)	6.9 (30.7)
$R_{\text{p.i.m}}$ (%)	4.9 (19.9)	1.3 (6.0)
Number of monomers per asymmetric unit	1	1
Number of selenium per monomer	0	2
Solvent content (%)	50.0	45.2

The values corresponding to the outer shell are given in parentheses. $R_{\text{r.i.m}}$ is the redundancy-independent merging R -factor and $R_{\text{p.i.m}}$ is the precision-indicating merging R -factor.⁵⁴

the central sheet. The second insert is observed after β_2 within the Trx-fold. Residues Gly98 to Gly127 describe a turn and an additional helix α_2 followed by the strand β_3 parallel to β_2 . The polypeptide chain then continues the Trx-fold, i.e. an α -helix (α_3) followed by two antiparallel β -strands (here named β_4 and β_5 , respectively), and finally an α -helix (α_4).

Table 2. Refinement and model statistics

Resolution range (Å) ^a	18.62–1.90 (2.02–1.90)
No. of reflections used for R calculation ^a	9620 (1685)
No. of reflections used for R_{free} calculation ^a	1099 (189)
R value (%) ^a	18.2 (23.4)
R_{free} value (%) ^a	21.9 (26.9)
No. of non-hydrogen protein atoms/No. of residues	1110/143
No. of water molecules	154
Nature of non-protein or non-water atoms	1 $\text{SO}_4^{2-}, 2 \text{Cl}^-$
Mean B -factor, protein main-chain/protein side-chain/water/all (Å ²)	17.50/19.87/27.65/19.83
Ramachandran plot:	
Residues in most favored regions (%)	88.6
Residues in additionally allowed regions (%)	11.4
Residues in generously allowed regions (%)	0
Residues in disallowed regions (%)	0
rms deviation from ideal geometry	
Bond length (Å)	0.006
Bond angle (deg.)	1.268

^a Values indicated in parentheses correspond to statistics in the outer resolution shell.

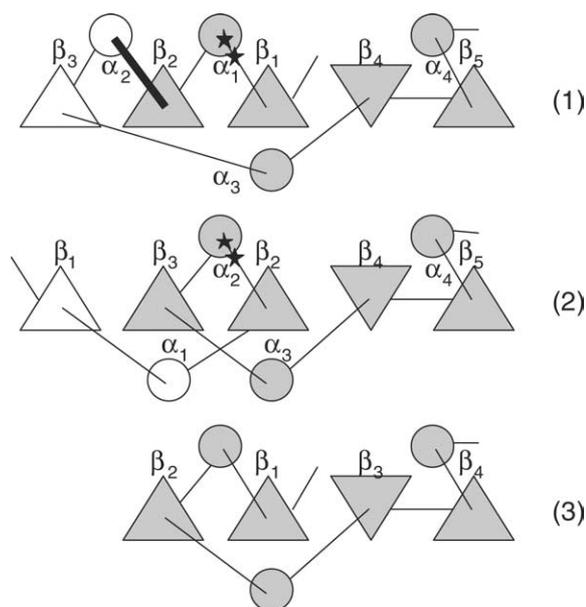


Figure 2. Schematic drawing showing the topology of the central β -sheets in Dom1_{PILB} (1) and *E. coli* Trx1 (2). Both of them contain the canonical Trx-fold (3), shown in light grey in each case. In these sketches, α -helices are represented as circles, and β -strands as triangles; their similar orientation corresponds to parallel strands, while head-to-tail triangles represent antiparallel strands. The approximate positions of the catalytic and the resolving cysteine residues of the CX₁X₂C motif are shown by stars. The thick line in (1) corresponds to the loop of Dom1_{PILB} that contains residues ⁹⁹FLHE₍₁₀₂₎ absent in the other CMPs. It has no equivalent in Trx (2).

Thus, the secondary structures $\alpha_0, \beta_{10}, \beta_1, \alpha_1, \beta_2, \alpha_2, \beta_3, \alpha_3, \beta_4, \beta_5, \alpha_4$ form a central five-stranded β -sheet ordered $\beta_3\beta_2\beta_1\beta_4\beta_5$ (β_4 antiparallel), where the subpart $\beta_2\beta_1\beta_4\beta_5$ corresponds to the β -sheet of the canonical Trx-fold. It is surrounded on one side by helices α_1, α_2 and α_4 and flanked on the opposite side by helices α_0, β_{10} and α_3 .

Structural homologues

DALI¹³ and VAST¹⁴ have been used to search for structural homologues of Dom1_{PILB} in the PDB.⁷ Based on their scores of superimposition, the two programs listed a series of Trx-like proteins, however, in a different order. The synthesis of the results seems to indicate that some periplasmic disulfide oxidoreductases slightly emerge from Trxs and peroxiredoxins. Indeed, the best scores obtained by DALI concern the ResA protein from *Bacillus subtilis* (PDB entry 1SU9 and 1ST9,⁸ Z-score=14.8), followed by TlpA from *Bradyrhizobium japonicum* (PDB entry 1JFU;¹⁵ Z-score=12.6). VAST classes them as its third and eighth solutions while its best candidate is the DsbE from *Mycobacterium tuberculosis* (PDB entry 1LU4;¹⁶ VAST-score=15.0), which was apparently not included in the DALI database. These proteins share a common

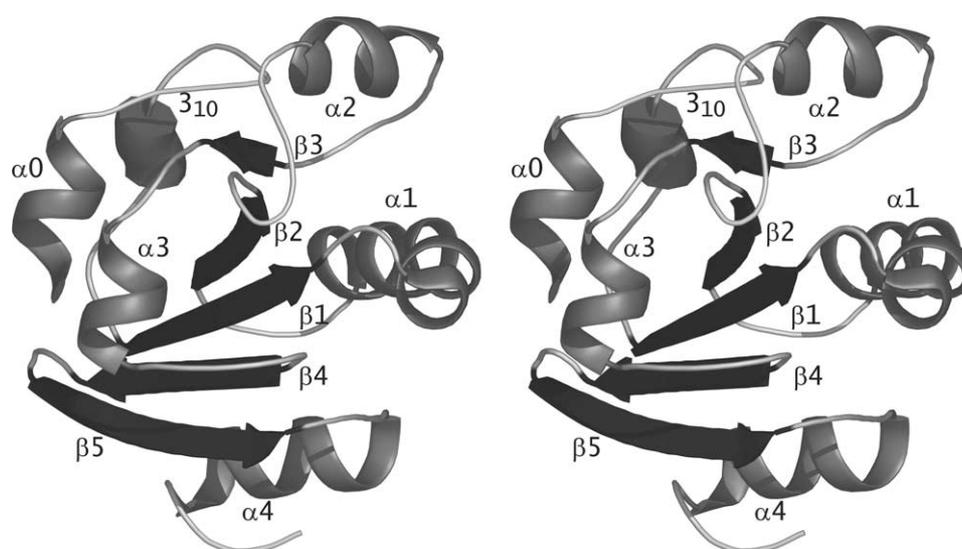


Figure 3. Schematic drawing of the three-dimensional structure of the PilB N-terminal domain from *N. meningitidis*. In this stereo view, β -strands are represented as arrows, α -helices as helices, and the 3_{10} helix as a cylinder.

overall fold and are thus grouped in a structural sub-class of Trx-like proteins called cytochrome maturation proteins (CMPs).¹⁷ Five CMP structures are available in the PDB, since the DsbEs from *Bradyrhizobium japonicum* (PDB entry 1KNG¹⁸) and from *E. coli* (PDB entry 1Z5Y¹⁹) add to the three previously mentioned proteins, however, with slightly weaker scores.

From the entrance to the strand β_1 , the succession of the secondary structures in CMPs is identical to that of Dom1_{PILB} (Figure 1). This high similarity of the folds is reflected by the low root-mean-squares obtained from the superimposed C α atoms, which roughly vary from 1.7 to 1.9 Å for about 100 of superimposed residues. However, the superimpositions reveal two differences between Dom1_{PILB} and these CMPs (Figure 4(a)). The first one concerns the N-terminal end, which does not adopt the same fold although the peptide chain roughly runs in the same region. In all cases but Dom1_{PILB}, the N-terminal end forms a β -hairpin. In Dom1_{PILB}, a bulkier helix α_0 replaces the first β -strand. As a consequence, the peptide chain that follows the helix α_0 is repulsed 8 Å away and forms one turn of a 3_{10} helix instead of the second β -strand. This structural difference could be the consequence of the truncation, which was done at position 33 in order to produce a soluble form of Dom1_{PILB}. The second difference is the loop from Ser96 to Gly106 that connects β_2 to α_2 . Four additional residues (⁹⁹FLHE₍₁₀₂₎) are inserted and form a turn near the active site (Figures 1, 4(a) and 5) (see following section for further description).

Dom1_{PILB} was shown to reduce the oxidized forms of the MsrA and MsrB domains of PilB *in vitro*, as does the *E. coli* Trx1.³ Compared to Dom1_{PILB}, the *E. coli* Trx1 also possesses five β -strands; however, ordered $\beta_1\beta_3\beta_2\beta_4\beta_5$ (instead of $\beta_3\beta_2\beta_1\beta_4\beta_5$), where $\beta_3\beta_2\beta_4\beta_5$ correspond to $\beta_2\beta_1\beta_3\beta_4$ of the canonical Trx-fold (Figures 1 and 2).

Superimposition of the structures of the reduced forms (using an average model of the reduced Trx calculated from the PDB entry 1XOB,²⁰ rms = 1.716 Å for 81 aligned residues) underlines the major consequence of this difference (Figure 4(b)). Aside from the N-terminal end of Dom1_{PILB}, which is not discussed here since it lies at the other side of the central β -sheet with respect to the active site, the main difference concerns helix α_2 of Dom1_{PILB} which has no equivalent in Trx. Indeed, α_2 joins the strands β_2 and β_3 , which correspond to β_3 and β_1 , respectively, not directly connected in Trx. In particular, the loop that links β_2 to α_2 and that contains residues (⁹⁹FLHE₍₁₀₂₎) is absent in Trx (Figures 4(b) and 5).

The Dom1_{PILB} active site

The first α -helix of the Trx-fold, α_1 , is divided into two parts, since a pronounced bend of about 40° occurs at position 75, due to the presence of a glycine residue known to introduce breaks in α -helices. This kink is caused by a proline residue at the same position in the closest structural homologues of Dom1_{PILB}. The active-site sequence motif (⁶⁷CPLC₍₇₀₎) is located at the N terminus of α_1 (Figures 1 and 6). The Pro68 ring forms a prominence at the end of α_1 . The Leu69 side-chain seems relatively mobile (see the previous section that describes the structure solution and the quality of the model). The side-chain of Cys67 points outward of the active site, and thus allows solvent accessibility to its sulfur atom. This latter is separated from the sulfur atom of Cys70 by 3.3 Å. This distance indicates that the Dom1_{PILB} structure corresponds to the reduced form of the disulfide redox couple. A hydrogen bond is observed between Cys67 and Cys70. Indeed, the four atoms C β and S γ of Cys67, S γ and C β of Cys70 define a virtual right-handed dihedral angle of 70°, with an

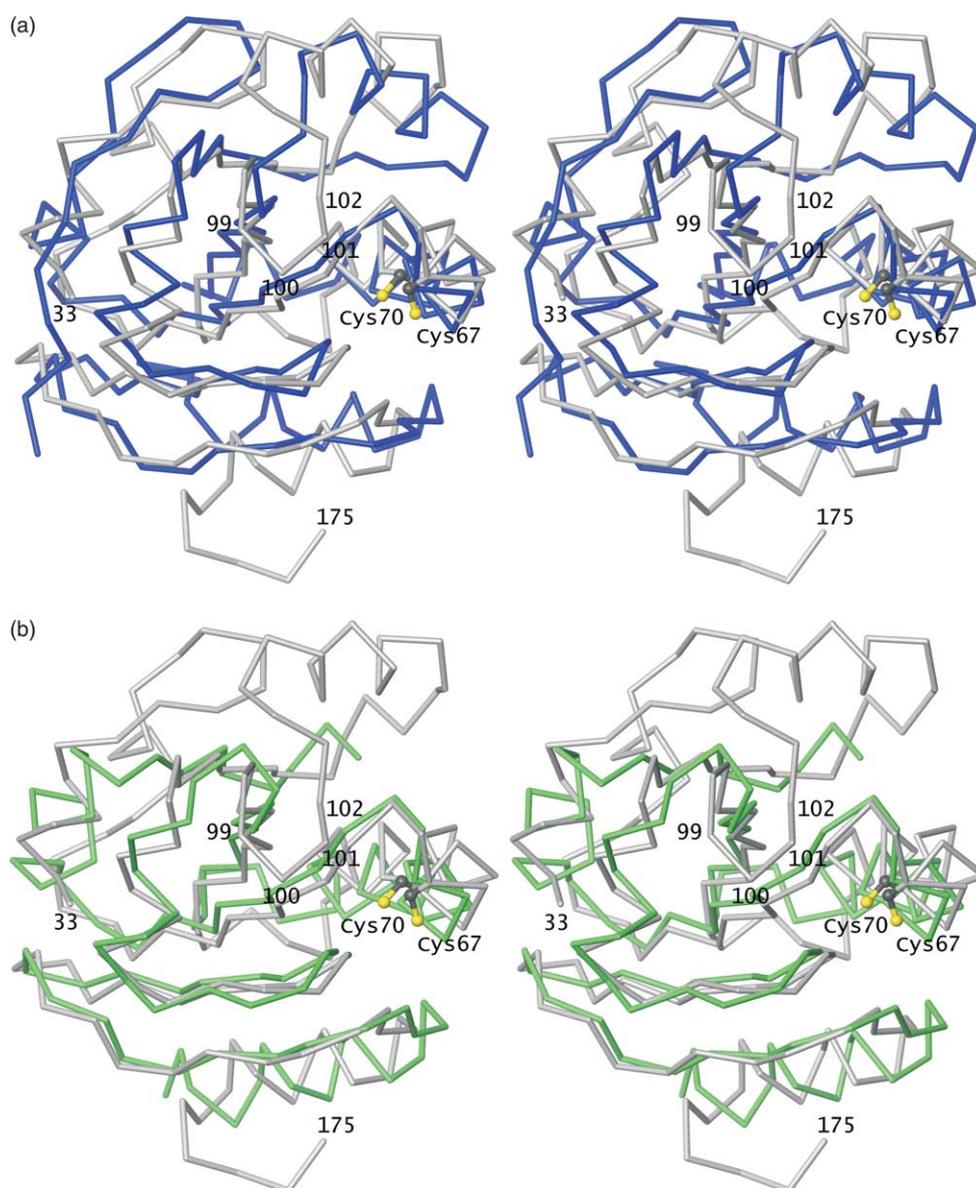


Figure 4. Stereoscopic view of the superimposed three-dimensional structures of *N. meningitidis* Dom1_{PILB} (grey) and (a) *B. subtilis* ResA (blue; PDB entry 1SU9⁸) chosen as a representative of cytochrome maturation proteins or (b) *E. coli* Trx1 (green; PDB entry 1XOB¹⁹). For clarity, only the C^α atoms are displayed. The N and C-terminal truncations of the Dom1_{PILB} polypeptide chain are labelled, as well as the four additional residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎. The catalytic cysteine Cys67 and the resolving cysteine Cys70 of Dom1_{PILB} are shown. Molecules are orientated as in Figure 3.

angle of 79° between the three atoms C^β and S^γ of Cys67 and S^γ of Cys70, and an angle of 93° between the three atoms S^γ of Cys67, S^γ and C^β of Cys70. S^γ of Cys67 is involved in two additional hydrogen bonds with the main-chain nitrogen atoms of Leu69 (3.5 Å) and Cys70 (3.4 Å), respectively. On the contrary to S^γ of Cys67, no hydrogen-bond donor or acceptor suitably positioned (except for Cys67) is found near S^γ of Cys70 within a distance of 3.9 Å, the upper value observed for a hydrogen bond between thiol and nitrogen or oxygen atoms.^{21–23} Furthermore, the Cys70 side-chain is not accessible to solvent. It is in a hydrophobic environment, mainly formed by the ring of the *cis*-proline Pro140, and by the C^β atoms of Tyr139 and Trp63.

A noteworthy network of interactions takes place on the other side of Cys70 with respect to Cys67 (Figure 6). Lys61 which belongs to strand β₁ stretches its side-chain so that its atom N^ε shares a hydrogen bond/salt bridge with oxygen O^{ε1} of Glu73 (2.8 Å) from helix α₁. The N^ε atom also interacts with oxygen O^{γ1} (2.8 Å) of Thr77 in α₁, and with a water molecule (2.9 Å) hydrogen-bonded to the carbonyl oxygen of Cys70 (2.8 Å).

Residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ in the loop Ser96 to Gly106 that connects β₂ to α₂ (Figures 1 and 5), highlighted as a characteristic feature of Dom1_{PILB}, form a turn that brings the side-chains of Leu100, His101 and Glu102 close to Ser65, Trp66 and Tyr139 which surround Cys67 (Figure 6). Three hydrogen bonds,

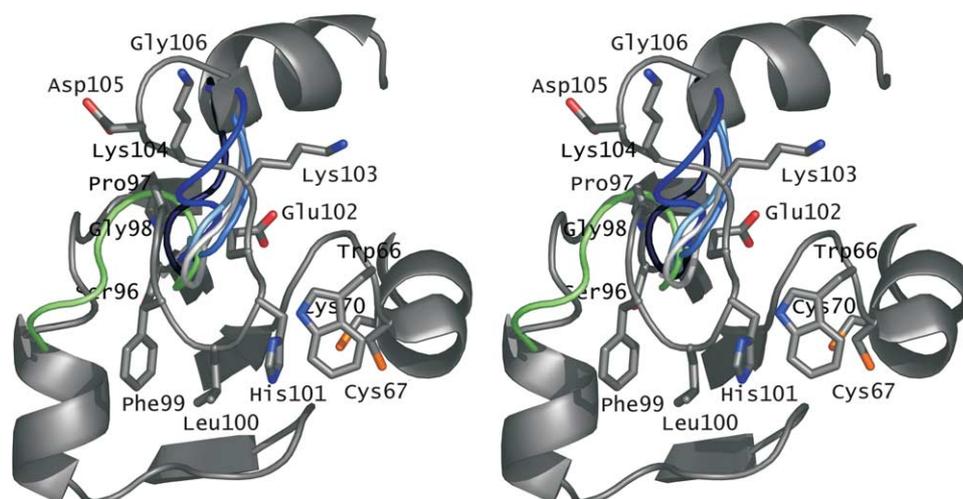


Figure 5. Stereoscopic view of the loop Ser96 to Gly106 that connects β_2 to α_2 . The neighboring secondary structures are displayed, as well as the catalytic and resolving cysteine residues and the preceding tryptophan, on which the loop anchors *via* a hydrogen bond. As a comparison, the equivalent loops appear shorter in *B. subtilis* ResA (navy blue), *B. japonicum* TlpA (blue), *M. tuberculosis* DsbE (sky blue), *B. japonicum* CcmG/DsbE (light blue) and *E. coli* CcmG/DsbE (white). The different order of the β -strands observed in Trx1 leads to the absence of an α -helix equivalent to α_2 of Dom1_{PILB} and CMPs. As a result, the loop (shown in green) runs directly from the strand equivalent to β_2 towards α_3 in this protein.

the first one between the main-chain oxygen of Leu100 and nitrogen N ^{ϵ 1} of Trp66, the second one between oxygen atoms O ^{ϵ 2} of Glu102 and O ^{γ} of Ser65 and the last one between oxygen O ^{ϵ 1} of Glu102 and main-chain nitrogen of Ser65, maintain this loop tightly.

Discussion

Overall structure

The periplasmic protein PilB from the *Neisseria* genus is composed of three domains. The N-terminal Dom1_{PILB}, which possesses a CX₁X₂C

motif, is followed by two other domains: the central domain displays a type-A while the C-terminal domain shows a type-B methionine sulfoxide reductase activity. As *E. coli* Trx1 does efficiently, Dom1_{PILB} is able to reduce the oxidized forms of these two Msr domains *in vitro* but with a higher efficiency toward the MsrB domain.³ Consistently with these properties, the overall architecture of Dom1_{PILB} classifies this protein in the large structural family of proteins the structure of which is based on the canonical Trx-fold. This motif is subjected to many variations, including permutations of the secondary structures.²⁴ With this respect, Trx and Dom1_{PILB} belong to the same subclass. However, these proteins display

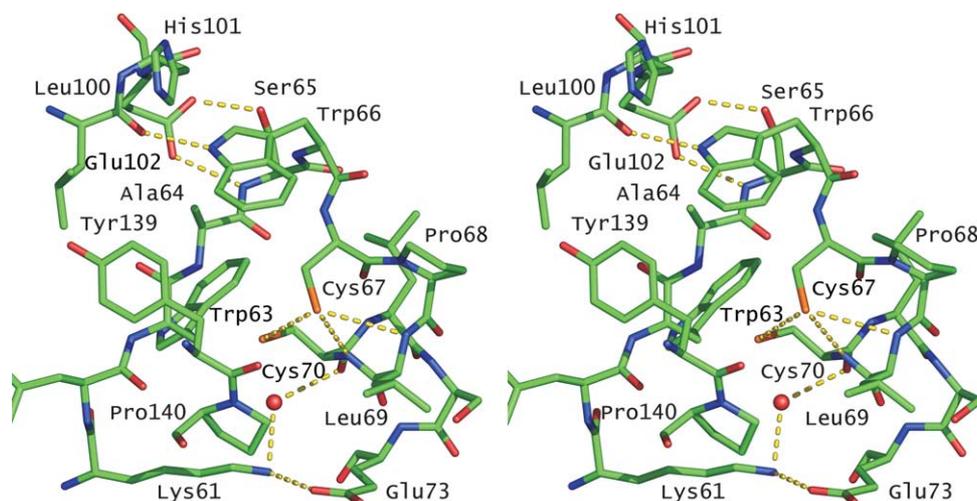


Figure 6. Stereoscopic view of the active site of Dom1_{PILB}. The broken lines represent the hydrogen bonds observed between residues, while the small sphere represents the water molecule observed in the vicinity of Cys70.

insertions that take place at different positions. Indeed, in agreement with its cellular localization and with sequence similarities, Dom1_{PILB} possesses additional features comparable to those observed for CMPs, a group of periplasmic proteins which conserve the CX₁X₂C motif of Trxs and was proposed to be the evolutionary link between peroxiredoxins and their Trx-like ancestors.¹⁷ The ResA protein from *B. subtilis*,⁸ the CcmGs/DsbEs from *B. japonicum*¹⁸ and from *E. coli*¹⁹ which are highly specific disulfide reductases essential for cytochrome *c* maturation, TlpA from *B. japonicum* involved in the biogenesis of cytochrome *aa3*,¹⁵ and an unusual DsbE from the Gram positive *M. tuberculosis*¹⁶ are found to be the closest structural homologues of Dom1_{PILB} (Figures 1 and 4(a)).

Active site

The Dom1_{PILB} structure reveals different environments of the two cysteine residues of the CX₁X₂C motif (Figure 6) which are consistent with the pK_a values attributed to Cys67 (<6) and Cys70 (9.3).³ Indeed, the thiolate form of the catalytic cysteine Cys67 is stabilized by three types of interactions: (i) the dipole of helix α_1 at the N terminus of which the CPLC sequence resides; (ii) a tight hydrogen bond with the Cys70 side-chain; and (iii) two hydrogen bonds with the main-chain nitrogen of residues 69 and 70. On the contrary, the resolving cysteine Cys70 lies in a hydrophobic pocket, i.e. in an environment favoring its thiol form.

Attempts to correlate the pK_a value of the catalytic cysteine and the redox potential of disulfide oxidoreductases were undertaken. In particular, values obtained on variants of *E. coli* Trx1²⁵ (which behaves as a reductant with a redox potential of -0.270 V and a pK_a value of its catalytic cysteine ~ 7.1) and of *E. coli* DsbA^{26,27} (a periplasmic Trx-like protein with a redox potential of -0.125 V and a pK_a value of its catalytic cysteine ~ 3.4) satisfy a qualitative correlation in which the lower the pK_a, the stronger is the oxidizing power. In accord with this proposal, *M. tuberculosis* DsbE with a redox potential of -0.128 V and an associated pK_a value of its catalytic cysteine residue of 5.0¹⁶ acts as an oxidant, while *E. coli* CcmG/DsbE is a reductant, with a redox potential ~ -0.2 V and a pK_a value of 6.8.^{19,28} For *B. japonicum* DsbE,²⁹ *B. japonicum* TlpA³⁰ and *B. subtilis* ResA,³¹ their redox potential values favor a role of reductant *in vivo*. However, the unpublished pK_a values of their catalytic cysteine residue prevent further analysis of the possible relationship with their redox potential.

The fact that Dom1_{PILB} displays a redox potential of -0.232 V,³ behaves as a reductant but has a pK_a value of its catalytic Cys67 lower than 6 is not in accord with the prediction derived from the results obtained on *E. coli* Trx1 and DsbA. Dom1_{PILB} is another example that the value of the redox potential does not necessarily correlate with the catalytic cysteine pK_a value, as pointed out from

other studies.^{32–34} Therefore, the level of stabilization of the thiolate form of the catalytic cysteine (and consequently its pK_a value) is likely not the sole determinant of the redox behavior in disulfide oxidoreductases. In that context, the reasons why Dom1_{PILB} acts as a reductant probably reside in the network of interactions observed within the active site or flanking it. Differences between the oxidized and the reduced forms of Dom1_{PILB} could favor a conformation of the active site under the disulfide state. Among these interactions, Goulding and co-workers¹⁶ highlighted the possible role of a pair of interacting side-chains of DsbEs. The stabilization resulting from this interaction could contribute to favor a preferred conformation of the active site loop, corresponding to either the oxidized or the reduced state. In Dom1_{PILB}, the amino acid pair is composed of Lys61 and Glu73. In the structure of the reduced form, the fact that the length of the hydrogen bond shared by these side-chains is 2.8 Å strongly suggests that this pair does not contribute to favor the stabilization of the oxidized form *versus* the reduced form of Dom1_{PILB}. In that context, knowledge of the structure of the oxidized form of Dom1_{PILB} would be informative.

Role of residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ in the loop Ser96 to Gly106

The comparison between the overall fold of Dom1_{PILB} and the structures of Trx and CMPs highlighted the presence of residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ (Figures 1, 4 and 5) that constitute a representative feature of Dom1_{PILB}. This raises the question of whether these residues are involved in binding of the Dom1_{PILB} partners (i.e. the oxidized Msrs and/or the unknown recycling partner). In the absence of any structural information about a complex between Dom1_{PILB} and its partners, the available data on Dom1_{PILB}-related CMP proteins in complex with a partner have been analyzed. The only known structure corresponds to *E. coli* CcmG/DsbE linked to the N-terminal domain of its recycling DsbD partner, *via* a mixed disulfide bond.¹⁹ Superimposing Dom1_{PILB} on CcmG/DsbE reveals that the region ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ would lead to steric clashes with DsbD. Thus, this would prevent binding of a partner positioned similarly to DsbD. This is consistent with the non-conservation, in Dom1_{PILB}, of the residues located at the CcmG/DsbE surface and quoted as important for the interaction with DsbD.¹⁹ Since Dom1_{PILB} and *E. coli* Trx1 are both able to recycle the Msr domains of PilB, it is reasonable to envisage a similar binding of the oxidized Msr domains to *E. coli* Trx1 and to Dom1_{PILB}. No three-dimensional structure of a complex between *E. coli* Trx1 and a protein partner regenerated by Trx1 is available in the PDB, so far. However, two structures have been determined in which the human Trx, highly similar to *E. coli* Trx1, forms a mixed disulfide bridge with peptides corresponding to fragments of the NF κ B³⁵ and Ref-1³⁶ proteins. Furthermore, the structure of the

complex between the *E. coli* Trx1 and its regenerating partner, the Trx reductase, has also been determined.³⁷ From the superimposition between Dom1_{PILB} and the Trx of these structures, a conclusion emerges that the cavity which exists in Trx between the C-terminal ends of β_2 and β_3 , the N-terminal end of β_4 , and the α -helix connecting β_3 to β_4 (see Figure 2 for secondary structure numbering) is closed in the reduced form of Dom1_{PILB} by residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ of the loop Ser96 to Gly106 connecting β_2 to α_2 (Figure 4(b)). In the structures of the three complexes analyzed, the cavity of Trx accommodates an aromatic side-chain of the partner. This cavity seems to constitute an anchoring point that favors an efficient positioning of the partner relative to Trx. In the reduced form of Dom1_{PILB}, the presence of residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ makes this area inaccessible. Either Dom1_{PILB} would not be able to accommodate the Msr domains in the same way as Trx, and the target protein should find other anchoring interactions to Dom1_{PILB}, or the loop that contains residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ has to undergo a large conformational change in order to uncover the region near Trp66 which flanks the active site and on which the partners seem to rest in Trx.

The conformation observed for the loop Ser96 to Gly106, and in particular for residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎, is stabilized by hydrogen bonds which involve the side-chains of residues Ser65, Trp66 and Glu102 (Figure 6). The fact that these residues are conserved in Dom1_{PILB} not only from *N. gonorrhoeae* but also from *F. nucleatum*, which displays only 30% sequence identity compared to its *Neisseria* Dom1_{PILB} counterpart, supports a functional role for residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎. In that context, it is important to note that Dom1_{PILB} from *N. meningitidis* is not able to recycle the oxidized form of the MsrB from *E. coli* in contrast to the *E. coli* Trx1 which efficiently recycles both oxidized Msrs from *N. meningitidis* and *E. coli* (unpublished results). Such a selectivity of Dom1_{PILB} towards the *Neisseria* MsrB domain could involve residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎. An alternative role of these residues would be to promote a selective interaction between the oxidized form of Dom1_{PILB} and its recycling partner, not known at present, in the *Neisseria* periplasm.

Conclusion

The N-terminal domain of PilB displays a Trx-fold, as expected from the fact that it fulfils the same role as *E. coli* Trx1 towards the Msr domains of PilB, *in vitro*. The X-ray structure, however, shows a topology more similar to CMPs, a subfamily of the disulfide oxidoreductases which is involved in the cytochrome maturation pathways. Dom1_{PILB} is specific to the *Neisseria* Msr domains. The structural reasons of this specificity remain to be investigated. In this context, residues ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎ which cover one edge of the active site, appear to be a distinctive feature of the *Neisseria* Dom1_{PILB}. The structure

determination of complexes between Dom1_{PILB} and either the MsrA or MsrB domain of PilB linked by a mixed disulfide bond would highlight the amino acids involved in the interactions of Dom1_{PILB} with its partners, and could allow analyzing the role of the loop ⁽⁹⁹⁾FLHE₍₁₀₂₎. In the same way, identification of the protein partner involved in the recycling of the oxidized form of Dom1_{PILB}, and structure determinations of the oxidized form of Dom1_{PILB} and of its complex with its partner would be also informative.

Materials and Methods

Sequence and structure alignments

The search for sequences homologous to Dom1_{PILB} has been performed with BLASTP,³⁸ using residues from 33 to 175 of the PilB sequence of serogroup-A *N. meningitidis*, deposited in the Universal Protein Resource (UniProt) database³⁹ with the entry name MSRAB_NEIMA (accession number Q9JWM8). The sequences of the UniProt and of the PDBSeq databases (corresponding to the sequences of proteins the three-dimensional structures of which are deposited in the PDB⁷) have been screened in two different analyses.

The search for proteins that display a fold similar to that of Dom1_{PILB} has been performed using DALI (version 2.0¹³) and VAST.¹⁴ The solutions were ordered according to their Z-score in the first case⁴⁰ and to their VAST-score in the second case.¹⁴ Superimpositions of the selected structures were performed using the option BRUTE of the program LSQMAN from the DEJAVU package,⁴¹ using the default parameters proposed by the author.

Preparation of protein samples

The native form of the enzyme used in the present crystallographic work corresponds to residues from 33 to 175 of the PilB sequence (the sequence numbering is the same as the one used by Wu *et al.*³). After overexpression and purification using the protocol described by Wu *et al.*,³ a molecular mass of 15,829 (± 3) Da was determined by mass spectrometry, in good agreement with the 15,832 Da predicted from the Dom1_{PILB} DNA sequence assuming the presence of the N-terminal Met residue.

Since the sequence does not contain methionine residues that could allow the efficient preparation of a selenomethionine-containing derivative of the enzyme, a double mutant L100M/S158M has been prepared. From sequence similarities with proteins of known structures, these positions were chosen, since they are predicted to be located at the surface of the protein, so that the substitution has no structural consequence. The Quik-Change mutagenesis kit (Stratagene) has been used to introduce the mutations in the pETNterPilB plasmid. *E. coli* strain B834(DE3) containing the pETNter-PilB_{L100M/S158M} plasmid was cultured as described by Ramakrishnan *et al.*⁴² and was used as a source of [SeMet]Dom1_{PILB}. The purification of [SeMet]Dom1_{PILB} was performed following a procedure similar to that described for Dom1_{PILB}. The presence of a unique protein population was verified by electrospray mass analysis. The observed molecular mass of 16,033 (± 3) Da was in good agreement with a full substitution of the three

methionine residues by selenomethionines in [SeMet]Dom1_{PILB}.

The two proteins purified under their reduced form were dialyzed in a 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer prior to the crystallization experiments.

Crystallization trials

The native form of Dom1_{PILB} has been crystallized using the microbatch-under-oil method, set up in 96 well boxes pre-filled with a thin film of paraffin oil and stored at 20 °C. Drops consisted of 2 µl of the protein solution concentrated at 6 mg/ml mixed with 2 µl of various crystallization solutions. The screening kits of the Jena Biosciences company have been tested. The JBS6-D6 condition containing 3.5 M of unbuffered ammonium sulfate (resulting in a measured pH of 7.5 once it is mixed with the Tris buffer used for protein dialysis) led to monoclinic crystals of approximate size 50 µm × 100 µm × 250 µm within 15 days.

Crystallization of [SeMet]Dom1_{PILB} has been achieved using the vapor-diffusion method in hanging drops, set up in Linbro 24 well tissue-culture plates, and stored at 20 °C. The droplets were composed of 2 µl of the protein solution at 6 or 4 mg/ml and 2 µl of a precipitant solution made of 3.5 M ammonium sulfate and 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5). The wells contained 700 µl of the precipitant solution. Seven days were necessary to obtain tetragonal crystals with approximate dimension 40 µm × 80 µm × 250 µm.

Collections of X-ray diffraction data of the Dom1_{PILB} crystals

Native monoclinic crystals were taken from the droplets with Hampton-Research cryo-loops, and briefly immersed into paratone oil, prior to their flash freezing into a nitrogen gas stream at 100 K. A complete data set has been collected from a single crystal using a synchrotron radiation with a wavelength of 0.81 Å, on the EMBL X11 beamline at the DORIS storage ring, DESY, Hamburg. DENZO and SCALEPACK⁴³ were used to process and scale the raw data up to 1.9 Å resolution. Details of the final data set are given in Table 1.

The [SeMet]Dom1_{PILB} tetragonal crystals have been first transferred in a solution containing 20% (v/v) of glycerol and 80% of the precipitant solution, and then flash-frozen at 100 K. Diffraction data were collected from a single crystal on the EMBL BW7A beamline at the DORIS storage ring, DESY, Hamburg, using a wavelength of 0.975 Å near the K-edge of the selenium absorption profile. Data processing and scaling were done using the same software as for the native case and resulted in a complete data set at 2.6 Å resolution (Table 1).

Structure solution

From the data set collected on the tetragonal [SeMet]Dom1_{PILB} crystal, an interpretable map and a partial model were first obtained using the SAD protocol of Auto-Rickshaw, an automated crystal structure determination pipeline.⁴⁴ It combined SHELXD⁴⁵ which located two of the three selenium atoms present in the asymmetric unit, MLPHARE⁴⁶ for initial phasing, DM⁴⁷ for density modification, ESSENS⁴⁸ to identify and position α -helices in the structure, and finally ARP/wARP⁴⁹ to complete the model building. However, due to the data set resolution limited to 2.6 Å, only 50% of the

model was obtained after ten cycles. The PDB files produced by ARP/wARP at each building cycle were used for manual assembling on the graphics. Once the model completion reached 90%, rigid-body, positional and *B*-factor refinements were then performed using the protocols implemented in CNS (version 1.0¹⁰). The resulting model was used as the search model in a molecular replacement procedure using MOLREP⁵⁰ and the data set collected from the native monoclinic crystals of wild-type Dom1_{PILB} at 1.9 Å resolution. Automatic rebuilding with ARP/wARP resulted in a correct 99% complete model. Its further improvement was achieved by iterative combination of manual building with Turbo-Frodo⁵¹ and refinement using CNS. The final model contains 143 amino acid residues corresponding to residues from Val33 to Leu175. *R* and *R*_{free} factors are 19.9% and 22.4%, respectively. Further statistics are given in Table 2.

Figures 3, 5 and 6 were prepared using PyMol[†], while Figure 4 has been drawn using MolMol version 2K.2.⁵²

Protein Data Bank accession number

The atomic coordinates and structure factors for the Dom1_{PILB} structure have been deposited with the RCSB Protein Data Bank, entry code 2FY6.

Acknowledgements

We warmly thank C. Didierjean and C. Corbier for their fruitful contribution to the numerous discussions we had about this article and C. S. Koh for careful reading of the manuscript. We are very grateful to the DESY-team in Hamburg for providing us an access to beamlines X11 and BW7A, and for their help during data collections. We also thank Dr A. Van Dorsselaar for mass determination. F. M. R. and F. N. were fellows of the French Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies (MRNT). J. W. was supported by a postdoc fellowship from the University Henri Poincaré Nancy I (UHP). This work was financially supported by the European Community - Research Infrastructure Action under the FP6 Structuring the European Research Area Programme contract number RII3/CT/2004/5060008, the Centre National de la Recherche Scientifique, the French MRNT, the Actions Concertées Incitatives (ACI) BCMS047 of the French MRNT, the UHP and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie.

References

1. Skaar, E. P., Tobiasson, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F. *et al.* (2002). The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 10108–10113.

[†] DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002), <http://www.pymol.org>

2. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A. & Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PilB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12016–12022.
3. Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2005). The N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide. *J. Biol. Chem.* **280**, 12344–12350.
4. Tapsall, J. (2002). Current concepts in the management of gonorrhoea. *Exp. Opin. Pharmacother.* **3**, 147–157.
5. Antignac, A., Ducos-Galand, M., Guiyoule, A., Pirès, R., Alonso, J.-M. & Taha, M.-K. (2003). *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive infections in France (1999–2002): phenotypes and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 912–920.
6. Kapatal, V., Anderson, I., Ivanova, N., Reznik, G., Los, T., Lykidis, A. *et al.* (2002). Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain. *J. Bacteriol.* **184**, 2005–2018.
7. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H. *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235–242.
8. Crow, A., Acheson, R. M., Le Brun, N. E. & Oubrie, A. (2004). Structural basis of redox-coupled protein substrate selection by the cytochrome *c* biosynthesis protein ResA. *J. Biol. Chem.* **279**, 23654–23660.
9. Laskowsky, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 282–291.
10. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography & N.M.R. system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
11. Ramakrishnan, C. & Ramachandran, G. N. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformation. *Biophys. J.* **5**, 909–933.
12. Eklund, H., Gleason, F. K. & Holmgren, A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **11**, 13–28.
13. Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123–138.
14. Gibrat, J. F., Madej, T. & Bryant, S. H. (1996). Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 377–385.
15. Capitani, G., Rossmann, R., Sargent, D. F., Grutter, M. G., Richmond, T. J. & Hennecke, H. (2001). Structure of the soluble domain of a membrane anchored Trx-like protein *Bradyrhizobium japonicum* reveals unusual properties. *J. Mol. Biol.* **311**, 1037–1048.
16. Goulding, C. W., Apostol, M. I., Gleiter, S., Parseghian, A., Bardwell, J., Gennaro, M. & Eisenberg, D. (2004). Gram⁺ DsbE proteins function differently from Gram⁻ DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 3516–3524.
17. Copley, S. D., Novak, W. R. P. & Babbitt, P. C. (2004). Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry*, **43**, 13981–13995.
18. Edeling, M. A., Guddat, L. W., Fabianek, R. A., Thony-Meyer, L. & Martin, J. L. (2002). Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure*, **10**, 973–979.
19. Stirnimann, C. U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Gruetter, M. G., Glockshuber, R. & Capitani, G. (2005). Structural basis and kinetics of dsbd-dependent cytochrome *c* maturation. *Structure*, **13**, 985–993.
20. Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure*, **2**, 853–868.
21. Kerr, K. A., Ashmore, J. P. & Koetzle, T. F. (1975). A neutron diffraction study of L-cysteine. *Acta Crystallog. sect. B*, **31**, 2022–2026.
22. Adman, E., Watenpaugh, K. D. & Jensen, L. H. (1975). NH⁺S hydrogen bonds in *Peptococcus aerogenes* ferredoxin, *Clostridium pasteurianum* rubredoxin, and Chromatium high potential iron protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4854–4858.
23. Gregoret, L. M., Rader, S. D., Fletterick, R. J. & Cohen, F. E. (1991). Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **9**, 99–107.
24. Qi, Y. & Grishin, N. V. (2005). Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **58**, 376–388.
25. Mössner, E., Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* **7**, 1233–1244.
26. Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. & Bardwell, J. C. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**, 947–955.
27. Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998). A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Fold. Des.* **3**, 161–171.
28. Li, Q., Hu, H. & Xu, G. (2001). Biochemical characterization of the thioredoxin domain of *Escherichia coli* DsbE protein reveals a weak reductant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 849–853.
29. Fabianek, R. A., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., Künzler, P., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (1997). Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as reductant in the biogenesis of *c*-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4467–4473.
30. Loferer, H., Wunderlich, M., Hennecke, H. & Glockshuber, R. (1995). A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **270**, 26178–26183.
31. Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L. & Le Brun, N. E. (2003). *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 17852–17858.
32. Jacobi, A., Huber-Wunderlich, M., Hennecke, J. & Glockshuber, R. (1997). Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. Influence of electrostatic interactions on stability and redox properties. *J. Biol. Chem.* **272**, 21692–21699.
33. Chivers, P. T., Prehoda, K. E. & Raines, R. T. (1997). The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry*, **36**, 4061–4066.

34. Moutevelis, E. & Warwicker, J. (2004). Prediction of pKa and redox properties in the thioredoxin superfamily. *Protein Sci.* **13**, 2744–2752.
35. Qin, J., Clore, G. M., Poindexter-Kennedy, W. M., Huth, J. R. & Gronenborn, A. M. (1995). Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NFkB. *Structure*, **3**, 289–297.
36. Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Kuszewski, J. & Gronenborn, A. M. (1996). The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure*, **4**, 613–620.
37. Lennon, B. W., Williams, C. H., Jr & Ludwig, M. L. (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, **289**, 1190–1194.
38. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402.
39. Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S. *et al.* (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucl. Acids Res.* **33**, D154–D159.
40. Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (1998). Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng.* **11**, 739–747.
41. Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997). Detecting folding motifs and similarities in protein structures. *Methods Enzymol.* **277**, 525–545.
42. Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. & Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, **362**, 219–223.
43. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
44. Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. (2005). Auto-Rickshaw—an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallog. sect. D*, **61**, 449–457.
45. Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallog. sect. D*, **58**, 1772–1779.
46. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 760–763.
47. Cowtan, K. (1994). Dm: an automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on protein crystallography*, **31**, 34–38.
48. Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997). Template convolution to enhance or detect structural features in macromolecular electron-density maps. *Acta Crystallog. sect. D*, **53**, 179–185.
49. Perrakis, A., Morris, R. J. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* **6**, 458–463.
50. Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallog.* **30**, 1022–1025.
51. Roussel, A. & Cambillau, C. (1991). *The TURBO-FRODO Graphics Package Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, vol. 81, Silicon Graphics, Mountain View, USA p. 86.
52. Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MolMol: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55.
53. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metoz, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305–308.
54. Weiss, M. S. & Hilgenfeld, R. (1997). On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-Ray data. *J. Appl. Crystallog.* **30**, 203–205.

Edited by R. Huber

(Received 3 November 2005; received in revised form 8 February 2006; accepted 9 February 2006)
Available online 28 February 2006

Annexe 2

Publication

Ranaivoson F.M., Antoine M., Kauffmann B., Boschi-Muller S., Aubry A., Branlant G., Favier F.

“A structural analysis of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*.”

Prêt à soumettre dans *J Mol Biol*.

**A STRUCTURAL ANALYSIS OF THE CATALYTIC MECHANISM OF
METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE A FROM *Neisseria
meningitidis***

Fanomezana M. Ranaivoson¹, Mathias Antoine², Brice Kauffmann^{1,3}, Sandrine Boschi-Muller², André Aubry^{1,4}, Guy Branlant^{2*} and Frédérique Favier^{1*}

1: LCM3B, Equipe Biocristallographie, UMR 7036 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

2: MAEM, Equipe Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

3: New address: Institut Européen de Chimie et de Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France

4: New address: Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire LCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, BP451, 54001 Nancy cedex, France

*** Corresponding authors:**

Frédérique Favier, LCM3B, Equipe Biocristallographie, UMR 7036 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France; Tel: 33-3-83-68-48-79; Fax: 33-3-83-40-64-92; E-mail: frederique.favier@lcm3b.uhp-nancy.fr

Guy Branlant, MAEM, Equipe Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France ; Tel 33-3-83-68-43-04 ; Fax 33-3-83-68-43-07 ; E-mail : guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr

Running title: Structures of *N. meningitidis* MsrA

Keywords: Methionine sulfoxide reductase; X-Ray structure; Catalytic mechanism; Disulfide bridge; Sulfenic acid

Subject Area to which this manuscript is best suited: Protein and acid nucleic structure, function and interactions.

Summary:

The methionine sulfoxide reductases (Msr) are thioredoxin-dependent oxidoreductases that catalyse the reduction of the sulfoxide function of the oxidized methionine residues. These enzymes have been shown to regulate life span in a wide range of microbial and animal species, and to play a role as physiological virulence determinant of some bacterial pathogens. There exist two structurally-unrelated classes of Msrs, called MsrA and MsrB, with opposite stereoselectivity towards the *R* and *S* isomers of the sulfoxide function, respectively. Both Msrs share a similar three-step chemical mechanism including 1) the formation of a sulfenic acid intermediate on the catalytic Cys with the concomitant release of the methionine product, 2) the formation of an intramonomeric disulfide bridge between the catalytic and the regenerating Cys and; 3) the reduction of the disulfide bridge by thioredoxin or its homologues. In this study, four structures of the MsrA domain of the PilB protein from *Neisseria meningitidis* (nmMsrA), representatives of four catalytic intermediates of the MsrA catalytic cycle, have been determined by X-Ray crystallography: the free reduced form, the Michaelis-like complex, the sulfenic acid intermediate and the disulfide oxidized forms. They reveal a conserved overall structure up to the formation of the sulfenic acid intermediate, while a large conformational switch is observed in the oxidized form. The results are discussed in relation to what has been proposed from enzymatic, NMR and theoretical chemistry studies. In particular, the substrate specificity and binding, the catalytic scenario of the reductase step and the relevance and the potential role of the large conformational change observed in the oxidized form are discussed.

Abbreviations:

Ac-Met-*S*-SO-NHMe, *L*-methionine *S*-sulfoxide with its amino and carboxylic ends linked by amide bonds to an acetyl and a methyl amine groups, respectively.

Ac-Met-*R,S*-SO-NHMe, mixture of Ac-Met-*S*-SO-NHMe and its diastereomer Ac-Met-*R*-SO-NHMe

DTT, dithiothreitol;

MetSO, *L*-methionine sulfoxide;

Met-*S*-SO, *L*-methionine-*S*-sulfoxide;

Met-*R*-SO, *L*-methionine-*R*-sulfoxide;

Msr, methionine sulfoxide reductase;

nmMsrA, the MsrA domain from *Neisseria meningitidis* PilB used in this study;

nmMsrA_{red}, reduced form of the nmMsrA;

nmMsrA_{MetSO}, C51S nmMsrA in complex with Ac-Met-*S*-SO-NHMe;

nmMsrA_{CysOH}, C198S nmMsrA in which C51 is under sulfenic acid state;

nmMsrA_{ox}, oxidized (Cys51-Cys198) form of nmMsrA;

rms, root mean square;

rmsd, rms deviation;

Introduction:

Methionine residues of proteins are readily oxidized to methionine sulfoxide (MetSO), especially under oxidative stress conditions. Methionine sulfoxide reductases (Msr, EC 1.8.4.6) regenerate MetSO back to methionine, preferentially included in proteins. Msrs are thus considered to play a major role in the protection of organisms against oxidative damages^{1; 2}. Oxidation of methionine into MetSO results in the formation of two stereoisomers at the sulfur of the sulfoxide function. There exists two structurally-unrelated classes of Msrs called MsrA and MsrB. MsrAs are specific for Met-S-SO³, while MsrBs reduce Met-R-SO⁴.

In *Neisseria*, MsrA and MsrB are not isolated proteins but constitute the central and the C-terminal domain of a periplasmic protein named PilB, involved in survival against reactive oxygen species^{5; 6; 7}. The N-terminal domain has a thioredoxin/DsbE-like fold⁸ and was shown to reduce the oxidized forms of the MsrA and MsrB domains *in vitro*⁹. Although structurally distinct, MsrA and MsrB share a common three-step catalytic mechanism^{5; 10; 11; 12} (Figure 2). Enzymatic studies previously showed that the MsrA domain possesses two essential cysteine residues at position 51 and 198^{5; 13} (amino acid numbering based on the sequence alignment with the *Escherichia coli* MsrA chosen as reference, see Figure 1). The first step of the catalytic mechanism, called the reductase step, allows the substrate reduction, thanks to the attack of activated Cys51 onto the sulfoxide function, followed by the rearrangement of the transition state postulated to be of sulfurane type which leads to the product release and the formation of the sulfenic acid form on Cys51^{14; 15} (Figure 2). The second step consists of the formation of an intra disulfide bridge between the catalytic Cys51 and the regenerating Cys198. Finally, in the last step, the disulfide bridge is reduced by thioredoxin in order to regenerate the reduced form of the Msr. In the case of the *N. meningitidis* domain, it is the N-terminal domain which bears the Trx-like function. A similar mechanism was shown to occur for the MsrB.

The first MsrAs the three-dimensional structures of which have been determined, the bovine¹⁶ and the *Escherichia coli* enzymes^{17; 18}, make use of a third cysteine residue at position 206 that is involved as a relay to form a consecutive internal disulfide bridge in the regenerating step process (Figure 2). The recent structure of the poplar MsrA also revealed three cysteines involved in the catalytic cycle¹⁹. Finally, the *Mycobacterium tuberculosis* MsrA²⁰ ends our current structural knowledge of MsrAs. Among the already known structures, it is the only case that involves two

cysteines, however with a peculiar sequence motif around Cys198. The X-ray MsrA structures all revealed the presence of adducts in the active site, in particular a methionine residue from a neighboring monomer in the *M. tuberculosis* case. Recently, the amino acids involved in the substrate specificity and in the catalysis of the reductase step of the *N. meningitidis* MsrA domain have been characterized by molecular enzymology approaches^{14; 21}. A scenario of the catalysis of the reductase step has been proposed¹⁴. In all the X-ray structures solved so far, the distance between Cys51 and Cys198 is too large to allow the formation of the intramolecular disulfide bridge. Altogether, this supports the existence of a conformational switch occurring before or through the disulfide bridge formation.

Here, we present the structure of the four catalytic forms of the *N. meningitidis* MsrA domain of PilB (nmMsrA) determined by X-ray crystallography. In addition to the free reduced form of the enzyme, three structures that correspond to later stages of the catalytic mechanism are described: i) a Michaelis-like complex between Ac-MetSO-NHMe as a substrate and the C51S nmMsrA, ii) the C198S nmMsrA under sulfenic acid state on Cys51 and, iii) the enzyme under disulfide state. Taking into account all the structural information deduced from the inspection of these four MsrA X-ray structures, the scheme of the events leading to the reduction of MetSO and formation of the sulfenic acid intermediate and of the disulfide bridge is discussed in relation to what has been proposed from enzymatic studies^{5; 13; 14} and from the recent NMR study¹⁷.

Material and Methods:

Amino acid numbering

The MsrA domain in this study corresponds to the product of the truncation of the PilB protein from *N. meningitidis*, beginning with Asn196 and ending at Thr388⁵. In the following text, this domain is named nmMsrA, and its residues are numbered from Asn41 to Thr238 with respect to their alignment with the *Escherichia coli* MsrA sequence (Figure 1). This choice allows an easy comparison between MsrAs and the continuity with the literature that concerns the enzymatic studies on MsrAs.

Preparation of protein samples

The *E. coli* strain used for production of wild-type, C51S and C198S nmMsrAs was BE002 (MG1655 msrA::specW, msrB::a3kana), transformed with a pSKPILBMsrA plasmid

containing the coding sequence of wild-type, C51S and C198S MsrAs, respectively, under the *lac* promoter⁵. Purifications were carried out as previously described¹³. Wild-type and mutated nmMsrAs were pure, as verified by electrophoresis on a 12.5 % SDS-PAGE gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses.

The oxidized form of nmMsrA (nmMsrA_{ox}) was obtained by incubating the wild-type nmMsrA with 100 mM of *D,L*-Met-*R,S*-SO (Sigma) in a Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8 buffer. After 10 min of incubation at room temperature, the substrate in excess and the product were removed from the mixture using an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8 buffer. Oxidation of nmMsrA under the disulfide state was checked by titration with DTNB as previously described¹⁴.

Handling of the crystallization trials

Crystals were obtained using the microbatch-under-oil method, set up in 96 well boxes pre-filled with a thin film of paraffin oil and stored at 20 °C. Drops consisted of 2 µL of the protein solution mixed with 2 µL of various crystallization solutions. The JBScreen Classic Kits of the Jena Bioscience company (JBS) have been tested. The protein and precipitant concentrations given hereafter correspond to initial solutions, prior to mixing. All successful assays provided orthorhombic crystals with similar unit cell parameters.

The wild-type nmMsrA crystallized spontaneously in reduced form (nmMsrA_{red}) using the JBS5-B4 condition (20 % PEG 8000, 0.1 M Na HEPES pH 7.5), at a protein concentration of 18 mg / mL.

To obtain the Michaelis-type complex between nmMsrA and a substrate (nmMsrA_{MetSO}), the C51S nmMsrA at a concentration of 18 mg / mL (840 µM) was co-crystallized Ac-Met-*R,S*-SO-NHMe at a concentration of 200 mM (prepared as described by Olry and coworkers⁵). AcMetSONHMe was used instead of MetSO because MsrA displays a better affinity for AcMetSONHMe⁵. Crystals grew in the JBS1-C1 condition (30 % PEG 550 MME, 0.1 M Bicine pH 9, 0.1 M sodium chloride).

The C198S nmMsrA crystallized in the JBS1-D1 condition (30 % PEG 1500), using protein concentration of 31 mg/mL (1.43 mM). To let the enzymatic reaction progress until formation of the sulfenic acid intermediate (nmMsrA_{CysOH}), the resulting crystals have been soaked in a mixture of

the mother solution and dimethyl-sulfoxide (~300 mM final) overnight before their flash cooling at 100 K and the data collection.

Crystals of nmMsrA_{ox} were harvested in the JBS3-D4 condition (30 % PEG 4000, 0.2 M ammonium sulfate, sodium acetate pH 4.6), using an enzyme concentration of 10 mg / mL.

Collections of X-ray diffraction data

The diffraction data have been collected from single crystals, using a rotating anode (Nonius FR591) and a DIP2030 image plate detector for the nmMsrA_{red} crystal, and using synchrotron radiation for the three other crystals. The nmMsrA_{MetSO} data set has been collected on beamline X11 (wavelength 0.81 Å) at the DESY (Hamburg), and the nmMsrA_{CysOH} and nmMsrA_{ox} data sets have been collected at the ESRF (Grenoble), on beamline BM30A (wavelength 0.92 Å) and beamline BM14 (wavelength 0.89 Å), respectively. Crystals were taken from the droplets using Hampton-Research cryo-loops and were flash-frozen into a nitrogen gas stream before data collections. DENZO and SCALEPACK²² were used to process and scale the nmMsrA_{red} and nmMsrA_{MetSO} raw data sets up to 2.0 Å, and 2.24 Å resolutions, respectively. XDS²³ was used to process and scale the nmMsrA_{CysOH} and the nmMsrA_{ox} raw data sets up to resolutions of 2.00 Å and 1.95 Å, respectively. A detailed description of the final data sets is given in table 1.

From the diffraction data to the final models

The nmMsrA_{red} structure has been solved by molecular replacement using the structure of the *M. tuberculosis* MsrA structure as the model (PDB entry 1NWA²⁰). The three other nmMsrA structures were derived from nmMsrA_{red}. The molecular replacement processes have been performed with the version 1.0 of the CNS package²⁴, as well as the following steps of rigid body, atomic positional and B-factor refinements. Each refinement process was alternated with manual corrections and building of the models on the graphics, using TURBO-FRODO²⁵.

During the model-building and refinement processes of nmMsrA_{MetSO}, the 3Fo-2Fc and Fo-Fc sigma-A weighted maps started to reveal strong positive peaks of electron density in the region of the active site that could accept the oxygen and the sulfur atoms of the sulfoxide function, as well as the Cε atom of the substrate side chain. The observed configuration of the substrate sulfur atom undoubtedly corresponded to Ac-Met-*S*-SO-NHMe and not its diastereomer Ac-Met-*R*-SO-NHMe, in accordance with the stereospecificity of nmMsrA for the Met-*S*-SO residue⁵, and although the Ac-

Met-*R,S*-SO-NHMe mixture was used in the experiment. The electron density allowed an initial positioning of this substrate that led to reinforce the electron density in the active site. However, the signal remained very confused in the region of the main chain atoms, showing probable multiple conformations of this part of the substrate. The most sensible one was chosen. The 3Fo-2Fc and Fo-Fc simulated-annealing omit maps calculated when omitting the substrate from the refined complex structure confirmed unambiguously the presence of Ac-Met-*S*-SO-NHMe in the active site. In the refinement procedure, the "ideal" geometrical characteristics of Ac-Met-*S*-SO-NHMe were adapted from that of the Met-*R*-SO residue available at HIC-Up²⁶.

In the same way, the geometry of the sulfenic acid form of Cys51 was taken from HIC-Up²⁶.

Model building/refinement of nmMsrA_{ox} revealed a large conformational change. The new position observed for the loop Thr121-Thr132 appeared perfectly defined in the corresponding 3Fo-2Fc omit map. On the contrary, difficulties were encountered to build the C-terminal end, since electron density became very weak from residue 195. Based on the structure of nmMsrA_{red} and on the electron density observed for the disulfide bridge between Cys51 and Cys198, residues from 195 to 198 and from 202 to 210 were included in the model. Indeed, omit maps calculated when omitting residues beyond 194 from the fully-refined nmMsrA_{ox} model confirmed their location, even though the atomic positions of Tyr197 and of the Cys198 main chain remained uncertain.

The statistics on the resulting models are summarized in Table 2. Figure 1 has been prepared using ESPript²⁷ while PyMol[†] has been used for Figure 3, Figure 4, and Figure 5.

Protein Data Bank accession number:

The atomic coordinates and structure factors for the nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO}, nmMsrA_{CysOH} and nmMsrA_{ox} structures have been deposited with the Protein Data Bank entry codes XXX, XXX, XXX and XXX respectively.

Results

Structure solutions and quality of the models

The four nmMsrA structures described in this paper all originate from orthorhombic crystals with similar unit cell parameters and an identical space group, although different crystallization conditions have been used for their growing (see

Material and Methods). nmMsrA spontaneously crystallized under its reduced form. The complex with the substrate was obtained from co-crystallization of the C51S nmMsrA with Ac-Met-*R,S*-SO-NHMe. nmMsrA_{CysOH} was prepared by soaking crystals of the C198S nmMsrA in dimethyl sulfoxide. This *in vitro* MsrA substrate was used instead of a natural substrate for its small size in order to avoid crystal cracking. And finally, nmMsrA_{ox} was obtained from the oxidation of nmMsrA with MetSO, in the absence of any reductant, prior to its crystallization.

The nmMsrA_{red} final model was refined up to a resolution of 2.0 Å. It contains 169 residues corresponding to the sequence from Asn41 to Thr213 completed by an N-terminal Met residue resulting from the protein production. The nmMsrA_{MetSO} model (at a resolution of 2.24 Å) ends with Gly211, the nmMsrA_{CysOH} (2.00 Å resolution) and the nmMsrA_{ox} (1.95 Å resolution) models with Pro210. Indeed, for all of these structures, no electron density is observed for about the last 25 residues neither in the 3Fo-2Fc nor in the Fo-Fc sigma-A weighted electron density maps, indicating an extremely high mobility of the last C-terminal residues in the crystal. These observations could indicate that these residues constitute more probably the linker between the MsrA domain and the following MsrB domain.

Whatever is the considered structure, the sequence ⁽¹⁹⁴⁾PNGYCH₍₁₉₉₎ which includes the regenerating Cys198 – mutated to a serine residue in nmMsrA_{CysOH} – never shows a well-defined electron density when compared to the remaining residues. This observation is correlated to the mean value of the thermal-motion factors associated to this segment, which is at least 1.5 σ above the mean B value calculated for all atoms, in each structure. The better definition of this fragment is observed in nmMsrA_{MetSO}, in particular at Tyr197. On the contrary, this region is poorly defined in nmMsrA_{ox}, especially Tyr197 and the main chain of Cys198 (see Material and Methods).

The nmMsrA reduced form

The nmMsrA_{red} global fold shows no major differences with all other known MsrA structures (Figure 1, Figure 3). Indeed, the largest root mean square distance between the superimposed backbones is observed with bovine MsrA¹⁶ and is only 0.94 Å for 153 C α atoms.

In the C-terminal tail - starting with the sequence ⁽¹⁹⁴⁾PNGYCH₍₁₉₉₎ mentioned in the previous section - the hydroxyl group of Tyr197 forms a hydrogen bond with the carboxyl group of Asp129 (Figure 4, Figure 5). This conserved residue is located in the turn of the short β -hairpin formed by $\beta 3'$ and $\beta 4'$. As observed in the previously solved MsrA structures the side chain of Asp129 is linked to a water molecule also hydrogen

[†] † DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002), <http://www.pymol.org>

bonded to the main chain nitrogen of Cys51. The pair of hydrogen-bonded residues Asp129-Tyr197 forms the entrance of the active site.

The residues of the active site observed in the nmMsrA_{red} structure are positioned similarly to that observed in the *E. coli*, bovine¹⁶, *M. tuberculosis*²⁰ and poplar¹⁹ X-Ray structures. The NMR structure of the *E. coli* MsrA appears as an exception since its Glu94 and Cys51 side chains display unusual orientations¹⁷. It is worth noting that, in nmMsrA_{red}, a slight bulge of electron density near the Cys51 side chain could correspond to the presence of a weak proportion of the rotamer observed in this latter structure. Only the major conformation - i.e. the orientation found in the X-ray structures - was included in the nmMsrA_{red} model.

Phe52 and Trp53 form a hydrophobic pocket on one side of the cavity while the side chains of Tyr82, Glu94 and Tyr134 constitute a local hydrophilic region at the opposite side (Figure 4). All these residues are highly stabilized by interactions with buried conserved residues. At the surface of the active site, the orientation of Tyr197 towards Asp129 is associated with an orientation of the Cys198 side chain back to the active site. Consequently, the distance between the sulfur atoms of Cys51 and Cys198 is 8 Å.

The crystal structure of nmMsrA_{red} reveals the presence of several water molecules stabilized in the active site, in particular Wat1 that interacts with the side chains of Tyr82 (2.6 Å), Glu94 (2.7 Å) and Tyr134 (2.7 Å) (Figure 4). It is also encountered in the four other known MsrA structures and is proposed to reflect the way the oxygen of the sulfoxide function of the substrate could be stabilized²⁰. A second water molecule Wat2 lies near Wat1 (2.9 Å), at 3.5 Å from the sulfur atom S_γ of Cys51. It has no equivalent in the previously solved MsrA structures. Indeed, their active site interacts with extrinsic species, as detailed in the discussion section.

Structure of nmMsrA in complex with the substrate

The overall conformation of nmMsrA_{MetSO} is conserved with respect to the reduced form of the wild type nmMsrA. No noticeable side-chain displacement is observed for the residues of the active site, even in the region of Ser51 that replaces the catalytic cysteine in this structure. The electron density corresponding to the substrate is clearly defined at the side chain, but it reveals a disordered main chain (see the section "Material and Methods" and Figure 4). This observation emphasizes the strong ability of the active site to stabilize the extremity of the substrate side chain. Its terminal C_ε methyl group points towards the hydrophobic pocket formed by Trp53 and Phe52. The C_γ methylene group of Ac-Met-S-SO-NHMe replaces

Wat2 observed in nmMsrA_{red}. These two groups lean against the indol ring of Trp53. The oxygen atom of the sulfoxide function substitutes to the water molecule Wat1 observed in nmMsrA_{red}. Thus, it interacts by hydrogen bonds with Tyr82 and Tyr134 in the same way than does Wat1 in the reduced form. Similarly, the short distance (2.7 Å) between the oxygen atom O_{ε2} of Glu94 and the oxygen atom of the sulfoxide function clearly corresponds to a hydrogen bond, and consequently implies the presence of a proton shared between these two atoms. Thanks to these anchoring points – on one hand, the hydrophobic pocket formed by Trp53 and Phe52, and on the other hand the hydrophilic zone formed by Tyr82, Glu94 and Tyr134 – the sulfur atom of the substrate lies at 3.4 Å from the atom O_γ of Ser51.

On the contrary to the Ac-Met-S-SO-NHMe side chain which finds satisfying stabilizing interactions, the main chain atoms of the substrate appear disordered. However, if this region of the substrate is poorly defined in the electron density, the neighboring residue Tyr197 - observed at the entrance of the active site in interaction with Asp129 - is certainly involved in its binding, as attested by the high quality of the electron density observed at its aromatic ring when compared to the three other structures presented in this paper. The side chain of the neighboring residue Cys198 conserves the location it has in the absence of the substrate.

Structure of nmMsrA with Cys51 under sulfenic acid state

In nmMsrA_{CysOH}, a bulge of the electron density defining the Cys51 side chain was downright interpretable as the hydroxyl group of the sulfenic acid (Figure 4). Consequently, the presence and the conformation of this latter present no ambiguity.

Once again, no overall conformational change is noticed in the structure of nmMsrA_{CysOH}, compared to nmMsrA_{red} and nmMsrA_{MetSO}. Furthermore, no noticeable displacement of the side chains of the active site residues appears necessary to accommodate the presence of the sulfenic acid. No change in the orientation of the Cys51 side chain is observed (Figure 4). The sulfenic oxygen atom O_δ of Cys51 is distant by 3.4 Å from the oxygen atom O_{ε1} of Glu94, while it lies at 2.7 Å from the water molecule Wat2, observed again like in nmMsrA_{red} since the substrate is no longer in the active site. In the same way, Wat1 recovers the interactions it formed in nmMsrA_{red}. The side chain of Ser198 (which substitutes to Cys198 in this MsrA) still conserves the position and orientation Cys198 had in the two previous cases, i.e. the distance between the sulfur atom S_γ of Cys51 and the oxygen atom O_γ of Ser198 is 7.5 Å. Finally,

Tyr197 and Asp129 conserve their position so that they form a hydrogen bond.

The overall conformation of the nmMsrA oxidized form

The nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH} structures show a distance between the sulfur atoms of Cys51 and Cys198 incompatible with the formation of the disulfide bridge. In accordance, a global conformational change is observed in the structure of nmMsrA_{ox} (Figure 5). It affects the C-terminal end, in particular the segment ⁽¹⁹⁴⁾PNGYCH₍₁₉₉₎, the definition of which becomes poor in the electron density, despite the disulfide bridge that constitutes an anchoring point for Cys198. Tyr197 seems highly disordered (see Material & Methods). Its interaction with the Asp129 side chain is lost. This latter is observed in a totally new position, more than 10 Å farther of its location in nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH}. This new conformation arises from a large conformational change of residues Thr121-Thr132 (Figure 5), in which C α ₁₂₈, the most displaced C α atom, is shifted by more than 13 Å. The main chains of the border residues Thr121 and Thr132 act as two hinges, since the modification of ψ_{121} and ψ_{132} by 180 ° and 177 °, respectively, appears to “open” the loop so that it moves away from the active site. The loop Thr121-Thr132 of nmMsrA_{ox} shows a corresponding electron density slightly thinner than in the “closed” conformation of nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH}. This observation is related to the thermal motion factors of the Thr121-Thr132 main chain atoms on average slightly higher than in the “closed” conformation, when compared to the overall mean B factor associated to each model. However, in both cases, the loop interacts with the rest of the protein either directly, or through the mediation of water molecules. Residues Thr121-Thr132 are not involved in crystal packing, neither in the closed nor in the open conformation.

When compared to nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH}, nmMsrA_{ox} shows a reorientation of the Cys51 side chain (Figure 4) *via* a rotation around the C α -C β bond ($\Delta\chi_1 = 90^\circ$), added to a general translation of the Cys51 main chain by ~ 0.6 Å. It results in a displacement of the Cys51 atom S γ of 2.6 Å towards the entry of the active site. Slight movements of amino acids that surround this region are also observed. The largest of them concerns Gln133 (1.1 Å for its atom C δ) and its neighbor Tyr134. Their main chains are slightly displaced, as probably correlated to the conformational change that affects Thr121-Thr132. These movements accompany a similar shift (1.1 Å) of the water molecule Wat1 bound to Tyr82, Tyr134 and Glu94. A new water molecule Wat4, absent from the other nmMsrA structures described

in this paper, is observed at 2.9 Å of the atom O ϵ_2 of Glu94, and at 2.9 Å of Wat1.

The disulfide bridge formed between Cys51 and Cys198 leans against the N-terminal end of α -helix α_1 , i.e. it makes van der Waals contacts with the main chain atoms of residues Trp53 and Gly54 situated in the MsrA conserved sequence ⁵⁰GCFWG⁵⁴ in the loop preceding α_1 . The atom S γ of Cys198 is placed at the position previously occupied by Wat3 observed in nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH}. The weak electron density observed at the atom C β of Cys198 and the lack of density at its main chain as well as at the following residues **seem** to indicate the existence of several conformations of the disulfide bridge. Accessibility of the Cys51 and Cys198 atoms S γ to solvent and hence to thioredoxin for the last stage of the enzyme regeneration appears delicate to evaluate, since the absence of residues 199-201 prevents any reliable measurements in the nmMsrA_{ox} model.

Discussion

Four structures have been solved in this study, corresponding to the four intermediates forms of the MsrA catalytic cycle, i.e. i) the nmMsrA_{red} structure with an active site free from any exogenous species corresponding to the free enzyme; ii) the nmMsrA_{MetSO} structure with a substrate bound within the active site mimicking the Michaelis complex; iii) the nmMsrA_{CysOH} structure, which is the first illustration of the sulfenic acid intermediate structure, and iv) the nmMsrA_{ox} structure under disulfide state. Their comparisons allow a structural insight into the different steps of the catalytic mechanism of nmMsrA.

Substrate binding

The comparison between the structures of nmMsrA_{red} and nmMsrA_{MetSO} shows no significant conformational change of nmMsrA upon substrate binding. The active site of nmMsrA_{red} is thus optimized to bind efficiently the substrate without the requirement for any conformational rearrangement. From these structures, two regions of the active site can be assigned as involved in substrate binding. First, a hydrophobic pocket is formed by residues Phe52 and Trp53. It accommodates the methyl group C ϵ and the methylene group C γ of the MetSO side chain. Second, the site composed of residues Tyr82, Glu94 and Tyr134 interacts with the oxygen atom of the sulfoxide. Indeed, in nmMsrA_{MetSO}, the water molecule Wat1 observed in all the MsrA structures previously solved substitutes for the sulfoxide oxygen of Ac-Met-S-SO-NHMe. The hydrogen bonds with Glu94, Tyr82 and Tyr134 are thus conserved. This situation reflects the stabilization of a highly polarized form of the sulfoxide function of the substrate, as was recently described in the

mechanism proposed by Antoine *et al.*¹⁴ (see next section). The poor electron density observed at the Ac-Met-S-SO-NHMe main chain corresponds to an apparent disorder at this part of the substrate. This situation differs from the observation of Taylor and coworkers in *M. tuberculosis* MsrA²⁰, where the fortuitous presence of a methionine residue coming from an adjacent monomer emphasized the probable role of Asp129 and Tyr197 in the binding of a protein substrate. The first one would establish a hydrogen bond with the main chain nitrogen of the Met-S-SO residue, while the aromatic ring of the second one would stack the N-peptide bond between Met-S-SO and its preceding residue. In the nmMsrA_{MetSO} structure, no such interaction is clearly identified in the electron density. At most, an enhancement is observed for the electron density on the Tyr197 aromatic ring with respect to the nmMsrA_{red} structure. The structure obtained by X-Ray crystallography reflects an average of the multitude of copies present in the crystal. It seems that only a weak proportion of them correspond to a substrate main chain stabilized through interactions with the Asp129-Tyr197 subsite. Altogether, these results are consistent with the recent enzymology studies done by our group²¹. In that context, the structural/molecular factors that contribute to the better binding of protein-bound MetSO rather than free MetSO remain to be characterized.

The formation of the sulfenic acid intermediate

After the binding of the substrate, the catalytic Cys51 attacks the sulfur atom of the sulfoxide and a sulfurane transition state of trigonal bipyramidal-type geometry was proposed to be formed¹⁵, leading to the product release and the formation of the sulfenic acid on Cys51. This implies the activation of the catalytic Cys51 under a thiolate form. In the reduced form of nmMsrA, the pKa of Cys51 is 9.5¹⁴, which means that the macrodipole generated by the α -helix $\alpha 1$ at the N-terminus of which Cys51 lies is not able to decrease it. The absence of any positive side chain in the vicinity of Cys51 and the fact that the pKa value of Cys51 drops to 5.7 upon substrate binding led to suggest that the Cys51 activation is likely due to a substrate-assisted mechanism. In the MsrA/substrate complex, the sulfoxide function bound to MsrA is in a largely polarized form so that the positive or partially positive charge borne by the MetSO sulfur atom stabilizes the thiolate form of Cys51. The nmMsrA_{MetSO} structure supports this scenario since the short distance observed (2.7Å) between the sulfoxide oxygen and the atom O ϵ 2 of Glu94 indicates the presence of a strong hydrogen bond which favors the polarization of the sulfur-oxygen bond of the substrate. In the wild-type MsrA, the proton of Cys51 has been proposed to be transferred to the oxygen of the sulfoxide group concomitantly to substrate binding *via* a direct or

indirect interaction with Glu94¹⁴. However, in the nmMsrA_{MetSO} structure, the origin of the proton should be different since Ser51 has likely not a pKa adapted to the transfer of its proton.

The spatial configuration of the MetSO sulfur atom is constrained by numerous interactions with the side chains of residues of the active site of nmMsrA : Phe52 and Trp53 to the methyl group C ϵ , Trp53 to the methylene group C γ , and Tyr82, Glu94 and Tyr134 to the sulfoxide oxygen. These latter residues stabilize the polarized form of the sulfoxide function of MetSO, so that the sulfur atom bears a positive charge. Altogether, these interactions favor the nucleophilic attack of activated Cys51. The sulfur atom S γ of Cys51 would align with the sulfur and oxygen atoms of the sulfoxide to form an axis where the sulfoxide sulfur would lie between the nucleophilic atom S γ of Cys51 and the nucleofugal oxygen of the substrate. Upon the attack of Cys51, a sulfurane transition state is proposed to be formed. Since they are covalently bound to the catalytic cysteine, the dimethyl-arsenate adduct in the *E. coli* MsrA structure¹⁸, the DTT in the selenomethionine form of the bovine MsrA structure¹⁶ and the β -mercaptoethanol observed in the poplar MsrA structure¹⁹ might mimic the transition state, as was proposed by Taylor and coworkers²⁰. When comparing nmMsrA_{MetSO} to these MsrA structures and having in mind that residue Ser51 mimics the catalytic cysteine of the wild-type enzyme, only minor local rearrangements seem necessary for the formation of a covalent bond between the two partners. Altogether, these structures support the formation of a sulfurane type transition state of trigonal bipyramidal geometry with the sulfur of the thiol and the OH group in apical positions while the two methyl groups and the lone pair are in equatorial positions, as suggested by recent theoretical study for the chemical reduction mechanism of DMSO by thiols¹⁵. In that context, question remains to be addressed on the mechanism which allows the formation of a sulfenic acid of tetrahedral geometry from this sulfurane transition state, the geometry of which is not compatible with a direct shift of the OH group to the sulfur atom of the thiol.

The formation of the Cys51-Cys198 disulfide bridge

It consists of the attack of Cys198 onto the sulfenic form of Cys51, resulting in the formation of a disulfide bridge between these two residues concomitantly to the release of the water molecule. In the structure of nmMsrA_{CysOH}, the environment of Cys51 shows no positively charged side chain that faces the sulfenic group. The protonated state of the Cys51 sulfenic group is likely thus present instead of the sulfenate form that would have required a stabilizing counterpart. The orientation

of the sulfenic group of Cys51 is consistent with its ulterior nucleophilic attack by the regenerating cysteine Cys198. Indeed, its sulfur atom is “offered” to the area which is to be occupied by the side chain of Cys198, considering the probable movement of the C-terminal tail, and particularly of the fragment $_{(194)}\text{PNGYCH}_{(199)}$. In the earlier forms of nmMsrA, this area is occupied by a water molecule Wat3 (Figure 4). It could reflect the ability of this position to accommodate a nucleophilic sulfur atom. On the contrary, the position of Cys198 (mutated to a serine in nmMsrA_{CysOH}) is not suited for its attack onto the Cys51 sulfenic group. Indeed, no change was observed in the region of the C-terminal end in the structure of nmMsrA_{CysOH} with respect to nmMsrA_{red} and nmMsrA_{MetSO}. It means that the distance between residues 51 and 198 is by far too large to allow the formation of the disulfide bridge. This is observed in all the X-ray MsrA structures solved so far: in none of them the cysteine equivalent to Cys198 is observed at a distance suited for bonding to Cys51. The NMR study of the *E. coli* MsrA¹⁷ showed some flexibility of residues 195-204, but however with insufficient amplitude to allow the disulfide bridge to form. Furthermore, Cys198 must be deprotonated prior to its attack on Cys51. No acid/base catalyst is observed in the vicinity of Cys198 (mutated to Ser in nmMsrA_{CysOH}). The closest one, His199, is distant by 5.0 Å from the oxygen O_γ of Ser198. The nucleophilic attack of Cys198 must be accompanied by an acid catalysis, so that the hydroxyl group of the sulfenic acid can be released as a water molecule (Figure 2). In the structure of nmMsrA_{CysOH}, the position of Glu94 is suitable for this residue to help as an acidic assistant, either directly or indirectly *via* the water molecule Wat1. An attractive hypothesis is that Cys198 would give its proton to the nucleofugal hydroxyl group of the Cys51 sulfenic acid in a concerted mechanism, eventually *via* Glu94. However, the unfavorable geometry of the side chains of Cys198 and the hydroxyl group of the Cys51 sulfenic acid in the nmMsrA_{CysOH} structure, disposed opposite to each other with respect to the sulfur atom of Cys51 (Figure 4), prevents a direct transfer to occur between these two groups except a conformational change occurs prior to the formation of the disulfide bridge.

The conformational switch observed upon formation of the nmMsrA oxidized form :

The nmMsrA_{red}, nmMsrA_{MetSO} and nmMsrA_{CysOH} structures all display the same global conformation. It is appropriate to the first step of the catalytic mechanism, *i.e.* the recognition of the Met-S-SO substrate and the reductase catalysis. However, it requires a conformational change for

formation of the disulfide bridge Cys51-Cys198. First, the region of Cys51 from Gly50 to Gly54 undergoes a slight shift that accompanies the movement of Cys51 towards Cys198. Second, a complete reorganization of the backbone in the region of Cys198 allows its side chain to turn back in the direction of Cys51. Although the Cys51-Cys198 disulfide bridge constitutes a strong constraint on the position of Cys198, the contiguous residues remain highly disordered as is attested by the poor definition of this region. The residues of the fragment $_{(194)}\text{PNGYCH}_{(199)}$ already appeared slightly disordered in nmMsrA_{red}, although in a lower extent. The apparent mobility of this region, also noticed in the NMR study of *E. coli* MsrA¹⁷, probably explains how the conformational change can so easily happen so that the formation of the disulfide bridge is not rate-limiting within the whole catalytic process⁵. A movement of the region Thr121-Thr132 simultaneously occurs. Two conformations are to be compared, a first one common to all the nmMsrA structures but nmMsrA_{ox}, which allows the interaction between Asp129 and Tyr197, and which is referred to as the “closed” conformation, and a second one observed in nmMsrA_{ox}, which places Asp129 and Tyr197 far from each other, and which is referred to as the “open” conformation.

The movement of the region Thr121-Thr132 could appear astonishing, since it concerns residues that are far from the vicinity of Cys51 and Cys198. However, it seems correlated to the catalytic mechanism. Indeed, it has been also observed in the NMR study of the Cys51-Cys198 oxidized form of *E. coli* MsrA¹⁷. Several questions emerge from this result. First, when does this change occur? The present results suggest that it is correlated to the formation of the Cys51-Cys198 disulfide bridge, since it is absent in the nmMsrA_{CysOH} structure. But is it concomitant to the formation of the disulfide bridge or does it follow it? In the first case, the constraints imposed on the main chain by the rotation of Cys198 toward Cys51 might disrupt the interaction between Tyr197 and Asp129, so that it releases these latter residues which adopt a new conformation. In the second case, the electrostatic environment of the formed disulfide bridge could repulse Asp129 and the residues that framed it. Furthermore, in the present study, dimethylsulfoxide has been used to prepare the nmMsrA_{CysOH}, in order to allow diffusion of the compound in the crystal. Indeed, when using AcMetSONHMe, diffusion caused crystal cracking. Therefore, one cannot exclude the possibility that a bulkier substrate would have led to an open conformation of residues Thr121-Thr132, as the result of the product release. Another question might help to answer this problem: does the conformational change have a role? Coudevylle and coworkers¹⁷ proposed that the hydrophobic area

exposed to solvent following the displacement of residues Thr121-Thr132 could prepare the coming interaction with Trx at the next step of the regenerating process. The closed conformation observed in nmMsrA_{CysOH} nicely reinforces this hypothesis, since Trx was shown to be unable to efficiently reduce the sulfenic acid intermediate of nmMsrA²⁸. Another argument relies on the possibility to extend the observation made for nmMsrA and *E. coli* MsrA to other MsrAs. Gln126 (the side chain of which is involved in two hydrogen bonds with the core of the enzyme) and Asp129 strictly conserved in all the MsrA sequences participate to the stabilization of the segment in its "closed" conformation. This conformation is thus probably maintained in all the reduced forms of MsrAs, as confirmed by all the structures solved so far. The Thr121-Thr132 sequence displays a high conservation in MsrAs that possess Cys198, so that a conformation similar to the "open" form could exist in the oxidized form of these MsrAs. On the contrary, the sequence of the fragment Thr121-Thr132 strongly differs in MsrAs that possess their regenerating cysteine at position 54. The existence of an "open" conformation in their oxidized form is thus unknown. However, one might suggest that the disulfide bridge Cys51-Cys54 is probably situated in a different environment, owing to the predictable location of Cys54 in the structure, so that the interaction with Trx could differ.

Conclusion :

Different stages of the catalytic mechanism of nmMsrA have been studied through solving four structures. They showed that substrate binding and product release probably do not involve any conformational changes of the enzyme, while large movements have occurred in the oxidized form of nmMsrA. Altogether, these results allow the definition of two distinct parts of the active site. The first one is situated deep into the active site. It is rigid, designed to bind efficiently the Met-S-SO side chain and to allow the reduction of its sulfoxide function. Residues Cys51, Phe52, Trp53, Tyr82, Glu94 and Tyr134 are essential to this function. By contrast, the entrance of the active site is bordered by very mobile residues that are observed under two main conformations. In the first one, Asp129 and Tyr197 form a pair involved in substrate binding, while the Cys198 side chain is far from Cys51. In the second one, a rearrangement of ₍₁₉₄₎PNGYCH₍₁₉₉₎ accompanies the rotation of Cys198 necessary to the formation of the Cys51-Cys198 disulfide bridge. The pair previously observed between Tyr197 and Asp129 is broken. Unexpectedly, the fragment Thr121-Thr132 adopts a totally new position. Sequence analyses and

previous structural results show that the mobility of the C-terminal end and the reorganization of Thr121-Thr132 could be properties common to all MsrAs that possess Cys198. They could enable the formation of the disulfide bridge and its reduction by Trx/Trx-like protein.

Acknowledgments:

We warmly thank C. Didierjean for his fruitful contribution to the numerous discussions we had about this article and C. S. Koh for careful reading of the manuscript. We are very grateful to the DESY-team in Hamburg for providing us an access to beamlines X11 and BW7A, as well as to the ESRF-team for the beamlines BM14 and BM30A, and for their help during data collections. F. M. Ranaivoson and M. Antoine were fellows of the French Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies (MRNT). This work was financially supported by the: "European Community - Research Infrastructure Action under the FP6 Structuring the European Research Area Programme" contract number RII3/CT/2004/5060008, the Centre National de la Recherche Scientifique, the French MRNT, the Actions Concertées Incitatives (ACI) BCMS047 of the French MRNT, the UHP and the Institut Fédératif de Recherches 111 Bioingénierie.

Figures

Figure 1

MsrA sequence alignment and secondary structure comparison: Alignment of the amino acid sequences according to the corresponding secondary structures of *Escherichia coli*, *Bos Taurus*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Populus trichocarpa* MsrAs with the central MsrA domain of *N. meningitidis* PilB. The unlabeled helices corresponds to 3_{10} helices, the others being α -helices. The amino acid numbering indicated at the top corresponds to the *E. coli* MsrA, chosen as the reference, while at the bottom is the natural numbering of PilB. CysA is at position 51 and CysB at position 198, except in poplar MsrA where cysteine 205 or 211 could have this role. The *E. coli* and bovine enzymes also possess an additional cysteine residue CysC at position 206 or 207. The figure was prepared using ESPript²⁷.

Figure 2

Catalytic mechanism of MsrAs. It involves two or three cysteine residues, CysA, CysB, and possibly CysC. In all cases, CysA is at position 51. Most MsrAs have CysB at position 198, and when it exists, CysC at position 206. A subfamily of MsrAs has CysB at position 54 and no CysC. The first step consists of the attack of CysA onto the sulfur of MetSO, leading to the sulfenic acid form of CysA and the concomitant release of the methionine product. CysB attacks the sulfenic acid intermediate to form a disulfide bridge CysA–CysB. Depending on the presence of CysC, regeneration of the MsrA active site to the reduced state proceeds either by the direct action of Trx (or Trx-like enzymes) onto this disulfide bridge CysA–CysB (1) or via an intermediate disulfide bridge between CysB and CysC, later reduced by Trx (2).

Figure 3

Schematic drawing of the three-dimensional structure of the PilB MsrA domain from *N. meningitidis*. β -strands are represented as arrows and α -helices as helical ribbons. The side chains of

the catalytic cysteine Cys51 and of the regenerating cysteine Cys198 are also shown by sticks.

Figure 4:

Stereoscopic views showing structural details of the active site of the MsrA domain of PilB at different stages of the catalytic reaction.

The trace of the main chain is shown in grey, amino acids are displayed in yellow sticks (bottom of the active site) or blue sticks (border of the active site) and water molecules are shown as red balls. Probable hydrogen bonds are shown as red dashed lines with their length given in angstroms. Amino acids are numbered with respect to their sequence alignment with *E. coli* MsrA.

A: The reduced form.

B: The complex between the C51S nmMsrA and Ac-Met-S-SO-NHMe (shown in orange sticks). The electron density from a Fo-Fc omit map calculated after simulated annealing with the substrate omitted is shown contoured at 3.0σ .

C: The sulfenic acid intermediate form of Cys51 obtained for the C198S nmMsrA. The 3Fo-2Fc electron density map is contoured at 1.2σ .

D: The oxidized form. The 3Fo-2Fc omit map calculated after simulated annealing with the C-terminal end from Asn195 omitted is contoured at 1.2σ . The Tyr197 side chain is not shown since it had no corresponding electron density. Residues from His199 are missing in the model.

Figure 5

Stereoscopic view of the superposed reduced (blue) and oxidized (red) forms of the *N. meningitidis* MsrA domain of PilB.

The trace of the C α atoms is shown. The main difference takes place from Thr121 to Thr132. These two residues (displayed as balls) act as hinges around which the loop closes (reduced form) or opens (oxidized form). In the first case, the sulfur atoms of residues Cys51 and Cys198 are distant by 8 Å and residues Asp129 and Tyr197 are hydrogen-bonded to form a pair. In the second case, the cysteine residues are involved in the disulfide bridge, and the new position of Asp129 leaves Tyr197 unstabilized.

Tables

Tableau 1

Statistics of the four data sets collected on the reduced form of nmMsrA (nmMsrA_{red}), the complex between its C51S nmMsrA and Ac-Met-S-SO-NHMe (nmMsrA_{MetSO}), the C198S nmMsrA that bears a sulfenic acid on Cys51 (nmMsrA_{CysOH}), and the oxidized form (nmMsrA_{ox}), respectively. The values corresponding to the outer shell are given in parenthesis.

	nmMsrA _{red}	nmMsrA _{MetSO}	nmMsrA _{sulf}	nmMsrA _{ox}
Wavelength (Å)	1.5418	0.81	0.92	0.89
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Unit cell parameters (Å)	a = 43.5, b = 49.2, c = 66.2	a = 43.9, b = 50.3, c = 66.6	a = 44.6, b = 54.6, c = 64.8	a = 43.5, b = 45.6, c = 66.0
Resolution (Å)	30-2.00 (2.03-2.00)	20-2.24 (2.28-2.24)	45-2.00 (2.11-2.00)	20-1.95 (2.06-1.95)
Reflections	17198	30965	79750 (11596)	99319 (14470)
Unique reflections	8394	7513	11221 (1608)	10483 (1496)
Redundancy	2.04(1.98)	4.1 (4.1)	7.1 (7.2)	9.5 (9.7)
I/σI	14.3(3.3)	15.3 (4.24)	15.8 (5.6)	23.8 (6.9)
Completeness (%)	90.6(90.2)	98.6 (99.7)	100 (100)	99.9 (100)
R _{merge} (%)	5.6(26.9)	7.8 (26.5)	8.2 (36.6)	6.9 (35.8)
No. of monomers per asym. unit	1	1	1	1

Tableau 2

Refinement and model statistics obtained for the reduced form of nmMsrA (nmMsrA_{red}), the complex between its C51S nmMsrA and Ac-Met-S-SO-NHMe (nmMsrA_{MetSO}), the C198S nmMsrA that bears a sulfenic acid on Cys51 (nmMsrA_{CysOH}), and the oxidized form (nmMsrA_{ox}), respectively.

[†]Values indicated between brackets correspond to statistics in the outer resolution shell.

	nmMsrA _{red}	nmMsrA _{MetSO}	nmMsrA _{CysOH}	nmMsrA _{ox}
Resolution range [†] (Å)	16.54 – 2.0 (2.13 – 2.0)	19.8 – 2.24 (2.38 – 2.24)	41.76 – 2.00 (2.13 – 2.00)	19.3 – 1.95 (2.07 – 1.95)
No. of reflections used for R calculation [†]	16476 (2581)	11612 (1872)	19133 (3110)	18107 (3012)
No. of reflections used for R _{free} calculation [†]	869 (128)	1256 (209)	983 (171)	946 (143)
R value [†] (%)	17.3 (22.2)	18.8 (22.6)	19.3 (25.2)	19.2 (22.5)
R _{free} value [†] (%)	19.2 (23.1)	19.6 (24.7)	23.5 (30.7)	21.9 (27.3)
No. of non-hydrogen protein atoms / No. of residues	1358 / 169	1343 / 167	1349 / 166	1304 / 162
No. of water molecules	146	82	123	76
Nature of non protein or non water atoms	none	Ac-MetSO- NHMe (MSO)		Acetate (ACT)
Mean B-factor (Å ²) for				
protein main chain	19.36	23.76	22.56	26.88
protein side chain	22.51	25.61	25.64	30.14
water	35.43	34.22	32.32	37.85
all	22.34	25.66	24.80	29.08
Ramachandran plot:				
residues in most favored regions (%)	91.8	91.1	89.7	92.9
residues in additionally allowed regions (%)	7.5	8.9	10.3	7.1
residues in generously allowed regions (%)	0.7	0	0	0
residues in disallowed regions (%)	0	0	0	0
Rms deviation from ideal geometry				
bond length (Å)	0.009	0.012	0.006	0.006
bond angle (°)	1.3	1.3	1.2	1.3

References

1. Moskovitz, J. (2005). Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 213-9.
2. Petropoulos, I. & Friguet, B. (2005). Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et biophysica acta* **1703**, 261-6.
3. Sharov, V. S., Ferrington, D. A., Squier, T. C. & Schoneich, C. (1999). Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS letters* **455**, 247-50.
4. Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P. J. & Barras, F. (2001). Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem* **276**, 48915-20.
5. Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. & Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **277**, 12016-22.
6. Lowther, W. T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. & Matthews, B. W. (2002). The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat Struct Biol* **9**, 348-52.
7. Skaar, E. P., Tobiason, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. & Seifert, H. S. (2002). The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10108-13.
8. Ranaivoson, F. M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjekar, S., Aubry, A., Branlant, G. & Favier, F. (2006). The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J Mol Biol* **358**, 443-54.
9. Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2005). The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* **280**, 12344-50.
10. Boschi-Muller, S., Azza, S. & Branlant, G. (2001). *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci* **10**, 2272-9.
11. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. & Branlant, G. (2000). A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 35908-13.
12. Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2004). Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature. *J Biol Chem* **279**, 42462-8.
13. Antoine, M., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2003). Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **278**, 45352-7.
14. Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2006). Characterization of the amino acids from *Neisseria meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step. *J Biol Chem* **281**, 39062-70.
15. Balta, B., Monard, G., Ruiz-Lopez, M. F., Antoine, M., Gand, A., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2006). Theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols. *J Phys Chem A Mol Spectrosc Kinet Environ Gen Theory* **110**, 7628-36.
16. Lowther, W. T., Brot, N., Weissbach, H. & Matthews, B. W. (2000). Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry* **39**, 13307-12.
17. Coudevylle, N., Antoine, M., Bouguet-Bonnet, S., Mutzenhardt, P., Boschi-Muller, S., Branlant, G. & Cung, M. T. (2007). Solution structure and backbone dynamics of the reduced form and an oxidized form of *E. coli* methionine sulfoxide reductase A (MsrA): structural insight of the MsrA catalytic cycle. *J Mol Biol* **366**, 193-206.
18. Tete-Favier, F., Cobessi, D., Boschi-Muller, S., Azza, S., Branlant, G. & Aubry, A. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure* **8**, 1167-78.
19. Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J. P. & Boschi-Muller, S. (2007).

- Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* **282**, 3367-78.
20. Taylor, A. B., Benglis, D. M., Jr., Dhandayuthapani, S. & Hart, P. J. (2003). Structure of Mycobacterium tuberculosis methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. *J Bacteriol* **185**, 4119-26.
 21. Gand, A., Antoine, M., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2007). Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of methionine sulfoxide reductase a. *J Biol Chem* **282**, 20484-91.
 22. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* **276**, 307-326.
 23. Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795-800.
 24. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Crystallographica* **D54**, 905-921.
 25. Roussel, A. & Cambillau, C. (1991). The TURBO-FRODO Graphics Package. In *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, Vol. 81, pp. 86. Silicon Graphics, Mountain View, USA.
 26. Kleywegt, G. J. (2007). Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta crystallographica* **63**, 94-100.
 27. Gouet, P., Robert, X. & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic acids research* **31**, 3320-3.
 28. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. & Branlant, G. (2005). The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 231-8.

Figure 2:

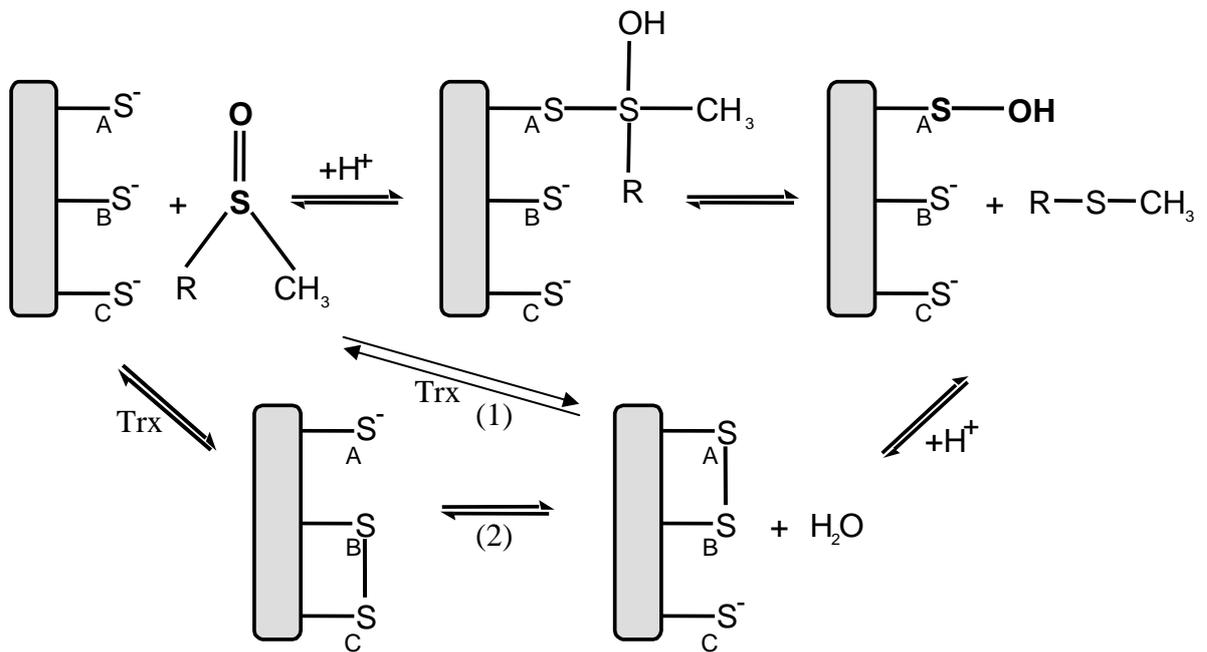


Figure 3 :

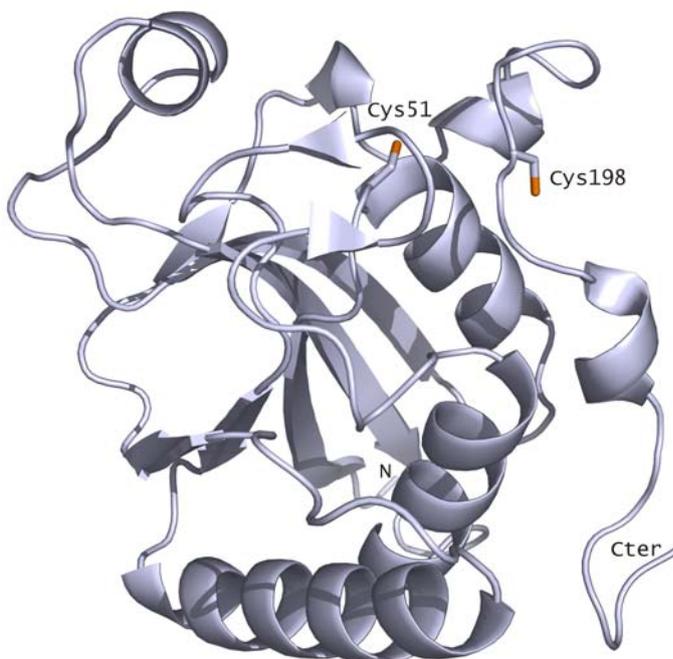


Figure 4:

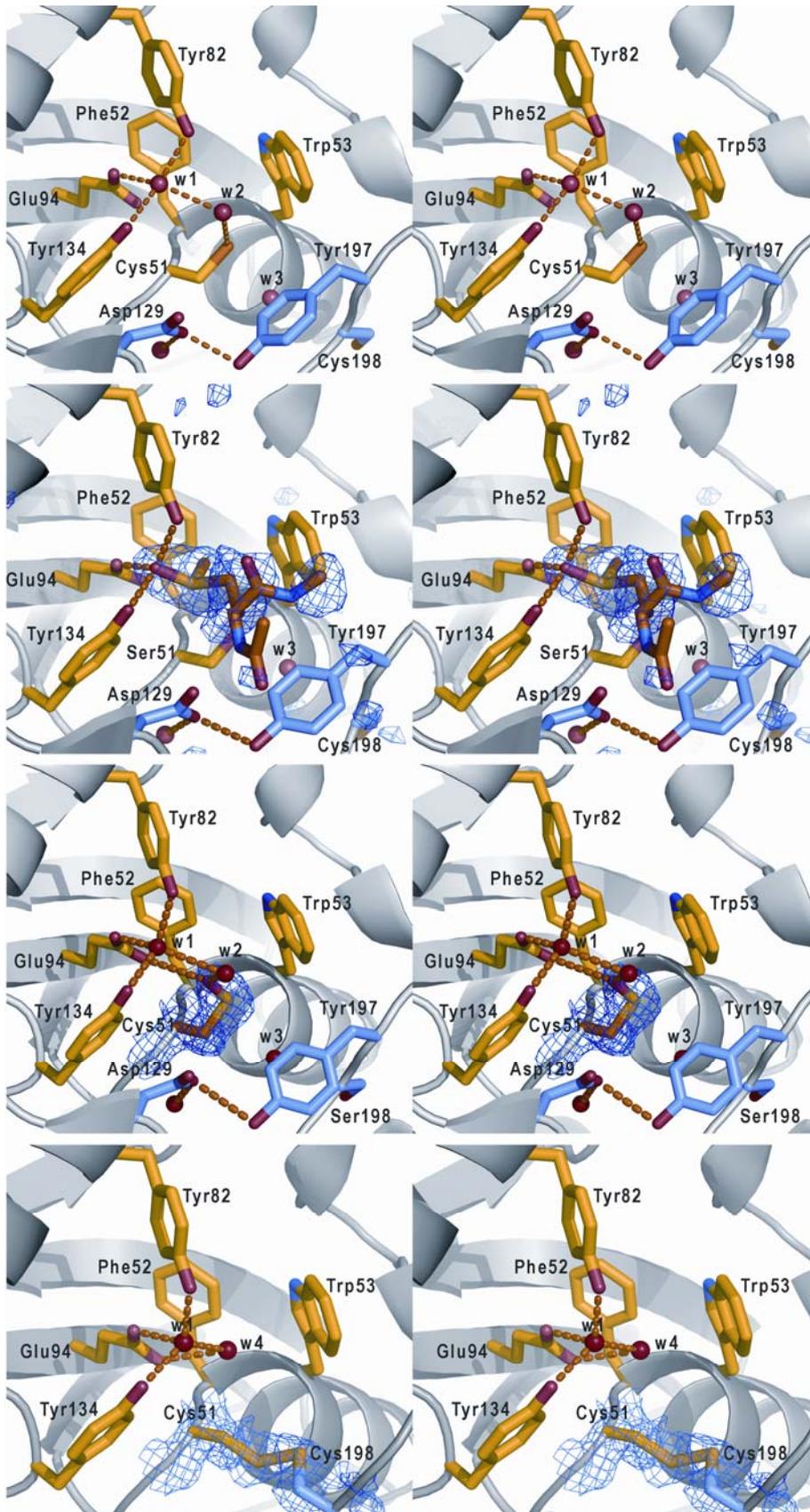
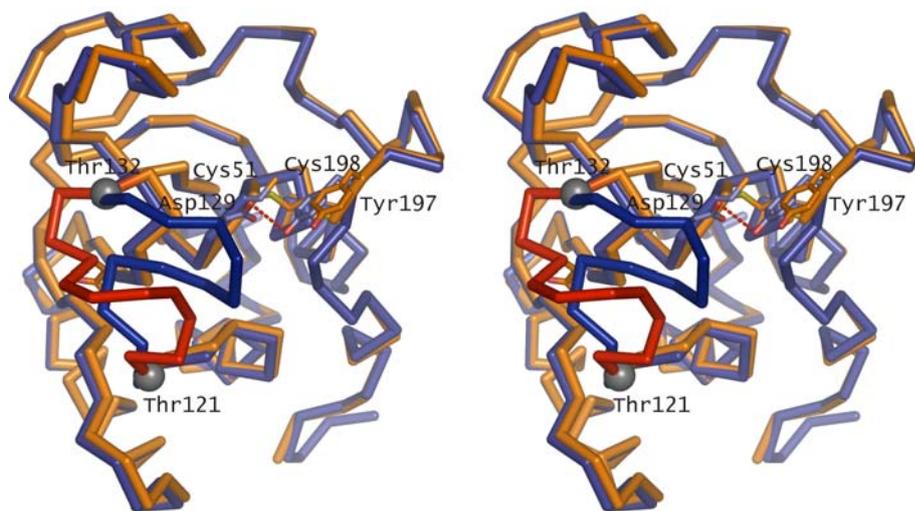


Figure 5:



Bibliographie

A

- Abrahams, J. P. et A. G. W. Leslie (1996). "Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase." Acta Crystallogr D **52**: 30-42.
- Adman, E., K. D. Watenpaugh et L. H. Jensen (1975). "NH...S hydrogen bonds in *Peptococcus aerogenes* ferredoxin, *Clostridium pasteurianum* rubredoxin, and *Chromatium* high potential iron protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(12): 4854-4858.
- Antoine, M., S. Boschi-Muller et G. Branlant (2003). "Kinetic characterization of the chemical steps involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*." J Biol Chem **278**(46): 45352-7.
- Antoine, M., A. Gand, S. Boschi-Muller et G. Branlant (2006). "Characterization of the amino acids from *Neisseria meningitidis* MsrA involved in the chemical catalysis of the methionine sulfoxide reduction step." J Biol Chem **281**(51): 39062-70.

B

- Balta, B., G. Monard, M. F. Ruiz-Lopez, M. Antoine, A. Gand, S. Boschi-Muller et G. Branlant (2006). "Theoretical study of the reduction mechanism of sulfoxides by thiols." J Phys Chem A Mol Spectrosc Kinet Environ Gen Theory **110**(24): 7628-36.
- Berlett, B. S. et E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-6.
- Bigelow, D. J. et T. C. Squier (2005). "Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 121-34.
- Biteau, B., J. Labarre et M. B. Toledano (2003). "ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin." Nature **425**(6961): 980-4.
- Bos, J. L. (1988). "The ras gene family and human carcinogenesis." Mutation research **195**(3): 255-71.
- Boschi-Muller, S., S. Azza et G. Branlant (2001). "E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide." Protein Sci **10**(11): 2272-9.
- Boschi-Muller, S., S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselaar et G. Branlant (2000). "A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **275**(46): 35908-13.

- Boschi-Muller, S., A. Olry, M. Antoine et G. Branlant (2005). "The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 231-8.
- Bricogne, G., C. Vonrhein, C. Flensburg, M. Schiltz et W. Paciorek (2003). "Generation, representation and flow of phase information in structure determination : recent developments in and around SHARP 2.0." Acta Crystallogr D **59**: 2023-2030.
- Brot, N., J. F. Collet, L. C. Johnson, T. J. Jonsson, H. Weissbach et W. T. Lowther (2006). "The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases." J Biol Chem.
- Brot, N., L. Weissbach, J. Werth et H. Weissbach (1981). "Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2155-8.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson et G. L. Warren (1998). "Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination." Acta Crystallogr D **54**(5): 905-921.

C

- Caldwell, P., D. C. Luk, H. Weissbach et N. Brot (1978). "Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(11): 5349-52.
- Capitani, G., R. Rossmann, D. F. Sargent, M. G. Grutter, T. J. Richmond et H. Hennecke (2001). "Structure of the soluble domain of a membrane-anchored thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum* reveals unusual properties." J Mol Biol **311**(5): 1037-48.
- CCP4: Computational collaborative project, N°4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D **50**: 760-763.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura et L. A. Loeb (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." The Journal of biological chemistry **267**(1): 166-72.
- Chivers, P. T., K. E. Prehoda et R. T. Raines (1997). "The CXXC motif: a rheostat in the active site." Biochemistry **36**: 4061-4066.
- Ciorba, M. A., S. H. Heinemann, H. Weissbach, N. Brot et T. Hoshi (1997). "Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9932-7.

- Cioslowski, J. et S. T. Mixon (1993). "Rigorous Interpretation of Electronic Wave-Functions .2. Electronic-Structures of Selected Phosphorus, Sulfur, and Chlorine Fluorides and Oxides." Inorg. Chem. **32**: 3209-3216.
- Claiborne, A., J. I. Yeh, T. C. Mallett, J. Luba, E. J. Crane, 3rd, V. Charrier et D. Parsonage (1999). "Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation." Biochemistry **38**(47): 15407-16.
- Copley, S. D., W. R. Novak et P. C. Babbitt (2004). "Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor." Biochemistry **43**(44): 13981-95.
- Coudeville, N., M. Antoine, S. Boschi-Muller, G. Branlant et M. T. Cung (2006). "(1)H, (13)C and (15)N Resonance Assignment of an Oxidized form (Cys(51)-Cys(198)) of Methionine Sulfoxide Reductase A from Escherichia Coli." J Biomol NMR.
- Coudeville, N., M. Antoine, S. Bouguet-Bonnet, P. Mutzenhardt, S. Boschi-Muller, G. Branlant et M. T. Cung (2007). "Solution structure and backbone dynamics of the reduced form and an oxidized form of E. coli methionine sulfoxide reductase A (MsrA): structural insight of the MsrA catalytic cycle." J Mol Biol **366**(1): 193-206.
- Cowtan, K. (1994). "Dm: An automated procedure for phase improvement by density modification." Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on protein crystallography **31**: 34-38.
- Crow, A., A. R. M., N. E. Le Brun et A. Oubrie (2004). "Structural Basis of Redox-coupled Protein Substrate Selection by the Cytochrome c Biosynthesis Protein ResA." J Biol Chem **279**: 23654–23660.

D

- Davies, K. J. (2001). "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." Biochimie **83**: 301–310.
- de Magalhaes, J. P., J. A. Cabral et D. Magalhaes (2005). "The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging." Genetics **169**(1): 265-74.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh et M. B. Toledano (2002). "A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation." Cell **111**(4): 471-81.
- Denicola, A., B. A. Freeman, M. Trujillo et R. Radi (1996). "Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations." Archives of biochemistry and biophysics **333**(1): 49-58.

- Dhandayuthapani, S., M. W. Blaylock, C. M. Bebear, W. G. Rasmussen et J. B. Baseman (2001). "Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*." J Bacteriol **183**(19): 5645-50.
- Dherin, C., J. P. Radicella, M. Dizdaroglu et S. Boiteux (1999). "Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations." Nucleic acids research **27**(20): 4001-7.
- Dixon, D. A., D. Feller, C. G. Zhan et J. S. Francisco (2002). "Decomposition pathways of peroxytrifluoromethane: Gas-phase and solution energetics." Journal of Physical Chemistry A **106**(13): 3191-3196.
- Dobado, J. A., H. Martinez-Garcia, J. M. Molina et M. R. Sundberg (1999). "Chemical bonding in hypervalent molecules revised. 2. Application of the atoms in molecules theory to Y(2)XZ and Y(2)XZ(2) (Y = H, F, CH₃; X = O, S, Se; Z = O, S) compounds." J Am Chem Soc **121**: 3156-3164.
- Doublet, S., S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson et T. Ellenberger (1998). "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution." Nature **391**(6664): 251-8.
- Douglas, T., D. S. Daniel, B. K. Parida, C. Jagannath et S. Dhandayuthapani (2004). "Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages." J Bacteriol **186**(11): 3590-8.
- Durrant, J. R., L. B. Giorgi, J. Barber, D. R. Klug et G. Porter (1990). "Characterisation of triplet states in isolated Photosystem II reaction centres: Oxygen quenching as a mechanism for photodamage." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1017**(2): 167-175.

E

- Edeling, M. A., L. W. Guddat, R. A. Fabianek, L. Thorny-Meyer et J. L. Martin (2002). "Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: High-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment." Structure **10**(7): 973-979.
- Emsley, P. et K. Cowtan (2004). "Coot : model-building tools for molecular graphics " Acta Crystallogr D **60**: 2126-2132.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu et M. S. Cooke (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutation research **567**(1): 1-61.
- Ezraty, B., L. Aussel et F. Barras (2005). "Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 221-9.

Ezraty, B., R. Grimaud, M. El Hassouni, D. Moinier et F. Barras (2004). "Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*." Embo J **23**(8): 1868-77.

F

Fabianek, R. A., M. Huber-Wunderlich, R. Glockshuber, P. Künzler, H. Hennecke et L. Thöny-Meyer (1997). "Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as reductant in the biogenesis of c-type cytochromes." J Biol Chem **272**: 4467–4473.

Fedoroff, N. (2006). "Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses." Annals of Botany **98**(2): 289-300.

Ferrington, D. A., H. Sun, K. K. Murray, J. Costa, T. D. Williams, D. J. Bigelow et T. C. Squier (2001). "Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome." J Biol Chem **276**(2): 937-43.

Floyd, R. A. (1990). "The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis." Carcinogenesis **11**(9): 1447-50.

Fortini, P., E. Parlanti, O. M. Sidorkina, J. Laval et E. Dogliotti (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." J Biol Chem **274**: 15230–15236.

Friguet, B. (2006). "Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress." FEBS Lett **580**(12): 2910-6.

Friguet, B., E. R. Stadtman et L. I. Szweda (1994). "Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease." J Biol Chem **269**: 21639–21643.

Friguet, B. et L. I. Szweda (1997). "Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal crosslinked protein." FEBS Lett **405**: 21–25.

Fuangthong, M. et J. D. Helmann (2002). "The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(10): 6690-5.

G

Gabbita, S. P., M. Y. Aksenov, M. A. Lovell et W. R. Markesbery (1999). "Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain." J Neurochem **73**(4): 1660-6.

- Gand, A., M. Antoine, S. Boschi-Muller et G. Branlant (2007). "Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of methionine sulfoxide reductase A." J Biol Chem **282**(28): 20484-91.
- Gao, J., Y. Yao et T. C. Squier (2001). "Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex." Biophys J **80**(4): 1791-801.
- Gibrat, J. F., T. Madej et S. H. Bryant (1996). "Surprising similarities in structure comparison." Current Opinion in Structural Biology **6**(3): 377-385.
- Glaser, C. B., G. Yamin, V. N. Uversky et A. L. Fink (2005). "Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 157-69.
- Gouet, P., X. Robert et E. Courcelle (2003). "ESPrpt/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins." Nucleic acids research **31**(13): 3320-3.
- Goulding, C. W., M. I. Apostol, S. Gleiter, A. Parseghian, J. Bardwell, M. Gennaro et D. Eisenberg (2004). "Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*." J Biol Chem **279**(5): 3516-24.
- Grauschopf, U., J. R. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger et J. C. Bardwell (1995). "Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst?" Cell **83**: 947-955.
- Gregoret, L. M., S. D. Rader, R. J. Fletterick et F. E. Cohen (1991). "Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins." Proteins: Structure, Function and Genetics **9**(2): 99-107.
- Grimaud, R., B. Ezraty, J. K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P. J. Derrick et F. Barras (2001). "Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase." J Biol Chem **276**(52): 48915-20.
- Gunesekere, I. C., C. M. Kahler, C. S. Ryan, L. A. Snyder, N. J. Saunders, J. I. Rood et J. K. Davies (2006). "Ecf, an alternative sigma factor from *Neisseria gonorrhoeae*, controls expression of msrAB, which encodes methionine sulfoxide reductase." J Bacteriol **188**(10): 3463-9.
- Guyton, K. Z. et T. W. Kensler (1993). "Oxidative mechanisms in carcinogenesis." British medical bulletin **49**(3): 523-44.

H

- Hao, Q. (2004). "ABS : a program to determine absolute configuration and evaluate scatterer substructure." J Appl Cryst **37**: 498-499.

Hassouni, M. E., J. P. Chambost, D. Expert, F. Van Gijsegem et F. Barras (1999). "The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 887-92.

Holm, L. et C. Sander (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." Journal of Molecular Biology **233**(1): 123-138.

Hoppe, G., Y. C. Chai, J. W. Crabb et J. Sears (2004). "Protein s-glutathionylation in retinal pigment epithelium converts heat shock protein 70 to an active chaperone." Experimental Eye Research **78**(6): 1085-1092.

Hsu, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang et C. C. Harris (1991). "Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas." Nature **350**(6317): 427-8.

Huber-Wunderlich, M. et R. Glockshuber (1998). "A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family." Folding and Design **3**(3): 161-171.

J

Jacobi, A., M. Huber-Wunderlich, J. Hennecke et R. Glockshuber (1997). "Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. Influence of electrostatic interactions on stability and redox properties." J Biol Chem **272**: 21692–21699.

Jeng, M. F., A. P. Campbell, T. Begley, A. Holmgren, D. A. Case, P. E. Wright et H. J. Dyson (1994). "High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin." Structure **2**(9): 853-868.

Jung, T., N. Bader et T. Grune (2007). "Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome." Archives of biochemistry and biophysics **462**(2): 231-7.

K

Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." Journal of Applied Crystallography **26**(6): 795-800.

Kanayama, A., J. Inoue, Y. Sugita-Konishi, M. Shimizu et Y. Miyamoto (2002). "Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation." J Biol Chem **277**(27): 24049-56.

- Kantorow, M., J. R. Hawse, T. L. Cowell, S. Benhamed, G. O. Pizarro, V. N. Reddy et J. F. Hejtmancik (2004). "Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9654-9.
- Kauffmann, B., F. Favier, A. Olry, S. Boschi-Muller, P. Carpentier, G. Branlant et A. Aubry (2002). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the peptide methionine sulfoxide reductase B domain of *Neisseria meningitidis* PILB." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**(Pt 9): 1467-9.
- Kauffmann, B. (2003). "Etudes cristallographiques d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant : les peptides méthionine sulfoxyde réductases et la NADH rubrédoxine oxydoréductase"
Thèse, Biologie structurale moléculaire et cellulaire, Nancy-Université.
- Keren, N., I. Ohad, A. W. Rutherford, F. Drepper et A. Krieger-Liszkay (2000). "Inhibition of Photosystem II activity by saturating single turnover flashes in calcium-depleted and active Photosystem II." Photosynth Res **63**(3): 209-16.
- Kerr, K. A., J. P. Ashmore et T. F. Koetzle (1975). "A neutron diffraction study of L-cysteine." Acta Crystallogr. **31**: 2022-2026.
- Khor, H. K., M. T. Fisher et C. Schoneich (2004). "Potential role of methionine sulfoxide in the inactivation of the chaperone GroEL by hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite (ONOO-)." J Biol Chem **279**(19): 19486-93.
- Kim, H. Y., D. E. Fomenko, Y. E. Yoon et V. N. Gladyshev (2006). "Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases." Biochemistry **45**(46): 13697-704.
- Kim, H. Y. et V. N. Gladyshev (2005). "Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases." PLoS Biol **3**(12): e375.
- Kim, H. Y. et V. N. Gladyshev (2006). "Alternative first exon splicing regulates subcellular distribution of methionine sulfoxide reductases." BMC Mol Biol **7**: 11.
- Kim, S. O., K. Merchant, R. Nudelman, W. F. Beyer, Jr., T. Keng, J. DeAngelo, A. Hausladen et J. S. Stamler (2002). "OxyR: a molecular code for redox-related signaling." Cell **109**(3): 383-96.
- Kim, Y. M., C. A. Bombeck et T. R. Billiar (1999). "Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis." Circulation research **84**(3): 253-6.
- Kleywegt, G. J. (1996). "Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement." Acta Crystallogr D **52**(Pt 4): 842-57.
- Kleywegt, G. J. (2007). "Crystallographic refinement of ligand complexes." Acta Crystallogr D **63**(Pt 1): 94-100.

- Kleywegt, G. J. et T. A. Jones (1997). "Template convolution to enhance or detect structural features in macromolecular electron-density maps." Acta Crystallogr D **53**(Pt 2): 179-85.
- Koc, A., A. P. Gasch, J. C. Rutherford, H. Y. Kim et V. N. Gladyshev (2004). "Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 7999-8004.
- Konarev, P. V., M. V. Petoukhov, V. V. Volkov et D. I. Svergun (2006). "ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis." Journal of Applied Crystallography **39** 277-286.
- Kryukov, G. V., R. A. Kumar, A. Koc, Z. Sun et V. N. Gladyshev (2002). "Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4245-50.
- Kuchino, Y., F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka et S. Nishimura (1987). "Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues." Nature **327**(6117): 77-9.
- Kumar, R. A., A. Koc, R. L. Cerny et V. N. Gladyshev (2002). "Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in Drosophila methionine-R-sulfoxide reductase." J Biol Chem **277**(40): 37527-35.

L

- Lander, H. M. (1997). "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction." Faseb J **11**(2): 118-24.
- Landis, G. N. et J. Tower (2005). "Superoxide dismutase evolution and life span regulation." Mechanisms of ageing and development **126**(3): 365-79.
- Laskowsky, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss et J. M. Thornton (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." Journal of Applied Crystallography **26**: 282-291.
- Le Page, F., A. Guy, J. Cadet, A. Sarasin et A. Gentil (1998). "Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells." Nucleic acids research **26**(5): 1276-81.
- Lee, C. M., M. E. Lopez, R. Weindruch et J. M. Aiken (1998). "Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy." Free radical biology & medicine **25**(8): 964-72.

- Lee, J. W., N. V. Gordiyenko, M. Marchetti, N. Tserentsoodol, D. Sagher, S. Alam, H. Weissbach, M. Kantorow et I. R. Rodriguez (2006). "Gene structure, localization and role in oxidative stress of methionine sulfoxide reductase A (MSRA) in the monkey retina." Exp Eye Res **82**(5): 816-27.
- Lennon, B. W., C. H. Williams, Jr. et M. L. Ludwig (2000). "Twists in catalysis: alternating conformations of Escherichia coli thioredoxin reductase." Science **289**(5482): 1190-4.
- Levine, R. L., L. Mosoni, B. S. Berlett et E. R. Stadtman (1996). "Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15036-40.
- Li, Q., H. Y. Hu et G. J. Xu (2001). "Biochemical characterization of the thioredoxin domain of Escherichia coli DsbE protein reveals a weak reductant." Biochemical and Biophysical Research Communications **283**(4): 849-853.
- Loferer, H., M. Wunderlich, H. Hennecke et R. Glockshuber (1995). "A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. ." J Biol Chem **270**: 26178–26183.
- Lowther, W. T., N. Brot, H. Weissbach et B. W. Matthews (2000). "Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme." Biochemistry **39**(44): 13307-12.
- Lowther, W. T., H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot et B. W. Matthews (2002). "The mirrored methionine sulfoxide reductases of Neisseria gonorrhoeae pilB." Nat Struct Biol **9**(5): 348-52.
- Lymar, S. V. et J. K. Hurst (1995). "Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity." J Am Chem Soc **117**(34): 8867-8868.

M

- Marchetti, M. A., W. Lee, T. L. Cowell, T. M. Wells, H. Weissbach et M. Kantorow (2006). "Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells." Exp Eye Res **83**(5): 1281-6.
- Mariani, E., M. C. Polidori, A. Cherubini et P. Mecocci (2005). "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(1): 65-75.
- Marletta, M. A. (1993). "Nitric oxide synthase structure and mechanism." J Biol Chem **268**(17): 12231-4.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez et I. Nunez de Castro (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clinical biochemistry **32**(8): 595-603.

- McCord, J. M. et I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.
- Merenyi, G., J. Lind, G. Czapski et S. Goldstein (2000). "The decomposition of peroxyxynitrite does not yield nitroxyl anion and singlet oxygen." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8216-8.
- Mohri, M., P. S. Reinach, A. Kanayama, M. Shimizu, J. Moskovitz, T. Hisatsune et Y. Miyamoto (2002). "Suppression of the TNF α -induced increase in IL-1 α expression by hypochlorite in human corneal epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(10): 3190-5.
- Morrison, H. M., D. Burnett et R. A. Stockley (1986). "The effect of catalase and methionine-S-oxide reductase on oxidised alpha 1-proteinase inhibitor." Biol Chem Hoppe Seyler **367**(5): 371-8.
- Moskovitz, J. (2005). "Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 213-9.
- Moskovitz, J., S. Bar-Noy, W. M. Williams, J. Requena, B. S. Berlett et E. R. Stadtman (2001). "Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12920-5.
- Moskovitz, J., J. M. Poston, B. S. Berlett, N. J. Nosworthy, R. Szczepanowski et E. R. Stadtman (2000). "Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity." J Biol Chem **275**(19): 14167-72.
- Moskovitz, J., V. K. Singh, J. Requena, B. J. Wilkinson, R. K. Jayaswal et E. R. Stadtman (2002). "Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 62-5.
- Mössner, E., M. Huber-Wunderlich et R. Glockshuber (1998). "Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active sites of other thiol/disulfide oxidoreductases." Protein Sci **7**: 1233–1244.
- Moutevelis, E. et J. Warwicker (2004). "Prediction of pKa and redox properties in the thioredoxin superfamily." Protein Sci **13**(10): 2744-52.
- Muller, F. L., Y. Liu et H. Van Remmen (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." J Biol Chem **279**(47): 49064-73.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin et E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D **53**: 240–255.
- Mushegian, A. R. et E. V. Koonin (1996). "A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10268-73.

N

- Neiers, F., A. Kriznik, S. Boschi-Muller et G. Branlant (2004). "Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases B with an alternative thioredoxin recognition signature." J Biol Chem **279**(41): 42462-8.
- Neiers, F., S. Sonkaria, A. Olry, S. Boschii-Muller et G. Branlant (2007). "Characterization of the amino acids from neisseria meningitidis methionine sulfoxide reductase B involved in the chemical catalysis and substrate specificity of the reductase step." J Biol Chem., sous presse.
- Neiers, F. (2007) "Mécanisme, catalyse et spécificité structurale des méthionine sulfoxyde réductases de classe B et la protéine PilB de *Neisseria meningitidis*." Thèse, Enzymologie moléculaire, Nancy-Université.

O

- Ogino, T., M. Hosako, K. Hiramatsu, M. Omori, M. Ozaki et S. Okada (2005). "Oxidative modification of IkappaB by monochloramine inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation." Biochim Biophys Acta **1746**(2): 135-42.
- Olry, A., S. Boschi-Muller et G. Branlant (2004). "Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*." Biochemistry **43**(36): 11616-22.
- Olry, A., S. Boschi-Muller, M. Marraud, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaar et G. Branlant (2002). "Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*." J Biol Chem **277**(14): 12016-22.
- Olry, A., S. Boschi-Muller, H. Yu, D. Burnel et G. Branlant (2005). "Insights into the role of the metal binding site in methionine-R-sulfoxide reductases B." Protein Sci **14**(11): 2828-37.
- Olson, L. P., M. D. Bartberger et K. N. Houk (2003). "Peroxynitrate and peroxynitrite: a complete basis set investigation of similarities and differences between these NOx species." J Am Chem Soc **125**(13): 3999-4006.
- Otwinowski, Z. et W. Minor (1997). "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." Methods in Enzymology **276**: 307-326.

P

- Pal, R., D. B. Oien, F. Y. Ersen et J. Moskovitz (2007). "Elevated levels of brain-pathologies associated with neurodegenerative diseases in the methionine sulfoxide reductase A knockout mouse." Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung **180**(4): 765-74.
- Panjikar, S., V. Parthasarathy, V. S. Lamzin, M. S. Weiss et P. A. Tucker (2005). "Auto-Rickshaw: An automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **61**(4): 449-457.
- Panmanee, W., P. Vattanaviboon, L. B. Poole et S. Mongkolsuk (2006). "Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress." Journal of bacteriology **188**(4): 1389-95.
- Pannu, N. S. et R. J. Read (2004). "The application of multivariate statistical techniques improves single-wavelength anomalous diffraction phasing." Acta Crystallogr D **60**: 22-27.
- Perrakis, A., R. Morris et V. S. Lamzin (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." Nature structural biology **6**(5): 458-63.
- Petoukhov, M. V. et D. I. Svergun (2005). "Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data." Biophysical journal **89**(2): 1237-50.
- Picot, C. R., M. Perichon, K. C. Lundberg, B. Friguet, L. I. Szweda et I. Petropoulos (2006). "Alterations in mitochondrial and cytosolic methionine sulfoxide reductase activity during cardiac ischemia and reperfusion." Exp Gerontol **41**(7): 663-7.
- Pirkkala, L., P. Nykanen et L. Sistonen (2001). "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond." The FASEB journal **15**(7): 1118-31.
- Pryor, W. A., K. N. Houk, C. S. Foote, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, G. L. Squadrito et K. J. Davies (2006). "Free radical biology and medicine: it's a gas, man!" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **291**(3): R491-511.

Q

- Qi, Y. et N. V. Grishin (2005). "Structural classification of thioredoxin-like fold proteins." Proteins: Structure, Function and Genetics **58**(2): 376-388.

- Qin, J., G. M. Clore, W. P. Kennedy, J. Kuszewski et A. M. Gronenborn (1996). "The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from ref-1 reveals peptide chain reversal. ." Structure **4**: 613–620.
- Qin, J., G. M. Clore, W. M. Poindexter-Kennedy, J. R. Huth et A. M. Gronenborn (1995). "Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NFkB. ." Structure **3**: 289–297.
- Quinonez, M., M. DiFranco et F. Gonzalez (1999). "Involvement of methionine residues in the fast inactivation mechanism of the sodium current from toad skeletal muscle fibers." J Membr Biol **169**(2): 83-90.

R

- Ranaivoson, F. M., B. Kauffmann, F. Neiers, J. Wu, S. Boschi-Muller, S. Panjikar, A. Aubry, G. Branlant et F. Favier (2006). "The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold." J Mol Biol **358**(2): 443-54.
- Reed, A. E. et P. V. Schleyer (1990). "Chemical Bonding in Hypervalent Molecules - the Dominance of Ionic Bonding and Negative Hyperconjugation over D-Orbital Participation. ." J Am Chem Soc **112**: 1434-1445.
- Rhee, S. G., H. Z. Chae et K. Kim (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free radical biology & medicine **38**(12): 1543-52.
- Rouhier, N., B. Kauffmann, F. Tete-Favier, P. Palladino, P. Gans, G. Branlant, J. P. Jacquot et S. Boschi-Muller (2007). "Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases." J Biol Chem **282**(5): 3367-78.
- Rouhier, N., C. V. Santos, L. Tarrago et P. Rey (2006). "Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families." Photosynth Res **89**(3): 1-16.
- Roussel, A. et C. Cambillau (1991). The TURBO-FRODO Graphics Package. Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Mountain View, USA, Silicon Graphics. **81**: 86.
- Ruan, H., X. D. Tang, M. L. Chen, M. L. Joiner, G. Sun, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann, L. Iverson, C. F. Wu et T. Hoshi (2002). "High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2748-53.

S

- Sacksteder, C. A., J. E. Whittier, Y. Xiong, J. Li, N. A. Galeva, M. E. Jacoby, S. O. Purvine, T. D. Williams, M. C. Rechsteiner, D. J. Bigelow et T. C. Squier (2006). "Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionine145 in calmodulin promotes targeted proteasomal degradation." *Biophys J* **91**(4): 1480-93.
- Schallreuter, K. U., K. Rubsam, B. Chavan, C. Zothner, J. M. Gillbro, J. D. Spencer et J. M. Wood (2006). "Functioning methionine sulfoxide reductases A and B are present in human epidermal melanocytes in the cytosol and in the nucleus." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(1): 145-52.
- Schneider, T. R. et G. M. Sheldrick (2002). "Substructure solution with SHELXD." *Acta Crystallogr D* **58**(Pt 10 Pt 2): 1772-1779.
- Schoneich, C. (2005). "Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1703**(2): 111-9.
- Schoneich, C., D. Pogocki, G. L. Hug et K. Bobrowski (2003). "Free radical reactions of methionine in peptides: mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease." *J Am Chem Soc* **125**(45): 13700-13.
- Sharov, V. S., D. A. Ferrington, T. C. Squier et C. Schoneich (1999). "Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase." *FEBS Lett* **455**(3): 247-50.
- Shelton, M. D., P. B. Chock et J. J. Mieryl (2005). "Glutaredoxin: Role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation." *Antioxidants and Redox Signaling* **7**(3-4): 348-366.
- Shringarpure, R., T. Grune, J. Mehlhase et K. J. Davies (2003). "Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome." *J Biol Chem* **278**: 311-318.
- Singh, V. K. et J. Moskovitz (2003). "Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: Expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress." *Microbiology* **149**(10): 2739-2747.
- Skaar, E. P., D. M. Tobiason, J. Quick, R. C. Judd, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot et H. S. Seifert (2002). "The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 10108-13.
- Sreekumar, P. G., R. Kannan, J. Yaung, C. K. Spee, S. J. Ryan et D. R. Hinton (2005). "Protection from oxidative stress by methionine sulfoxide reductases in RPE cells." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(1): 245-53.

- Stadtman, E. R. et R. L. Levine (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-18.
- Stadtman, E. R., H. Van Remmen, A. Richardson, N. B. Wehr et R. L. Levine (2005). "Methionine oxidation and aging." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 135-40.
- Stirnemann, C. U., A. Rozhkova, U. Grauschopf, M. G. Grutter, R. Glockshuber et G. Capitani (2005). "Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation." Structure **13**(7): 985-93.
- Svergun, D. I., M. V. Petoukhov et M. H. Koch (2001). "Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering." Biophysical journal **80**(6): 2946-53.

T

- Taggart, C., D. Cervantes-Laurean, G. Kim, N. G. McElvaney, N. Wehr, J. Moss et R. L. Levine (2000). "Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity." J Biol Chem **275**(35): 27258-65.
- Taha, M. K., M. So, H. S. Seifert, E. Billyard et C. Marchal (1988). "Pilin expression in *Neisseria gonorrhoeae* is under both positive and negative transcriptional control." EMBO Journal **7**(13): 4367-4378.
- Takahashi, T., M. M. Nau, I. Chiba, M. J. Birrer, R. K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A. F. Gazdar et J. D. Minna (1989). "p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer." Science (New York, N.Y) **246**(4929): 491-4.
- Tang, X. D., H. Daggett, M. Hanner, M. L. Garcia, O. B. McManus, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann et T. Hoshi (2001). "Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels." J Gen Physiol **117**(3): 253-74.
- Tavares, P., A. S. Pereira, J. J. Moura et I. Moura (2006). "Metalloenzymes of the denitrification pathway." J Inorg Biochem **100**(12): 2087-100.
- Taylor, A. B., D. M. Benglis, Jr., S. Dhandayuthapani et P. J. Hart (2003). "Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine." J Bacteriol **185**(14): 4119-26.
- Teixeira, M. M., F. Q. Cunha, A. Noronha-Dutra et J. Hothersall (1999). "Production of singlet oxygen by eosinophils activated in vitro by C5a and leukotriene B4." FEBS Lett **453**(3): 265-8.
- Telfer, A., S. M. Bishop, D. Phillips et J. Barber (1994). "Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique." The Journal of biological chemistry **269**(18): 13244-53.

Tete-Favier, F., D. Cobessi, S. Boschi-Muller, S. Azza, G. Branlant et A. Aubry (2000). "Crystal structure of the Escherichia coli peptide methionine sulphoxide reductase at 1.9 Å resolution." Structure **8**(11): 1167-78.

Thorpe, S. R. et J. W. Baynes (2003). "Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives." Amino acids **25**(3-4): 275-81.

Triesscheijn, M., P. Baas, J. H. Schellens et F. A. Stewart (2006). "Photodynamic therapy in oncology." Oncologist **11**(9): 1034-44.

V

Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Prog Lipid Res **42**(4): 318-43.

Utaida, S., P. M. Dunman, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, V. K. Singh, R. K. Jayaswal et B. J. Wilkinson (2003). "Genome-wide transcriptional profiling of the response of Staphylococcus aureus to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon." Microbiology **149**(Pt 10): 2719-32.

V

Vagin, A. et A. Teplyakov (1997). "MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement." Journal of Applied Crystallography **30**(6): 1022-1025.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur et J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.

Vijayalakshmi, J., M. K. Mukherjee, J. Graumann, U. Jakob et M. A. Saper (2001). "The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity." Structure (London, England) **9**(5): 367-75.

Vogt, W. (1995). "Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal." Free Radic Biol Med **18**(1): 93-105.

Vougier, S., J. Mary, N. Dautin, J. Vinh, B. Friguet et D. Ladant (2004). "Essential role of methionine residues in calmodulin binding to Bordetella pertussis adenylate cyclase, as probed by selective oxidation and repair by the peptide methionine sulfoxide reductases." J Biol Chem **279**(29): 30210-8.

W

- Walling, C. (1975). "The Fenton's reagent revisited." Acc Chem Res **8**: 125–131.
- Wang, N. J., S. Gottesman, M. C. Willingham, M. M. Gottesman et M. R. Maurizi (1993). "A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 11247–11251.
- Weeks, C. M. et R. Miller (1999). "The design & implementation of SnB 2.0." J Appl Cryst **32**: 120-124.
- Weiss, M. S. et R. Hilgenfeld (1997). "On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data." Journal of Applied Crystallography **30**(2): 203-205.
- Weissbach, H., L. Resnick et N. Brot (2005). "Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage." Biochim Biophys Acta **1703**(2): 203-12.
- Winterbourn, C. C. (2002). "Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid." Toxicology **181-182**: 223-7.
- Wizemann, T. M., J. Moskovitz, B. J. Pearce, D. Cundell, C. G. Arvidson, M. So, H. Weissbach, N. Brot et H. R. Masure (1996). "Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7985-90.
- Wolff, S. P. et R. T. Dean (1987). "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." Biochem J **245**(1): 243-50.
- Wu, J., F. Neiers, S. Boschi-Muller et G. Branlant (2005). "The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases." J Biol Chem **280**(13): 12344-50.

Y

- Yasui, H., S. Hayashi et H. Sakurai (2005). "Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions." Drug Metab Pharmacokinet **20**(1): 1-13.

Z

- Zhu, M., Z. J. Qin, D. Hu, L. A. Munishkina et A. L. Fink (2006). "Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles." Biochemistry **45**(26): 8135-42.
- Zhu, Z., J. J. Dumas, S. E. Lietzke et D. G. Lambright (2001). "A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release." Biochemistry **40**(10): 3027-36.
- Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 533-616.

RAPPORT DE SOUTENANCE

Concernant la thèse de **Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1**

en **Enzymologie Moléculaire et Biologie Structurale**

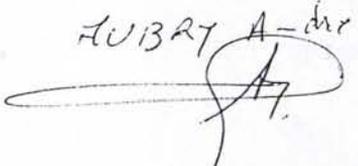
Présentée par **Fanomezana Moutsé RANAIVOSON**

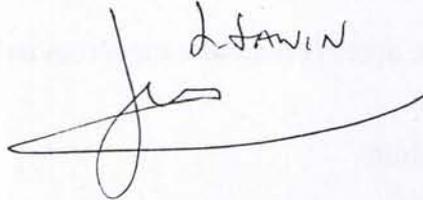
Le **23 Novembre 2007**

Ce jour, monsieur Fanomezana Moutsé Ranaivoson a présenté un travail de thèse intitulé « Caractérisation cristallographique d'intermédiaires réactionnels de méthionine sulfoxyde réductases en vue de la compréhension de leur mécanisme catalytique ». L'impétrant, très à l'aise, a fait un exposé clair, concis et didactique de ces travaux. Il a su faire une synthèse remarquable des nombreux résultats qu'il a obtenus. Il a également indiqué de manière précise les poursuites éventuelles de son travail. La discussion avec le jury a montré la maturité du candidat. Il a répondu de manière pertinente à l'ensemble des questions bien que celles-ci balayent des domaines allant de la biologie structurale à la biocristallographie en passant par l'enzymologie. Le jury lui a décerné le titre de Docteur de l'Université Henri Poincaré et y a joint ses chaleureuses et personnelles félicitations.

Président du Jury - Nom, Prénom et signature : **MUTZENHARDT Pierre** 

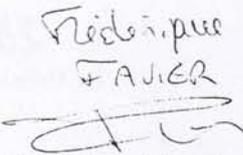
Membres du Jury - Nom, Prénom et signature :

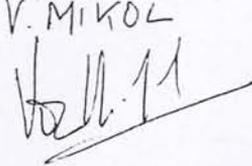
LUBRY A-dre


J. JAWIN


G. BRADLAMT


Jean Cavarotti


Friederique FAJER


V. MIKOL


N.B. De par décision du Conseil d'administration de l'Université en date du 2 décembre 2002, les jurys de soutenance de thèse de l'UHP Nancy 1 n'attribuent plus aucune mention à compter du 1^{er} janvier 2003.

Service de la Scolarité
Affaire suivie par Georges BILLANT

AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

Ecole Doctorale

..... B.I.O.S.E.....

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 en

..... ENZYMOLOGIE.. MOLECULAIRE.. ET.. BIOLOGIE.. STRUCTURALE

Nom et prénom de l'auteur : Fanomezana Moutsé RANAIVOSON
Date de la soutenance : 23 - Novembre - 2007

Président du Jury - Nom, Prénom : MUTZENHARDT, Pierre

Membres du Jury - Nom, Prénom :
CAVARELLI, Jean
JANIN, Joël
AUBRY, André
BRANLANT, Guy
MIKOL, Vincent
FAVIER, Frédérique

- Thèse pouvant être reproduite en l'état
 Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées au cours de la soutenance
 Thèse ne pouvant être reproduite

Le 23/11/2007
Le Président du Jury



Résumé

Les résidus méthionine sont facilement oxydables en sulfoxydes *in vivo*. Cette oxydation est réversible *via* la méthionine sulfoxyde réductase (Msr), un enzyme ubiquitaire. Dû aux deux configurations possibles du sulfoxyde, deux classes d'enzyme structurellement différents existent : les MsrA sont spécifiques de l'isomère *S*, et les MsrB de l'isomère *R*. Les deux possèdent un même mécanisme catalytique en deux étapes. La première étape est dédiée à la réduction du substrat ; elle aboutit à l'oxydation d'une cystéine en acide sulfénique. Puis le recyclage de l'enzyme s'opère avec la formation d'un pont disulfure intramoléculaire qui est finalement réduit par une thiorédoxine (Trx). Chez *Neisseria meningitidis* la protéine PilB porte MsrA et MsrB sous forme de deux domaines. Un troisième domaine à activité du type Trx existe en N-terminal. Les trois domaines isolés ont été étudiés par cristallographie. (i) Le domaine N-terminal : la structure confirme son homologie avec la Trx, mais son analyse révèle des éléments probablement à l'origine d'un fonctionnement particulier. (ii) La MsrA : la structure de deux mutants a permis d'observer un complexe avec un substrat et l'acide sulfénique. Leurs études s'additionnent à celles de l'enzyme sauvage sous formes réduite et oxydée en vue de l'étude du mécanisme catalytique. (iii) La MsrB : la structure d'un mutant a également permis d'obtenir un complexe et complète les structures des formes réduite et oxydée du sauvage. En addition, la structure de la MsrB de *Xanthomonas campestris* met à jour des différences conformationnelles entre MsrBs d'organismes différents. Enfin, l'étude structurale de PilB entier a été entamée en solution par la méthode de diffusion aux petits angles.

Mots clés : Stress oxydant, méthionine sulfoxyde réductase, MsrA, MsrB, PilB, *Neisseria meningitidis*, *Xanthomonas campestris*.