



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 et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie, Santé et Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Enzymologie Moléculaire et Biologie Structurale

par Xavier ROUSSEL

Enzymologie moléculaire d'une sulfinyl réductase, la sulfirédoxine : caractérisation du mécanisme catalytique.

Soutenance publique le 4 septembre 2009

Membres du Jury :

Président :	Mr J.P. Jacquot	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	Mr B. Badet	Directeur de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette
	Mr M. Toledano	Directeur de Recherche, CEA, Saclay
Examineur :	Mme S. Sanglier-Cianferani	Chargée de Recherche, CNRS/UdS, Strasbourg
Directeurs de thèse :	Mr G. Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	Mme S. Rahuel-Clermont	Chargée de Recherche, CNRS/UHP, Nancy I

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à Madame le Docteur Christiane Branlant, Directeur de l'UMR 7214 CNRS-UHP, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Guy Branlant, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale, qui a encadré ce travail. Je lui suis profondément reconnaissant pour m'avoir encadré depuis le DEA jusqu'à l'aboutissement de ma thèse. Je le remercie pour ces enseignements, la formation, la rigueur, la culture scientifique et les conseils avisés qu'il m'a transmis au cours de ma thèse. Par les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et ses conseils continus, il m'a guidé et aidé jusque dans la rédaction de cette thèse.

Je tiens à exprimer, plus que mes profonds remerciements, mais toute mon amitié à Madame le Docteur Sophie Rahuel-Clermont qui a dirigé mon travail. Je lui suis reconnaissant pour sa générosité, sa disponibilité, ses compétences, ses conseils, son sens de l'écoute et toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues au cours de ces cinq années. Merci pour son aide tout au long de mon DEA et de ma thèse, jusque dans la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent à Messieurs les Docteurs Bernard Badet et Michel Toledano, qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Madame le Docteur Sarah Sanglier et Monsieur le Professeur Jean-Pierre Jacquot d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Merci à Guillaume Béchade, à Sarah Sanglier, et à l'ensemble du laboratoire LSMBO à Strasbourg (UMR 7509 CNRS-ULP) pour m'avoir accueilli et initié aux joies de la spectrométrie de masse et pour notre fructueuse collaboration. Merci à Normi Mohd Yahaya, Christel Beaufiles et Marie-Christine Petit-Averlant du LCPM (UMR 7568 CNRS-ENSIC) pour les études structurales par RMN qui devraient aboutir sous peu.

Je veux remercier toute la « Srx team » : merci à Alexandre Kriznik pour son énorme travail sur le projet, mais plus particulièrement pour sa gentillesse et sa bonne humeur ; merci à Christelle Richard et à Salima Alaoui pour leur précieuse assistance et les bonnes tranches de rire ; merci aux Docteurs Hortense Mazon et Arnaud Gruez pour leurs conseils et les discussions partagées.

Merci à Madame le Professeur Sandrine Boschi-Muller et à Messieurs les Docteurs Christophe Jacob et François Talfournier pour leurs conseils, les discussions, l'aide et la bonne humeur partagés ensemble.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire AREMS, passés et présents, qui ont toujours été des « crèmes » avec moi, et particulièrement Sabrina, Carine, Séverine, Gaby, Flo, Audrey, Jocelyne, Raphaël (dit Bébel), Baptiste (dit p'tit poulet), Marouane, Christophe, Alex O, Mathias, Arnaud, Nico, Sylvain ... et notre regrettée Jackie.

Merci à toute ma famille, Papa et Maman, Papy et Mamie, Stéphanie - Jérôme et Emma, Marie et Mohamed, Aurélie, Damien, Tonton Jacques, mes beaux-parents, mes oncles et tantes - cousins et cousines. Merci à mes amis, Hélène et Pierre-Olivier - Albertine et Didier pour leurs, soutiens, gentillesse, taquineries, et disponibilité.

Enfin, je voudrais terminer en exprimant tout mon amour pour Laure, ma femme, ma meilleure amie, mon « bâton de pèlerin » ... qui me supporte, soutient, écoute, encourage et aime encore aujourd'hui. Ma vie à ses côtés m'a procuré joie, paix et force, nécessaires au bon déroulement de ce travail.

Merci à toutes et à tous !

Abréviations

ADP	: adenosine 5'-diphosphate
ATP	: adenosine 5'-triphosphate
C _P	: Cys peroxidatique
C _R	: Cys de recyclage
DO	: densité optique
DTNB	: dithionitrobenzoate
DTT	: dithiothréitol
ERO	: espèce reactive de l'oxygène
FAD	: flavine adenine dinucléotide
FPLC	: chromatographie liquide moyenne pression
Gpx	: glutaperoxydase
Grx	: glutarédoxine
GSH	: glutathion
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
IAM	: iodoacétamide
IPTG	: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
k_{cat}	: constante catalytique
k_{obs}	: constante de vitesse observée
k_{ADP}	: constante de vitesse de libération d'ADP
k_{Pi}	: constante de vitesse de libération de Pi
k_{ss}	: constante de vitesse à l'état stationnaire
k_{Trx}	: constante de vitesse maximale de réduction par la Trx
k_2	: constante de vitesse de second ordre
K_S	: constante apparente d'affinité
K_{Trx}	: constante apparente d'affinité pour la Trx
K_M	: constante de Michaelis
LB	: Luria Bertani
LDH	: lactate déshydrogénase
MPO	: myéloperoxydase
Msr	: méthionine sulfoxide réductase
NAD(P)H	: nicotinamide dinucléotide (phosphate), forme réduite
NAD(P)	: nicotinamide dinucléotide (phosphate), forme oxydée
NOX	: NADH oxydase
PAGE	: gel d'électrophorèse en polyacrylamide
<i>Pfu</i>	: ADN polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
Pi	: phosphate inorganique
PK	: pyruvate kinase

Abréviations

PNP	: purine nucleoside phosphorylase
Prx	: peroxyrédoxine
PTEN	: phosphatidylinositolphosphate phosphatase
PTP	: protéine tyrosine phosphatase
RMN	: résonance magnétique nucléaire
SDS	: sodium dodécyle sulfate
SOD	: superoxyde dismutase
SOR	: superoxyde réductase
Srx	: sulfirédoxine
scSrx	: sulfirédoxine de <i>S. cerevisiae</i>
scSrx _{ox}	: Srx oxydée sous forme de pont disulfure intramoléculaire
mSrx	: Srx de souris
hSrx	: Srx humaine
TFA	: acide trifluoroacétique
Tris	: trishydroxyméthylaminométhane
Trx	: thiorédoxine
ecTrx	: thiorédoxine de <i>E. coli</i>
scTrx	: thiorédoxine de <i>S. cerevisiae</i>
^{m7} Guo	: 7-méthyl guanosine
2PDS	: 2,2' dithiodipyridine
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>M. tuberculosis</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Table des Matières

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

Partie I : Le peroxyde d'hydrogène, une espèce réactive de l'oxygène toxique ou messenger cellulaire ?2

A. Origine et réactivité *in vivo* de H₂O₂.....2

***A.1 Origine de H₂O₂*.....2**

A.1.1 A partir de l'anion superoxyde.....3

A.1.2 A partir de la β-oxydation des acides gras.....6

A.1.3 Production spécifique de H₂O₂.....6

***A.2 H₂O₂ source de ERO*.....8**

B. Toxicité liée à H₂O₂.....10

***B.1 Action au niveau de l'ADN*.....10**

***B.2 Au niveau des lipides*.....11**

***B.3 Au niveau des protéines*.....12**

C. Elimination de H₂O₂.....13

***C.1 Les catalases*.....14**

***C.2 Les glutathion peroxidases*.....14**

***C.3 Les peroxyrédoxines*.....15**

D. H₂O₂ et signalisation cellulaire.....16

E. Conclusion sur les effets de H₂O₂.....17

Partie II : Oxydation des soufres dans les protéines et implications dans les mécanismes biologiques.....18

A. Différentes formes d'oxydations des acides aminés soufrés dans les cellules.....18

***A.1 Oxydation des méthionines*.....18**

***A.2 Oxydation des cystéines*.....19**

A.2.1 Oxydation impliquant un atome de soufre.....19

A.2.2 Oxydation impliquant deux atomes de soufre de Cys : oxydation sous forme de pont disulfure, de thiosulfinate et de thiosulfonate.....20

B. Cystéines oxydées comme intermédiaire catalytique.....22

***B.1 Ponts disulfure*.....22**

B.1.1	Système thiorédoxine et protéines cibles associées.....	22
B.1.2	Les glutarédoxines et le GSH.....	23
B.2	Acide sulfénique.....	24
B.2.1	Les méthionine sulfoxide réductases (Msr).....	24
B.2.2	Activité peroxydase des peroxyrédoxines.....	25
C.	Modification post-traductionnelle par oxydation des Cys.....	30
C.1	<i>Le système OxyR chez E. coli : pont disulfure.....</i>	<i>30</i>
C.2	<i>Le mécanisme d'activation des facteurs de transcription Yap-1 et Pap-1 chez S. cerevisiae et chez Schizosaccharomyces pombe : acide sulfénique et pont disulfure.....</i>	<i>31</i>
C.3	<i>Les tyrosine phosphatases (PTP) chez les eucaryotes : sulfénamide et pont disulfure.....</i>	<i>33</i>
C.4	<i>Activation de la protéine DJ-1 : acide sulfinique.....</i>	<i>34</i>
C.5	<i>Rôle de protéine chaperon des 2-Cys Prx oxydées : acide sulfi(o)nique.....</i>	<i>36</i>
C.5.1	Mécanisme de suroxydation.....	36
C.5.2	Rôle biologique.....	37
D.	Conclusions sur la réactivité des sulfures au niveau des protéines	38
Partie III :	Enzymes à activité Sulfinyl réductase : les sulfirédoxines	39
A.	Réversibilité de l'oxydation d'une cystéine sous forme acide sulfinique.....	39
A.1	<i>Réduction des 2-Cys Prx eucaryotes suroxydées sous forme d'acide sulfinique, in vivo.....</i>	<i>39</i>
A.2	<i>Enzymes à activité sulfinyl réductase.....</i>	<i>40</i>
A.2.1	Découverte des sulfirédoxines.....	40
A.2.2	Découverte des sestrines.....	44
B.	Rôle des sulfirédoxines au niveau cellulaire.....	45
B.1	<i>Rôle dans la régulation de l'activité des 2-Cys Prx.....</i>	<i>45</i>
B.2	<i>Rôle dans la déglutathionylation de protéines.....</i>	<i>47</i>
C.	Structure et mécanisme de Srx.....	47
C.1	<i>Mécanisme enzymatique hypothétique de Srx pour la réduction des Prx oxydées sous forme d'acide sulfinique.....</i>	<i>47</i>
C.2	<i>Etude des Srx de mammifères.....</i>	<i>49</i>
C.3	<i>Structure de Srx.....</i>	<i>49</i>
Objectifs	54	

RESULTATS

Résultats I : Caractérisation de l'activité réductase de Srx.	55
A. Travaux de l'équipe de Rhee.	56
B. Mise en évidence de l'activité réductase de scSrx.....	58
<i>B.1 Paramètres cinétiques à l'état stationnaire.....</i>	<i>59</i>
<i>B.2 Suivi cinétique de la libération de phosphate au cours de la réaction. ..</i>	<i>60</i>
<i>B.3 Caractérisation de l'intermédiaire réactionnel thiosulfinate entre scSrx et Prx.....</i>	<i>62</i>
B.3.1 Mise en évidence d'un complexe covalent thiosulfinate entre scSrx et Prx.	62
B.3.2 Compétence catalytique de l'intermédiaire thiosulfinate.	64
C. Conclusion.	65
D. Publication 1.	66
Résultats II : Etude du recyclage de Srx lors du cycle catalytique. 85	85
A. Recyclage de Srx de <i>S. cerevisiae</i>.....	85
<i>A.1 La Cys48 est impliquée dans le mécanisme de recyclage de l'activité scSrx.....</i>	<i>85</i>
<i>A.2 Réduction de scSrx_{ox} par la Trx.....</i>	<i>87</i>
B. Publication 2.	90
C. Mécanisme de recyclage de Srx chez les mammifères.	110
D. Conclusion.	112
Résultats III : La Cys catalytique de Srx joue-t-elle un rôle dans la première étape de transfert de phosphate ?.....	113
A. Travaux de Jeong <i>et al.</i> et de Jönsson <i>et al.</i>	113
B. Caractérisation cinétique de l'étape de transfert de phosphate.	114
C. Transfert du phosphate γ de l'ATP sur PrxSO₂.	117
D. Publication 3.	119

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Partie I : Chimie de la catalyse.	131
A. Nature de l'intermédiaire acide sulfinique activé.	131

B. Nature des acides aminés qui seraient impliqués dans la catalyse chimique.	135
--	------------

Partie II : Reconnaissance structurale et moléculaire entre Prx et Prx.	137
--	------------

A. Mécanisme de reconnaissance Prx/Srx	137
---	------------

B. Stœchiométrie de l'interaction Prx/Srx	139
--	------------

Partie III : Devenir de l'intermédiaire thiosulfinate Prx-SO-S-Srx..	141
---	------------

A. Srx à deux Cys.	141
---------------------------------	------------

B. Srx à une Cys.	143
--------------------------------	------------

MATERIELS ET METHODES

A. Matériel biologique et milieux de culture.	145
--	------------

<i>A.1 Souches bactériennes.</i>	145
--	------------

<i>A.2 Plasmides.</i>	145
-----------------------------	------------

<i>A.3 Milieux de culture bactérienne.</i>	145
--	------------

B. Techniques de génie génétique.	146
--	------------

<i>B.1 Préparation de l'ADN plasmidique.</i>	146
--	------------

B.1.1 La minipréparation.	146
--------------------------------	-----

B.1.2 Analyse de l'ADN.	147
------------------------------	-----

B.1.3 Préparation et transformation des bactéries compétentes.	147
---	-----

<i>B.2 Mutagenèse dirigée par PCR.</i>	148
--	------------

C. Production, purification de Prx et PNP.	148
---	------------

<i>C.1 Production.</i>	148
------------------------------	------------

<i>C.2 Purification</i>	149
-------------------------------	------------

C.2.1 Extraction.....	149
-----------------------	-----

C.2.2 Chromatographie d'affinité sur complexe Ni ²⁺ (IMAC).	149
---	-----

C.2.3 Concentration et conservation des protéines.	149
---	-----

D. Production, purification de la Srx de <i>S. cerevisiae</i>.	150
---	------------

<i>D.1 Culture et extraction.</i>	150
---	------------

<i>D.2 Précipitation au sulfate d'ammonium.</i>	150
---	------------

<i>D.3 Chromatographie échangeuse de cations</i>	150
--	------------

<i>D.4 Chromatographie d'interactions hydrophobes.</i>	151
--	------------

E. Oxydation de Prx de <i>S. cerevisiae</i> sous forme acide sulfinique et sous forme disulfure.	151
---	------------

<i>E.1 Mise au point du test d'activité peroxydase de Prx.</i>	151
--	------------

<i>E.2 Oxydation de la Cys catalytique de Prx sous forme acide sulfinique...</i>	151
F. Caractérisation biochimique des protéines.	152
<i>F.1 Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....</i>	<i>152</i>
<i>F.2 Détermination de la masse moléculaire des protéines par spectrométrie de masse en électrospray et en conditions dénaturantes.</i>	<i>152</i>
<i>F.3 Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines.</i>	<i>154</i>
<i>F.4 Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB).</i>	<i>154</i>
<i>F.5 Spectres de fluorescence de Srx et de Prx réduites et oxydées.</i>	<i>154</i>
G. Caractérisation enzymatique de la Srx de <i>S. cerevisiae</i>.	154
<i>G.1 Technique d'étude des propriétés enzymatiques.</i>	<i>154</i>
<i>G.1.1 Test d'activité en présence du réducteur Trx.</i>	<i>154</i>
<i>G.1.2 Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.</i>	<i>154</i>
<i>G.1.3 Cinétique de l'évolution du message de fluorescence de Prx lors de la réaction catalysée par Srx, en fonction du pH.</i>	<i>155</i>
<i>G.2 Techniques d'étude du mécanisme catalytique.</i>	<i>155</i>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction

Le métabolisme aérobie produit des formes activées de l'oxygène, parmi lesquelles les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les entités nitrées réactives et les entités halogénées réactives. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une ERO qui peut se révéler toxique pour la cellule, par modification au niveau des macromolécules biologiques. Un ensemble de systèmes de défense antioxydants, dont les peroxyrédoxines (Prx), a été mis en place au cours de l'évolution permettant d'éliminer cette entité. A l'opposé, un ensemble de données convergentes montrent qu' H_2O_2 joue également le rôle de messenger dans la signalisation cellulaire par des mécanismes impliquant des cascades d'oxydation de protéines au niveau de résidus Cys, et dans certains cas *via* un relais par les Prx.

Lors de la réaction de réduction de H_2O_2 , certaines Prx subissent une suroxydation, sous forme d'acide sulfinique, du résidu Cys catalytique et ainsi être inactivées. Cette inactivation, pouvant être considérée comme une modification post-traductionnelle et transitoire, permettrait la régulation des voies de signalisation cellulaire associées à H_2O_2 par les Prx, impliquant l'existence de voies de régénération des Prx suroxydées. Au début de mes travaux de thèse, deux enzymes avaient été décrites permettant la régénération de l'activité peroxydase des Prx à deux cystéines typiques eucaryotes, les situant à la frontière des fonctions de réparation des protéines et de la régulation rédox, les sestrines et les sulfirédoxines (Srx).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la sulfirédoxine de *Saccharomyces cerevisiae*, première enzyme à activité cystéine sulfinyl réductase découverte. Mon projet de recherche avait pour objectif de déterminer, sur la base d'hypothèses existantes, le mécanisme catalytique de cette enzyme en caractérisant cinétiquement chacune des étapes réactionnelles et en montrant l'existence des différents intermédiaires réactionnels.

Mon mémoire commence par une introduction composée de trois parties. La première partie de l'Introduction est dédiée au peroxyde d'hydrogène, son origine au niveau cellulaire, résultat du métabolisme cellulaire ou produit spécifiquement, son mode d'action et son mode d'élimination, et pourquoi il est considéré aujourd'hui comme un messenger cellulaire. La seconde partie est consacrée à la réactivité des acides aminés soufrés au sein des protéines, et dans ce cadre aux rôles que peuvent avoir les Cys oxydées sous différents états dans les cellules. La troisième et dernière partie de l'introduction aborde l'état des connaissances sur la découverte, les rôles, le mécanisme et les aspects structuraux des sulfirédoxines, suivi par un résumé des objectifs du projet de thèse. Les résultats de mon travail de recherche sont présentés ensuite, suivis d'une partie discussion de ces résultats et des questions qui restent posées. Enfin, une partie «Matériels et Méthodes» est ajoutée en fin de manuscrit.

Partie I : Le peroxyde d'hydrogène, une espèce réactive de l'oxygène toxique ou messenger cellulaire ?

Le peroxyde d'hydrogène a longtemps été considéré comme une ERO impliquée, directement ou non, dans la modification des macromolécules biologiques. C'est une molécule «non désirée» du métabolisme cellulaire, produite de manière non spécifique. De récentes études montrent que H_2O_2 peut être aussi produit, en faible concentration, de manière spécifique et contribue au bon fonctionnement cellulaire. Une fois dans la cellule, il peut réagir directement sur les biomolécules ou produire d'autres ERO qui pour la plupart sont plus réactives. Il doit donc être éliminé de manière efficace afin d'éviter l'altération des fonctions de la cellule. Toutefois, l'importance de H_2O_2 dans certaines voies de signalisation cellulaire, sa production spécifique, ainsi que la régulation de certaines voies d'élimination, sont autant d'arguments en faveur du rôle de messenger cellulaire de H_2O_2 .

A. Origine et réactivité *in vivo* de H_2O_2 .

H_2O_2 est un des éléments centraux des ERO, étant le produit de la réduction à deux électrons de l'oxygène moléculaire O_2 mais aussi le précurseur d'autres ERO plus réactives comme le radical hydroxyl ($OH\cdot$) (Figure 1 page 2).

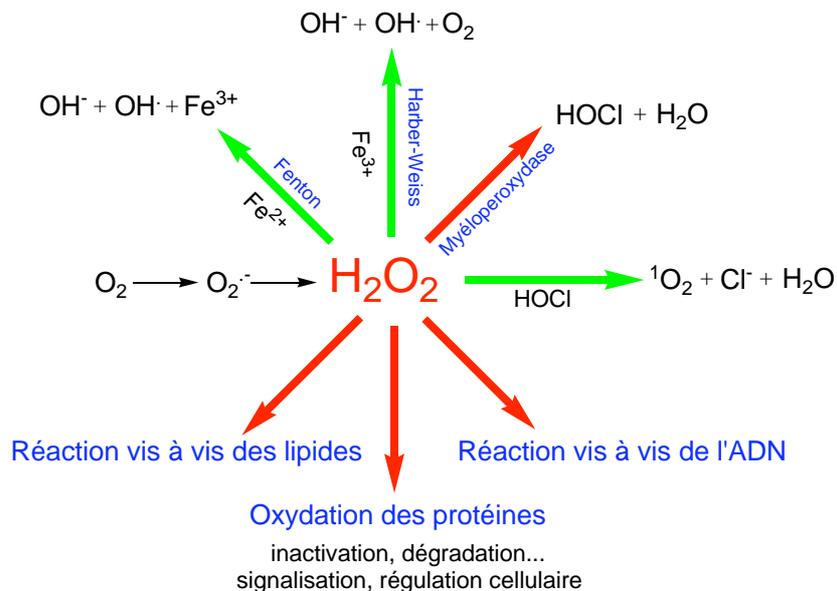


Figure 1 : Principales réactions issues de H_2O_2 .

Les réactions inorganiques et impliquant des molécules biologiques sont représentées, respectivement, par des flèches vertes et rouges.

A.1 Origine de H₂O₂.

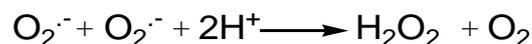
La production de H₂O₂ fait intervenir des systèmes enzymatiques complexes et très efficaces, principalement au niveau du métabolisme cellulaire aérobie où H₂O₂ est produit de manière non spécifique. D'autres systèmes enzymatiques produisent spécifiquement H₂O₂ en réponse à des stimuli.

A.1.1 A partir de l'anion superoxyde.

La production de H₂O₂ dérive principalement de la production du radical anion superoxyde O₂^{•-}. Ce dernier est produit lors de la réduction à un électron de l'oxygène moléculaire (Messner et Imlay, 1999 ; Messner et Imlay, 2002) au cours du métabolisme aérobie. Cette production se fait de façon continue suite à des fuites électroniques au niveau de la chaîne respiratoire. O₂^{•-} est également produit de façon spécifique par la NADPH oxydase (NOX) au cours de phénomènes inflammatoires ou d'une réaction immunitaire antimicrobienne chez les mammifères (Lambeth, 2004). Le radical anion superoxyde est ensuite réduit par voie enzymatique par les superoxydes dismutases et les superoxydes réductases, conduisant à la production de H₂O₂.

A.1.1.1 Les superoxyde dismutases.

Une source majeure de production de H₂O₂ passe par la dismutation du radical anion superoxyde O₂^{•-} spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases (SOD) qui sont des métalloenzymes ubiquitaires, selon la réaction :



La famille des SOD peut être divisée en trois classes selon le type de centre métallique présent (Fe²⁺ ou Mn²⁺, Cu²⁺/Zn²⁺, Ni²⁺) et selon leur homologie structurale. Ces trois classes diffèrent en plus par leur localisation cellulaire.

Les SOD à centre Cu²⁺/Zn²⁺ ne sont pas ubiquitaires. Chez les bactéries, la Cu²⁺/Zn²⁺-SOD est produite uniquement chez les bactéries gram négatives, où elle est localisée dans le périplasme (Kroll *et al.*, 1995) ou ancrée à la membrane externe comme la Cu²⁺/Zn²⁺-SOD de *Mycobacterium tuberculosis* (Wu *et al.*, 1998). Dans les cellules eucaryotes, la Cu²⁺/Zn²⁺-SOD est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Weisiger et Fridovich, 1973) où elle a un rôle constitutif de lutte contre les fuites de O₂^{•-} associées à la respiration (Ho *et al.*, 1996). Les SOD à centre Fe²⁺ et Mn²⁺ ont été regroupées dans la même classe uniquement en raison de leur structure tertiaire très proche, et du fait que le centre actif peut

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

accepter indifféremment du Fe^{2+} ou du Mn^{2+} , sans que l'activité globale soit modifiée (Martin *et al.*, 1986). Les Fe^{2+} -SOD ne sont pas présentes dans les cellules eucaryotes, hormis dans le cytoplasme de quelques protozoaires et dans les chloroplastes de plantes (Jackson *et al.*, 1978). Dans le cytosol des bactéries, les Fe^{2+} -SOD sont proches de la membrane interne, alors que les Mn^{2+} -SOD sont proches du nucléoïde afin d'assurer une protection efficace de l'ADN (Gregory *et al.*, 1973). Les Mn^{2+} -SOD sont présentes dans les cellules eucaryotes, au niveau de la matrice mitochondriale (Weisiger et Fridovich, 1973). Elles y jouent un rôle dans la protection du complexe III de la chaîne respiratoire (Raha *et al.*, 2000). Leur expression semble être régulée par plusieurs facteurs de transcription comme le système SoxR/S, suite à une hyperoxie ou une variation de la disponibilité en Mn^{2+} (Compan et Touati, 1993), ce qui lui confère un rôle spécifique. La classe des SOD à centre Ni^{2+} a été mise en évidence plus récemment, chez les actinomycètes *Streptomyces pyogenes* et *Streptomyces coelicolor* (Youn *et al.*, 1996). Jusqu'à présent, aucun rôle biologique associé à une quelconque résistance à un stress oxydant n'a été mis en évidence pour cette classe.

Ces trois classes, bien que différentes, ont en commun un mécanisme catalytique de dismutation de O_2^- en deux étapes (Figure 2 page 4) :

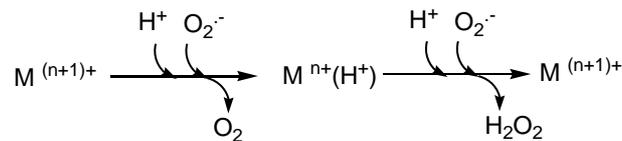


Figure 2 : Réduction en deux étapes de la dismutation de O_2^- par les SOD (d'après McCord et Fridovich, 1969).

$\text{M}^{(n+1)+}$ et M^{n+} correspondent respectivement aux états $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ et $\text{Cu}^+\text{Zn}^{2+}$, Fe^{3+} et Fe^{2+} , Mn^{3+} et Mn^{2+} , Ni^{3+} et Ni^{2+} des Cu/Zn, Fe, Mn et Ni SOD.

A l'état initial, le centre métallique de la SOD est oxydé ($\text{M}^{(n+1)+}$). Sous cette forme, il oxyde une molécule de O_2^- avec fixation d'un proton, libérant une molécule de O_2 et l'enzyme sous forme réduite et protonée. Puis l'enzyme réduit une deuxième molécule de O_2^- en présence d'un autre proton, formant ainsi une molécule de H_2O_2 et de la SOD oxydée régénérée au niveau de son centre métallique (McCord et Fridovich). L'efficacité enzymatique de cette réaction est très élevée, de l'ordre de $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

A.1.1.2 Les superoxyde réductases.

Une autre activité enzymatique permettant la réduction de O_2^- en H_2O_2 a été mise en évidence chez les bactéries anaérobies strictes ou microaérophiles, et est retrouvée

uniquement chez les bactéries : l'activité superoxyde réductase (SOR). Elle catalyse la réaction suivante :



A la différence des SOD, cette réaction ne produit pas de O_2 . Ceci est essentiel pour les bactéries strictement anaérobies, qui ne possèdent pas, pour la plupart, de SOD. Cette famille de métalloenzymes est capable de suppléer l'absence d'activité SOD dans une souche d'*Escherichia. coli*, en éliminant directement $\text{O}_2^{\cdot-}$ mais sans activité SOD (Liochev et Fridovich, 1997). Cette famille comporte trois classes d'enzymes, différentes par leurs séquences et leur structure (Romao *et al.*, 1999 ; Silva *et al.*, 1999 ; Lombard *et al.*, 2000 ; Yeh *et al.*, 2000 ; Jovanovic *et al.*, 2000 ; Clay *et al.*, 2002). Chaque classe possède cependant un centre à un Fe (centre II) qui porte l'activité SOR permettant de réduire $\text{O}_2^{\cdot-}$ par transfert d'un électron. Il est à noter que ce centre possède également une activité SOD, bien que très faible en comparaison de l'activité SOR. Un mécanisme en trois étapes a été proposé pour la réduction de $\text{O}_2^{\cdot-}$ par les SOR (Mathé *et al.*, 2005) (Figure 3 page 5). Dans un premier temps, l'anion superoxyde réagit avec le Fe^{2+} du site actif avec une constante de vitesse de second ordre $k_2 = 1.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. La charge positive de la lysine proximale (Lys48) favoriserait cette vitesse de réaction très rapide en « guidant » l'anion superoxyde jusqu'au centre actif. Le premier intermédiaire réactionnel est proposé comme étant un Fe^{3+} -peroxo (Mathé *et al.*, 2002) résultant de la fixation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ sur la 6^{ème} position de coordination du fer. La seconde étape correspond à un processus de protonation dont la constante de vitesse est dépendante du pH, indiquant que le proton vient directement du solvant. Le second intermédiaire est supposé être un Fe^{3+} -hydroperoxo (Katona *et al.*, 2007 ; Wilmot, 2007). Enfin, la dernière étape consisterait en un second processus de protonation. Cette réaction serait associée à la présence d'un acide aminé protoné au sein du site actif qui fournirait le proton nécessaire à la libération de H_2O_2 . Après un cycle catalytique, la SOR est oxydée. Pour être de nouveau active en tant que réductase, il est nécessaire qu'elle soit réduite. Elle ne semble pas présenter de spécificité pour sa réduction. En effet, elle est capable d'accepter les électrons d'une large gamme de donneurs (NADPH-flavodoxine réductase, cytochromes, rubrédoxine) (Emerson *et al.*, 2003).

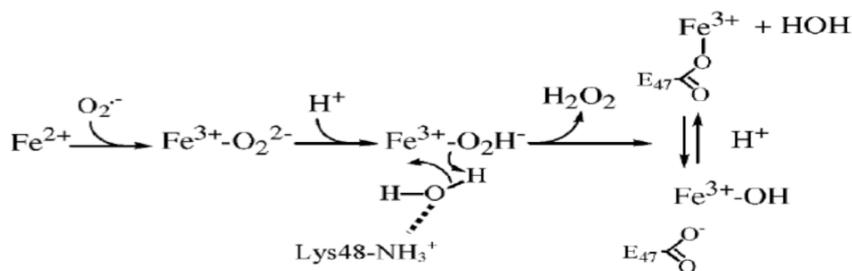


Figure 3 : Mécanisme proposé pour la SOR de *D. baarsii* (Mathe *et al.*, 2005).

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

A.1.2 A partir de la β -oxydation des acides gras.

Une autre source de H_2O_2 est la réduction à deux électrons de O_2 , produits par la β -oxydation des acides gras à très longues chaînes (pour revue, voir Arent *et al.*, 2008), qui a lieu au niveau du peroxysome. Elle permet la transformation de ces acides gras en acétyl-CoA, qui entre dans le cycle de Krebs et fournit de l'énergie ou sert de source de carbone.

L'acide gras activé sous forme d'acyl-CoA est converti en énoyl-CoA par l'action de l'acyl-CoA oxydase. C'est la première étape de la β -oxydation. Cette enzyme transfère, lors de la réaction, deux électrons de l'acyl-CoA au FAD qui est réduit en $FADH_2$. Ces électrons sont ensuite transférés directement à l'oxygène moléculaire qui est réduit en H_2O_2 (Figure 4 page 6). Dans les mitochondries, l'enzyme permettant la conversion de l'acyl-CoA en énoyl-CoA est l'acyl-CoA déshydrogénase qui forme également du $FADH_2$, mais ce dernier ne transfère pas ses électrons à l'oxygène moléculaire mais à la chaîne de transport des électrons afin de produire de l'énergie.

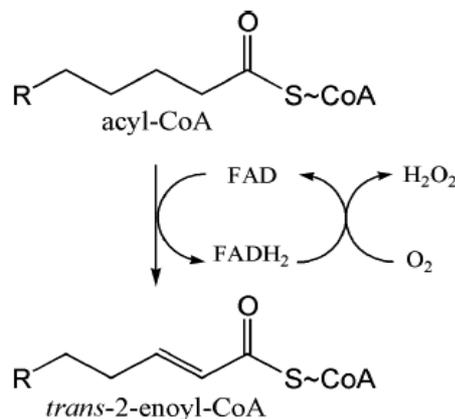


Figure 4 : Oxydation de l'acyl-CoA en énoyl-CoA par l'acyl-CoA oxydase lors de la β -oxydation au niveau du peroxysome et formation de H_2O_2 (d'après Arent *et al.*, 2008).

A.1.3 Production spécifique de H_2O_2 .

Certaines classes d'enzymes sont impliquées dans la production spécifique de H_2O_2 . C'est le cas des enzymes membranaires de la famille des NADPH oxydases (NOX) (pour revue voir Lambeth, 2004) qui catalyse la réduction de O_2 en $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ qui est ensuite réduit en H_2O_2 par les SOD. Les premières NOX caractérisées dans les cellules de mammifères ont été celles des cellules phagocytaires. Ces NOX catalysent la production d'ERO, après activation par des médiateurs inflammatoires ou par infection par des microorganismes, alors que dans des conditions normales elles sont inactives. Par la suite, des homologues des

NOX phagocytaires ont été découvertes dans des cellules autres que les phagocytes, par exemple dans les cellules du colon, de muscles, de foie ou encore de la thyroïde.

La famille des NOX est divisée en trois classes, possédant une même structure de base responsable de la réduction de O_2 en O_2^- , mais différentes par l'existence de domaines supplémentaires régulateurs (NOX5) ou/et enzymatiques (DUOX). Les NOX sont des enzymes membranaires, composées d'un domaine N-terminal hydrophobe composé de six hélices α transmembranaires et d'un domaine C-terminal cytoplasmique fixant les cofacteurs FAD et NAD(P)H. Le domaine N-terminal contient cinq His conservées dont quatre participent à la fixation de deux hèmes (Figure 5 page 7). Ces enzymes permettent le transfert d'un électron du NAD(P)H, dans le cytoplasme, *via* le FAD et les deux atomes de Fe des hèmes, vers O_2 pour générer O_2^- hors de la cellule, qui est réduit en H_2O_2 par les SOD. Les classes des NOX5 et DUOX contiennent en plus en N-terminal un domaine cytoplasmique de fixation du calcium, calmoduline-dépendant, qui permet la régulation de leur activité. Dans la première classe (autre que NOX5 et DUOX), la régulation de l'activité des NOX se fait par des protéines régulatrices en réponse à des facteurs de croissance, comme nous le verrons dans la partie II de l'introduction, ou à d'autres *stimuli* comme une réaction inflammatoire dans le cas des NOX phagocytaires. La classe des DUOX possède en plus des autres classes, une hélice α transmembranaire suivi d'un domaine extracellulaire possédant une activité peroxydase.

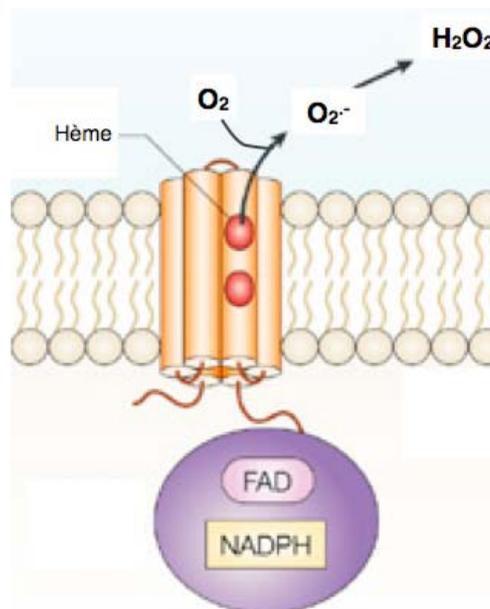


Figure 5 : Représentation des NOX au niveau des membrane (d'après Lambeth, 2004).

Le domaine N-terminal composé de six hélice α transmembranaires est représenté en orange. Les deux hèmes sont représentés sous forme de boules rouges. Le domaine C-terminal comportant les cofacteurs est représenté dans le cytoplasme en violet. Le milieu extracellulaire est coloré en bleu ciel. Les électrons sont transférés du NADPH à O_2 *via* le FAD et les deux hèmes, pour former O_2^- puis H_2O_2 par les SOD.

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

A.2 H₂O₂ source de ERO.

H₂O₂ est une ERO en lui-même qui peut réagir directement vis-à-vis des biomolécules, mais c'est aussi une molécule centrale dont dérivent d'autres ERO (Figure 1 page 2).

Il peut être converti par la réaction de Fenton en radical hydroxyle OH·, impliquant des ions métalliques tels que Fe²⁺ ou Cu⁺ (Figure 6 page 8). Lors de la réaction de Haber-Weiss, il peut réagir avec O₂^{·-} en présence de Fe³⁺ pour produire de l'oxygène moléculaire, OH⁻ et OH· (Figure 7 page 8).



Figure 6 : Réaction de Fenton.

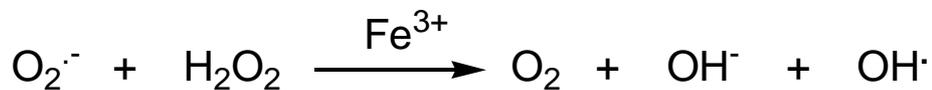


Figure 7 : Réaction de Haber-Weiss.

Toutefois, ces réactions seraient très limitées au niveau cellulaire du fait de l'indisponibilité du Fe²⁺ ou Fe³⁺. En effet, il n'y a pas de fer libre dans les cellules, ce dernier étant stocké sous forme de complexes protéiques ou lié à différentes molécules. Le fer est stocké, dans les cellules, dans les ferritines. Les ferritines sont des protéines ubiquitaires formées de 24 sous-unités identiques assemblées en une structure sphérique, qui peut lier jusqu'à 4500 molécules de fer sous forme ferrihydrite (FeOOH) (Hudson *et al.*, 1993). De façon générale, l'entrée du fer dans les cellules est régulée, le fer est chélaté par une protéine ou une biomolécule reconnue par un récepteur cellulaire. Chez les eucaryotes et certaines bactéries pathogènes comme la bactérie *Neisseria meningitidis*, le récepteur est une glycoprotéine qui possède un domaine extracellulaire. Après ancrage spécifique de la transferrine, protéine qui fixe un atome de Fe³⁺ à internaliser, une réorganisation conformationnelle du récepteur provoque le transfert du Fe³⁺ à l'intérieur de la cellule (Oakhill *et al.*, 2002). Pour d'autres bactéries non pathogènes, le fer peut être chélaté par les sidérophores, petites molécules dont la masse n'excède pas 1000 Da et internalisé *via* l'interaction avec des récepteurs à sidérophores, comme pour la transferrine (Dorsey *et al.*, 2004).

H₂O₂ peut également être converti en acide hypochloreux (HOCl) par l'action de la myeloperoxydase (MPO). Cette réaction est importante dans les cellules phagocytaires lors d'une infection bactérienne, où l'acide hypochloreux produit va jouer le rôle de bactéricide puissant (Hampton *et al.*, 1998). La MPO est une enzyme à hème qui possède une activité

peroxydase et de chloration. Elle utilise H_2O_2 et catalyse l'oxydation à deux électrons des ions Cl^- pour former HOCl. La réduction de H_2O_2 en H_2O par la MPO- $Fe^{(3+)}$ aboutit à l'oxydation de la MPO, conduisant au composé I ou Cd I ($MPO^+ \cdot - Fe^{(4+)}$). Ce Cd I, très réactif, réagit rapidement avec les ions chlorures pour former HOCl. Mais il réagit aussi avec des réducteurs, comme les nitrites, l'ascorbate ou encore la Tyr, pour former le composé II (Cd II = $MPO - Fe^{(4+)}$) et une espèce oxydée radicalaire du réducteur. Le retour à la forme native de la MPO se fait après la réaction du composé II avec une autre molécule de réducteur (Figure 8 page 9). Les formes radicalaires produites à partir de ces substrats peuvent conduire à la formation de composés actifs, comme le radical tyrosyl à l'origine de lipoperoxydations (Podrez *et al.*, 2000).

La production de HOCl est toxique non seulement pour les bactéries mais aussi pour tout organisme vivant. En effet, HOCl a un fort pouvoir d'oxydation des protéines et notamment au niveau des acides aminés soufrés (Thomas *et al.*, 2000 ; Carr *et al.*, 2001). De plus, il peut réagir avec l'anion superoxyde formant ainsi OH^- , sans nécessiter la présence de fer libre comme pour la réaction de Fenton (Candias *et al.*, 1994).

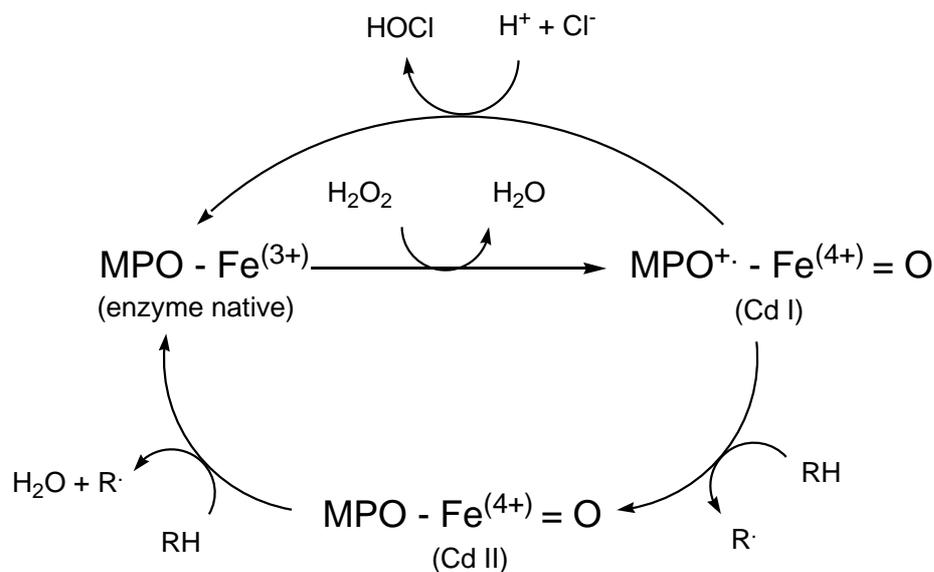


Figure 8 : Schéma réactionnel de l'activité enzymatique de la MPO (d'après Prodez *et al.*, 2000).

Cd I = composé I = composé à $Fe^{(IV)}$ portant un radical libre sur un acide aminé de l'enzyme, Cd II = composé II = composé à $Fe^{(IV)}$, RH = réducteur, $R \cdot$ = réducteur sous forme radicalaire

L' H_2O_2 est aussi à l'origine de la production d'oxygène singulet (1O_2) par réaction avec HOCl (Karnofsky *et al.*, 1984). Cette forme de l'oxygène, très réactive, est capable d'oxyder la majorité des composés organiques.

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

Les ERO issues de réactions impliquant des métaux ou des enzymes à centre métallique à partir de H₂O₂ sont donc des espèces très réactives possédant des effets toxiques non spécifiques. Ceci confère alors à H₂O₂ un statut de molécule toxique.

B. Toxicité liée à H₂O₂.

La plupart des classes de biomolécules, incluant l'ADN, les lipides et les protéines sont sensibles à l'oxydation par les ERO. Les effets de H₂O₂ peuvent être directs ou indirects, notamment par l'action des différentes espèces oxydantes générées *in situ* à partir de celui-ci (voir §A.2).

B.1 Action au niveau de l'ADN.

L'action de H₂O₂ au niveau de l'ADN est essentiellement indirecte. Par exemple, cinq classes de dommages oxydatifs médiés par OH[•] ont été décrits (Favier, 2003). La réactivité de OH[•] sur l'ADN n'est pas spécifique. Il peut en résulter l'oxydation des bases, la rupture de la liaison entre la base et l'ose créant ainsi des sites abasiques, la rupture de la liaison phosphodiester provoquant une coupure de chaîne simple ou double brin, la formation d'espèces radicalaires sur l'ADN provoquant la formation d'adduits avec des dérivés d'oxydation lipidique ou des pontages ADN-protéines (Figure 9 page 11). Dans le cas où les processus de réparation sont insuffisants, ces modifications peuvent conduire à des mutations, responsables par la suite de processus de cancérisation, ou encore à une incapacité de réplication entraînant la mort cellulaire.

De nombreux systèmes de réparation existent. Certains sont plus ou moins spécifiques de lésions faisant suite à un stress oxydant. Le système majeur est le système par excision de base dont des enzymes clé sont les ADN-glycosylases qui coupent la lésion N-glycosidique en générant un site abasique (Krokan *et al.*, 1997). Le nucléotide peut être directement remplacé après excision de celui-ci ou être remplacé après excision préalable d'un maximum de six nucléotides (Frosina *et al.*, 1996).

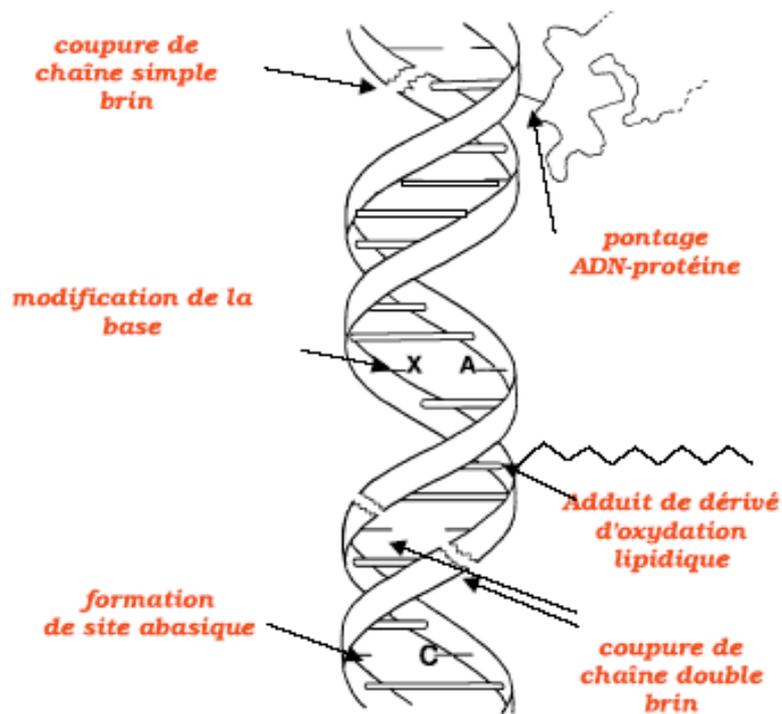


Figure 9 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire de $\text{OH}\cdot$ (d'après Favier, 2003).

B.2 Au niveau des lipides.

Les lipides sont aussi une cible des ERO, *via* une réaction radicalaire en chaîne : la peroxydation lipidique. Le processus est initié par l'arrachement d'un proton par le radical $\text{OH}\cdot$ entre deux double liaisons d'acides gras polyinsaturés formant ainsi un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy par O_2 . La réaction est amplifiée par l'attaque de ce dernier sur un autre acide gras insaturé pour donner un peroxyde et un nouveau radical diène conjugué. Ces peroxydes peuvent évoluer pour donner des composés non toxiques qui seront éliminés. Le radical peroxy peut également se transformer en peroxyde cyclique qui se fragmente en différents aldéhydes toxiques comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 5-hydroxynonéanal (Figure 10 page 12). Les conséquences de ce processus sont différentes suivant que la modification a lieu sur des lipides circulants ou des lipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation des lipoprotéines de densité légère (LDL) conduit à la formation du dépôt lipidique de la plaque d'athérome responsable des maladies cardiovasculaires. Dans le cas des phospholipides membranaires, les modifications produites par $\text{OH}\cdot$ modifient la fluidité membranaire, et donc le fonctionnement de récepteurs et de canaux, et causent des réactions d'oxydation secondaires au niveau des protéines membranaires (Favier, 2003).

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

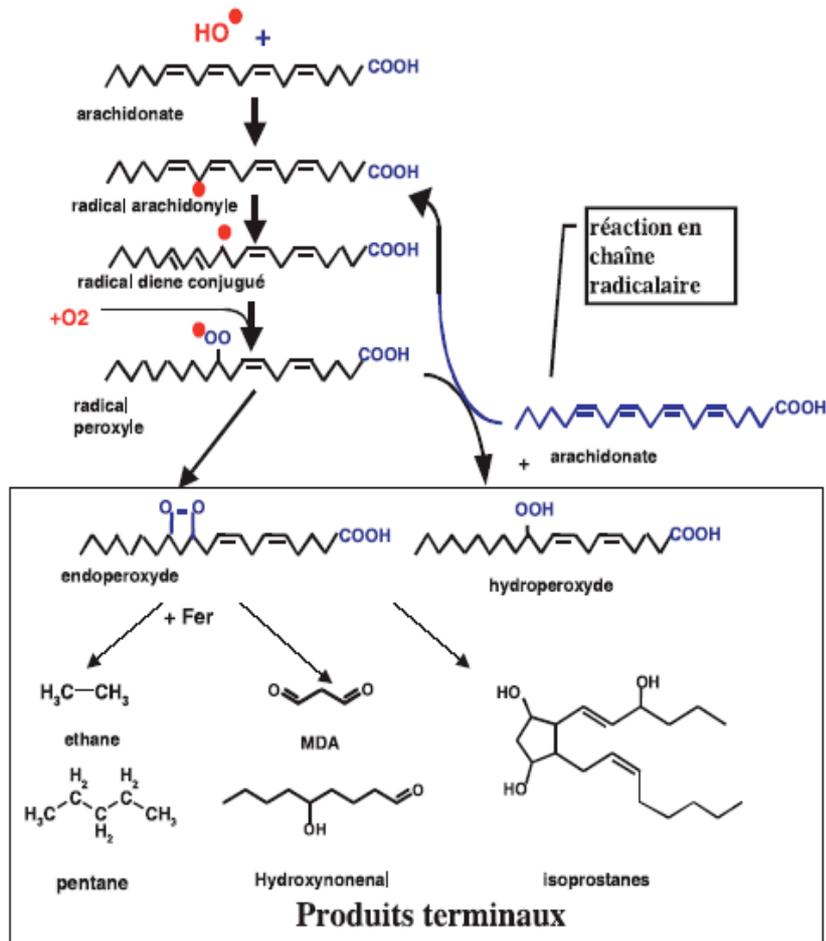


Figure 10 : Réaction en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (d'après Favier, 2003).

Plusieurs systèmes enzymatiques de réparation des lipides hydroperoxydés existent. Ces systèmes, comme nous le verrons dans le chapitre C, ne sont pas spécifiques de la réduction des lipides hydroperoxydés, mais peuvent aussi réduire H_2O_2 ; c'est le cas par exemple des glutathion peroxydases (Gpx) ou de certaines peroxyrédoxines. La famille des Gpx présente une certaine spécificité de substrat. Ainsi, la phospholipide hydroperoxyde Gpx réduit préférentiellement des hydroperoxydes de phospholipides alors que la Gpx reconnaît plutôt les hydroperoxydes d'acides gras (Maiorino *et al.*, 1990).

B.3 Au niveau des protéines.

Tous les acides aminés des protéines sont potentiellement oxydables aussi bien au niveau de la chaîne principale qu'au niveau des chaînes latérales des acides aminés (Berlett et Stadtman, 1997). Les résidus les plus facilement oxydables et potentiellement sensibles à l'effet direct de H_2O_2 sont les résidus soufrés. L'oxydation de ces résidus est décrite dans la

partie II de l'introduction. Les produits d'oxydation principaux des autres acides aminés oxydables sont reportés dans le Tableau 1 de la page 13.

Acide aminé	Produit d'oxydation
Trp	2-, 4-, 5-, 6- et 7-hydroxytryptophane
Phe	2-, 3- et 4-hydroxyphénylalanine, 2,3-dihydroxyphénylalanine
Tyr	3,4-dihydroxyphénylalanine, pont Tyr-Tyr
His	2-oxohistidine, Asn, Asp
Arg	semialdéhyde glutamique
Lys	semialdéhyde α -aminoadipique
Pro	2-pyrrolidone, 4- et 5-hydroxyproline, semialdéhyde glutamique
Thr	acide 2-amino 3-cetobutyrique
Glu	acide oxalique, acide pyruvique
Val, Leu	hydroperoxydes

Tableau 1 : Produits d'oxydation des acides aminés les plus sensibles à l'oxydation hors Cys et Met (d'après Berlett et Stadtman, 1997).

L'oxydation de certaines cibles peut être réversée, comme nous le verrons pour les acides aminés soufrés oxydés dans la partie II de l'introduction. Si ces modifications ne sont pas réparées, les protéines oxydées peuvent perdre leur fonction par perte de l'activité ou par déstabilisation de leur structure tridimensionnelle. Dans ce dernier cas, elles sont éliminées par le protéasome (Grune *et al.*, 1997).

C. Elimination de H₂O₂.

Les enzymes responsables de l'élimination de H₂O₂ sont les peroxydases. Il existe différentes familles de peroxydases dont les principales sont les catalases/peroxydase, les glutathion peroxydases et les thiorédoxine peroxydases appelées peroxyrédoxines. Elles se distinguent les unes des autres par la présence d'un hème ou non.

C.1 Les catalases.

Les catalases sont des métalloenzymes à centre hémique, presque exclusivement localisées dans les peroxysomes des cellules eucaryotes (Zamocky *et al.*, 2008). La plupart des catalases existent sous forme de tétramères de 60 ou 75 kDa, chaque sous-unité contenant un site actif (hème) enfoui au sein de la structure mais accessible *via* des canaux hydrophobes. Ces enzymes catalysent la dismutation de deux molécules d'H₂O₂, en deux étapes (Figure 11 page 14). Dans la première étape, l'enzyme réduit une molécule de H₂O₂ par transfert de deux électrons de l'hème vers H₂O₂ aboutissant à la formation d'une espèce oxydée de l'hème («π-cation radical ferryl» = Por^{•+} - Fe(IV)=O) et d'une molécule d'eau. Dans la seconde étape, une deuxième molécule d'H₂O₂ est utilisée comme réducteur pour régénérer l'enzyme, produisant ainsi de l'eau et du dioxygène. Ce dernier est formé par l'oxydation à deux électrons de la deuxième molécule de H₂O₂ sans rupture de la liaison O-O (Kato *et al.*, 2004).

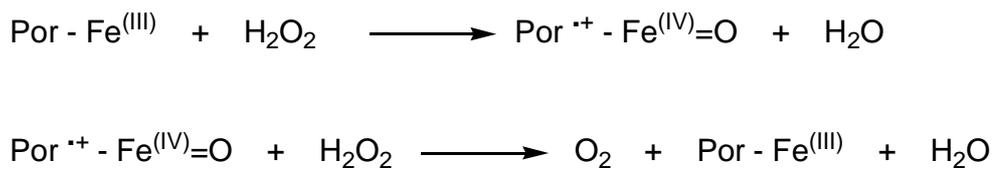


Figure 11 : Mécanisme proposé pour les catalases.

Por – Fe^(III) représente l'enzyme sous forme réduite, et Por^{•+} - Fe^(IV)=O représente l'enzyme sous forme oxydée «π-cation radical ferryl».

La réduction, dont l'efficacité catalytique est de l'ordre de 10⁷ M⁻¹.s⁻¹, est un processus extrêmement efficace. Les catalases exercent une double fonction, selon la concentration en H₂O₂. Si la concentration en H₂O₂ est faible (inférieure à 1 μM), les catalases réalisent une réaction de peroxydation où différents donneurs d'hydrogène, comme l'éthanol ou l'acide ascorbique, peuvent être oxydés au niveau de la deuxième étape. Si la concentration en H₂O₂ devient trop élevée (en situation de stress oxydant), l'enzyme joue alors son rôle de détoxication. H₂O₂ est donc à la fois donneur et accepteur de protons (Scandalios, 2005).

C.2 Les glutathion peroxidases.

Les glutathion-peroxydases (Gpx) ont été les premières peroxydases découvertes, initialement décrites chez les vertébrés, comme des séléno-enzymes, capables de catalyser la réduction des peroxydes (Flohé *et al.*, 1973). Leur activité catalytique repose sur

l'oxydation d'une sélénocystéine catalytique en acide séléninique qui est ensuite réduit *via* le glutathion (GSH).

Les Gpx réduisent les peroxydes en formant une molécule d'alcool et un acide séléninique. L'acide séléninique réagit ensuite avec une molécule de GSH, formant une liaison entre le sélénium de la protéine et le soufre du GSH (Protéine-Se-SG). Ce pont est ensuite réduit par une deuxième molécule de GSH qui permet la régénération de la sélénocystéine catalytique de la peroxydase et la libération d'une molécule de GSSG. La réaction se fait avec une efficacité catalytique de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Il existe deux types majeurs de Gpx selon leur spécificité de substrat : les glutathion-péroxydases classiques (Gpx), catalysant la réduction des hydroperoxydes solubles, et les «phospholipide-hydroperoxyde glutathion-péroxydases» (PH-Gpx), capables de réduire les hydroperoxydes de phospholipides. Les Gpx sont homotétramériques alors que les PH-Gpx sont monomériques.

L'étude de séquences protéiques déduites de banques de données d'ADN, montre que les Gpx sont des enzymes ubiquitaires qui présentent une Cys catalytique à la place de la sélénocys dont la présence serait limitée aux vertébrés. Leur activité catalytique en tant que Gpx et PH-Gpx a été établie grâce à des tests peroxydases *in vitro* en présence de glutathion, de glutathion réductase et de NADPH. Certaines Gpx ne sont pas réduites par le GSH mais par la thiorédoxine (Trx) (Koh *et al.*, 2007 ; Schlecker *et al.*, 2007). Ces Gpx sont monomériques et possèdent une seconde Cys qui pourrait attaquer la Cys catalytique oxydée sous forme d'acide sulfénique formant ainsi un pont disulfure intramoléculaire qui serait réduit par la Trx. Ce mécanisme ressemble au mécanisme d'une des classes de peroxyrédoxines, ainsi ces Gpx pourraient être apparentées à cette famille d'enzyme.

C.3 Les peroxyrédoxines.

Les Prx forment une famille de peroxydases non hémiques à Cys catalytique, d'environ 20 kDa, présentes dans tous les règnes du vivant. Cette famille est divisée en trois classes distinctes de par leur mécanisme de réduction des peroxydes et en particulier de par leur mode de recyclage. Ces trois classes sont les peroxyrédoxines à deux Cys typiques (2-Cys Prx typiques), les peroxyrédoxines à deux Cys atypiques (2-Cys Prx atypiques) et les peroxyrédoxines à une Cys (1-Cys Prx). Les Prx sont impliquées dans la protection des cellules contre le stress oxydant, et ont la particularité de réduire H_2O_2 , et les peroxydes organiques (Hofmann *et al.*, 2002 ; Wood *et al.*, 2003).

L'efficacité enzymatique des peroxyrédoxines est plus faible que celle des autres peroxydases ($10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), mais elles sont extrêmement abondantes dans les cellules, que ce

Partie I : le peroxyde d'hydrogène

soit chez les bactéries ou chez les eucaryotes. Chez *E. coli* et chez *S. cerevisiae*, la délétion des gènes codant les Prx entraîne une hypersensibilité à l'oxydation des protéines cytoplasmique vis-à-vis des ERO (Seaver et Imlay, 2001; Wong *et al.*, 2004), montrant ainsi l'importance physiologique des Prx dans l'arsenal antioxydant cellulaire. Il est montré également que des Prx peuvent jouer un rôle dans des mécanismes de signalisation cellulaire transmis par H₂O₂. Le mécanisme de réduction de H₂O₂ par les différentes classes de Prx et leur action dans la signalisation cellulaire sont décrits dans la partie II de l'introduction.

D. H₂O₂ et signalisation cellulaire.

Comme nous venons de le voir, H₂O₂ est un produit secondaire de réactions métaboliques qui peut induire de nombreux dommages aux cellules soit directement soit par les entités plus réactives qu'il génère, et qui doit donc être éliminé. Cependant, aujourd'hui, de nombreuses études tendent à montrer que H₂O₂ pourrait également jouer un rôle bénéfique de messenger cellulaire.

Pour être un messenger cellulaire, H₂O₂ doit répondre à certains critères : 1) être généré spécifiquement et régulé, 2) ne pas causer de stress oxydant, c'est à dire réagir directement avec les molécules senseurs, 3) être diffusible, et ; 4) induire une réponse cellulaire suite à un stimulus.

Comme nous l'avons vu au §A.1.3, H₂O₂ est produit de manière spécifique par les NOX. L'activité des NOX est soumise à différents modes de régulation selon leur classe. NOX5 et les DUOX sont régulées par le calcium, alors que l'autre classe de NOX est régulée par des complexes protéiques, dont la protéine à GTP Rac, eux-mêmes soumis à activation par divers stimuli (Lambeth 2004).

La production de H₂O₂ par les NOX est extracellulaire. Pour qu'il puisse agir comme messenger cellulaire, il est nécessaire qu'il puisse pénétrer dans la cellule cible au niveau de son site d'action. H₂O₂ est une petite molécule non chargée, diffusible dans les cellules à travers les membranes. Cette diffusibilité pourrait être expliquée par son passage dans des canaux membranaires à H₂O, les aquaporines. Les aquaporines sont des protéines membranaires qui facilitent le passage de composés non chargés et partiellement polaires à travers les membranes. Outre le fait que H₂O₂ possède des propriétés similaires à H₂O, comme son moment dipolaire ou sa capacité à former des liaisons hydrogène, il a un diamètre (~0,25-0,28 nm) compatible avec la taille des pores formés par les aquaporines (~0,3-0,4 nm). Plusieurs expériences dans des conditions physiologiques mettent en évidence la diffusibilité de H₂O₂ à travers les aquaporines. Ces expériences, fondées sur la

sensibilité de cellules de *S. cerevisiae* en présence ou absence d'aquaporine, ont montré qu'il existe des aquaporines spécifiques de H_2O_2 (pour revue, voir Bienert *et al.*, 2006).

H_2O_2 est donc produit spécifiquement et peut pénétrer dans les cellules, mais induit-il une réponse cellulaire ? Chez les organismes unicellulaires, la principale réponse à l'augmentation de la concentration de H_2O_2 est l'augmentation de la production des protéines antioxydantes et de réparation pour s'adapter à ces conditions oxydatives (Jamieson, 1998). De la même façon, l'expression de certains gènes codant des protéines antioxydantes chez les organismes pluricellulaires est activée par les peroxydes (An et Blackwell, 2003 ; Inoue *et al.*, 2005). De plus, chez les organismes pluricellulaires, H_2O_2 peut également activer des voies de signalisation pour stimuler la prolifération cellulaire (Foreman *et al.*, 2003 ; Geiszt et Leto, 2004), la différenciation (Li *et al.*, 2006 ; Sauer *et al.*, 2000), la migration ou l'apoptose (Cai, 2005 ; Gechev et Hille, 2005), suite à la stimulation de sa production, notamment par des facteurs de croissances ou des cytokines. Certains mécanismes moléculaires à l'origine de ces processus seront décrits dans la partie II de l'introduction.

Pour conclure, H_2O_2 remplit toutes les conditions pour être considéré comme un messager dans les voies de signalisations cellulaires.

E. Conclusion sur les effets de H_2O_2 .

Dans cette première partie de l'introduction, nous avons vu que H_2O_2 est une molécule à «double facette». En effet, cette molécule est une ERO réactive qui est la source d'espèces très réactives. C'est donc une ERO potentiellement toxique pouvant altérer les biomolécules. Sa production est très efficace, grâce à des enzymes utilisant la chimie de coordination et/ou radicalaire. Ceci requiert donc des mécanismes d'élimination très efficaces.

H_2O_2 est une entité chimique ayant une réactivité intermédiaire entre celle de $O_2^{\cdot-}$, de réactivité faible, et celle de OH^{\cdot} , de réactivité très élevée. Ceci lui permet de jouer le rôle de messager cellulaire. Pour cela, ces effets doivent être temporaires et régulés. Les résidus soufrés des protéines et plus particulièrement les Cys dont les pK_a sont abaissés, peuvent être oxydés sous un grand nombre de formes de manière réversible, et ainsi être une bonne cible pour la transmission du message cellulaire médié par H_2O_2 .

La deuxième partie de l'introduction développe ces états d'oxydation du soufre au niveau des protéines, ainsi que leur implication dans les mécanismes biologiques.

Partie II : Oxydation des sulfures dans les protéines et implications dans les mécanismes biologiques.

L'atome de soufre, comme l'atome d'oxygène, est dans la classification périodique des éléments un chalcogène. L'atome de soufre est moins électronégatif que l'atome d'oxygène, mais modifie le comportement chimique des carbones auxquels il est lié par polarisation des liaisons. Par contre, l'atome de soufre possède des orbitales d que ne possède pas l'atome d'oxygène, ce qui permet à la plupart des réactions de se faire sur le soufre lui-même et non sur le carbone comme c'est le cas pour la liaison carbone-oxygène.

Au niveau des protéines, le soufre est retrouvé sous forme de thiol dans les Cys et sous forme de sulfure dans les Met. Comme l'atome de soufre est polarisable, ces deux acides aminés ont un pouvoir nucléophile.

A. Différentes formes d'oxydations des acides aminés sulfurés dans les cellules.

A.1 Oxydation des méthionines.

La méthionine peut subir deux degrés d'oxydation (Figure 12 page 18). Le premier état d'oxydation, forme majoritaire *in vivo*, est la méthionine sulfoxyde (MetSO, état d'oxydation 0 du soufre) qui est réduite enzymatiquement. Le second état d'oxydation est la méthionine sulfone (état d'oxydation +II du soufre) qui n'est pas réduite enzymatiquement d'après les connaissances actuelles.

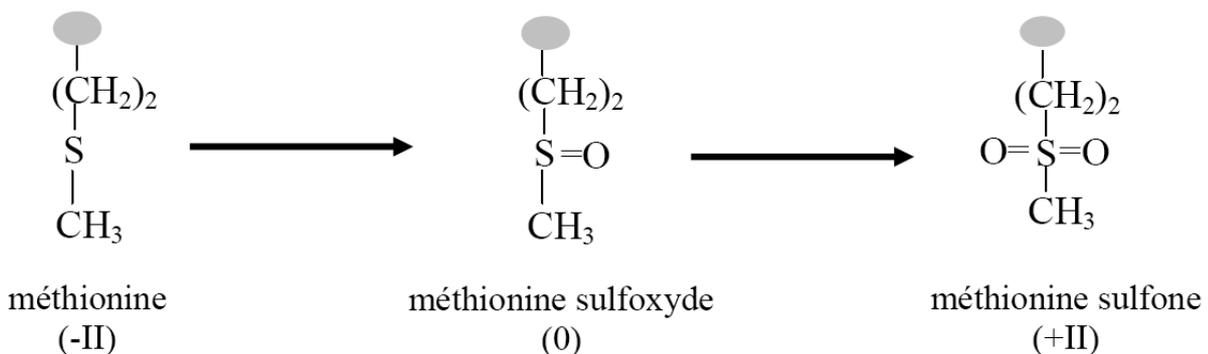


Figure 12 : Représentation schématique des différents degrés d'oxydation du soufre des méthionines.

Représentation de la chaîne latérale des Met sous formes réduites et oxydées.

L'oxydation des Met en surface des protéines permet de protéger d'autres résidus situés à l'intérieur de la structure tridimensionnelle importants pour la fonction biologique (Gitlin *et al.*, 1996). Mais, à l'opposé, l'oxydation des Met en MetSO en surface d'une protéine peut favoriser la dégradation de la protéine oxydée par le protéasome par déstabilisation de la structure en raison du caractère hydrophile des MetSO (Davies *et al.*, 2001). Il existe des systèmes de réparation des méthionine sulfoxydes, comme les méthionine sulfoxyde réductases qui sont présentées dans le paragraphe B.2 de cette partie d'Introduction.

A.2 Oxydation des cystéines.

A.2.1 Oxydation impliquant un atome de soufre.

La cystéine peut subir au moins trois degrés d'oxydation (Figure 13 page 19). La première forme est l'acide sulfénique, très réactif donc peu stable. Cette forme oxydée correspond à l'état d'oxydation 0 du soufre. L'acide sulfonique peut soit être réduit *in vivo* par réaction avec un thiol pour former un pont disulfure, soit subir des oxydations supplémentaires. La forme acide sulfonique correspond à l'état d'oxydation +II du soufre. La réduction enzymatique de cet état d'oxydation, qui est l'objet de ma thèse, a été découverte récemment. La forme acide sulfonique est décrite comme irréversible *in vivo* et correspond à l'état d'oxydation +IV du soufre.

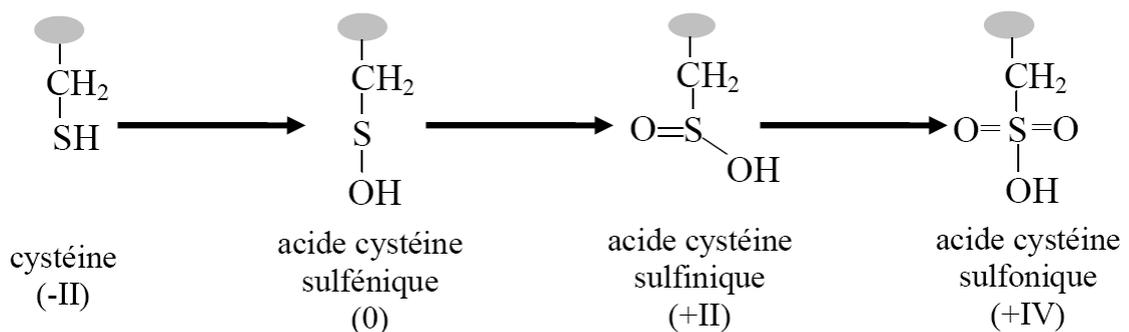


Figure 13 : Représentation schématique des différents degrés d'oxydation du soufre des cystéines par H₂O₂.

Représentation de la chaîne latérale des Cys sous formes réduites et oxydées.

Il est à noter que la sensibilité des Cys vis-à-vis de l'oxydation par H₂O₂ dépend de leur pK_a, et donc de leur environnement protéique. Comme nous le verrons dans les paragraphes

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

suivants, ceci peut conférer une certaine sélectivité d'oxydation transitoire des Cys et jouer un rôle dans la fonction de messenger cellulaire de H₂O₂. A l'opposé, les effets oxydants de H₂O₂ sur les protéines peuvent être toxiques. C'est le cas, par exemple, pour de nombreuses enzymes à Cys catalytique où l'oxydation de ce résidu entraîne une perte d'activité.

Une autre forme d'oxydation des Cys est la forme nitrosylée. Cette forme résulte de la réaction d'un thiolate avec l'oxyde nitrique NO[•] aboutissant à un nitrosothiol -SNO. Cet état d'oxydation est un intermédiaire important dans la signalisation cellulaire associé au NO (Martinez-Ruiz *et al.*, 2004 ; Hess *et al.*, 2005).

Les cystéines peuvent être également oxydées sous forme de radical thiyl suite à l'arrachement d'un électron sur l'atome de soufre du groupement thiol. Cet appauvrissement d'électron est dû à la réaction des Cys avec des radicaux libres comme le radical hydroxyl. La formation de ce radical thiyl est nécessaire dans la catalyse de certaines réactions (D'Aquino *et al.*, 1994). Par exemple, la réduction des ribonucléotides par les ribonucléotide réductases passe par la formation d'un radical thiyl, par transfert radicalaire à partir d'un autre radical de l'enzyme. Deux radicaux thiyls peuvent également se condenser pour former un pont disulfure, la réaction inverse étant possible *in vitro* par radiolyse où la coupure homolytique d'un pont disulfure libère deux radicaux thiyl.

Enfin, la réactivité de HOCl vis-à-vis des cystéines entraîne la génération de différentes espèces dont la forme sulfonamide (GSO₂-N-) du GSH *in vivo* (Pullar *et al.*, 2001).

A.2.2 Oxydation impliquant deux atomes de soufre de Cys : oxydation sous forme de pont disulfure, de thiosulfinate et de thiosulfonate.

L'acide cystéine sulfénique est une espèce très réactive et n'est généralement produite que de manière transitoire. Cette espèce est la source d'autres formes d'oxydation des Cys, produits de réactions biochimiques. La première espèce rencontrée est la forme pont disulfure. La formation de pont disulfure est essentielle à la bonne structuration de nombreuses protéines, ainsi qu'à de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydo-réductions. La réaction d'un thiolate avec un thiol oxydé sous forme sulfénique forme un pont disulfure. La réduction d'un pont disulfure est possible par échange de pont disulfure *via* la réaction avec un autre thiolate. Cette réversibilité est essentielle dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction.

Un pont disulfure est sensible à l'oxydation par des peroxydes, conduisant à la formation de disulfure S-monoxyde, appelé thiosulfinate (-S-SO-). Les thiosulfinates peuvent aussi être le résultat de la réaction entre deux acides sulféniques. Le nombre d'oxydation pour les sulfures formant cette liaison est de +I pour le soufre portant l'oxygène (soufre sulfinyl) et de -I pour l'autre soufre (soufre sulfényl). Les thiosulfinates sont chimiquement

peu stables et donc réactifs vis-à-vis de nucléophiles (Nagy et Ashby, 2007 ; Nagy *et al.*, 2007). *In vitro*, l'attaque d'un thiolate se fait sur le soufre sulfényl de la liaison thiosulfinate et aboutit à la libération d'un acide sulfénique et d'une espèce pont disulfure mixte (Figure 14 page 21). Ainsi, *in vitro*, deux molécules de GSH liées sous forme de thiosulfinate (GS(O)-SG) réagissent avec le thiol d'une protéine pour libérer un GSH oxydé sous forme acide sulfénique et la protéine glutathionylée (Li *et al.*, 2001 ; Giles *et al.*, 2002). La formation d'un thiosulfinate, suite à la réaction entre un thiolate et un acide sulfinique activé, a été proposée comme hypothèse dans le mécanisme de réduction des acides sulfoniques (Biteau *et al.*, 2003) (cf Introduction partie III). Par contre, lors de l'hydrolyse du thiosulfinate, l'attaque de OH⁻ ne se fait pas au niveau du soufre sulfényl, comme le thiolate, mais au niveau du soufre sulfanyl ; ceci conduit à la libération d'un thiol et d'une espèce acide sulfinique (Nagy et Ashby, 2007).

Une autre forme oxydée de pont disulfure est la forme thiosulfonate (-S(O)₂-S-), qui résulte de l'oxydation d'un thiosulfinate, ou de la réaction entre un acide sulfinique et un acide sulfénique. Cette espèce est également réactive vis-à-vis des nucléophiles mais dans ce cas uniquement au niveau du soufre sulfényl (Oae *et al.*, 1969). La réaction d'un thiolate avec cette espèce conduit à la formation d'un acide sulfinique et d'un pont disulfure. Ceci est observé, *in vitro*, au niveau des protéines avec l'attaque d'un thiolate sur une espèce thiosulfonate de GSH (GS(O)₂-SG) aboutissant à la libération d'un GSH sous forme acide sulfinique et d'une protéine glutathionylée (Giles *et al.*, 2002). L'hydrolyse d'un thiosulfonate conduit à la formation d'un acide sulfinique et d'un acide sulfénique (Figure 14 page 21).

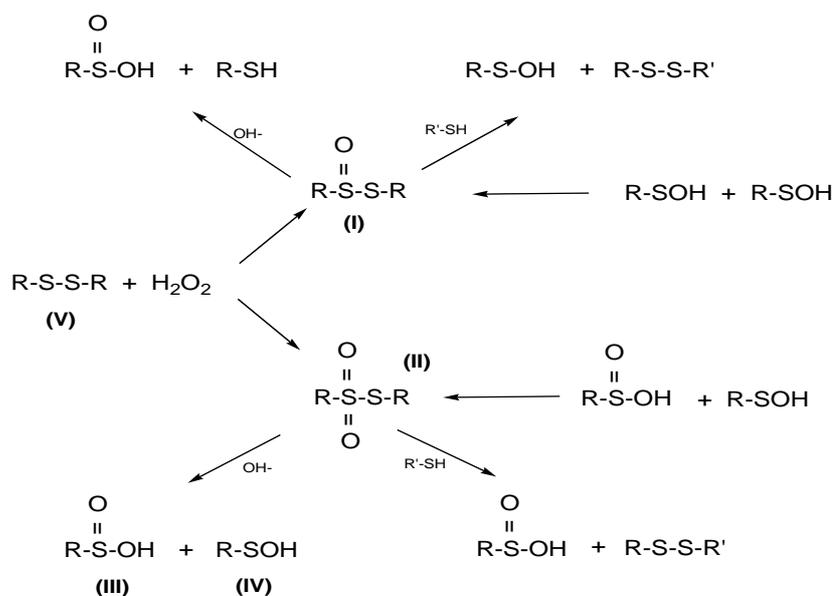


Figure 14 : Représentation schématique de la formation des thiosulfinate(s) et devenir de ces formes d'oxydation.

(I) thiosulfinate, (II) thiosulfonate, (III) acide sulfinique, (IV) acide sulfénique, (V) disulfure

B. Cystéines oxydées comme intermédiaire catalytique.

De nombreuses enzymes à Cys ont comme intermédiaires catalytiques des espèces oxydées des Cys. Cette oxydation doit être transitoire et nécessite un mécanisme de réduction pour régénérer une enzyme active.

B.1 Ponts disulfure.

B.1.1 Système thiorédoxine et protéines cibles associées.

Les thiorédoxines catalysent la réduction de ponts disulfures grâce à une activité thiol-transférase conférée par la présence dans son site actif de deux cystéines vicinales au sein du motif CXXC localisé entre un brin β et le début d'une hélice α du repliement typique des Trx (Figure 15 page 22).

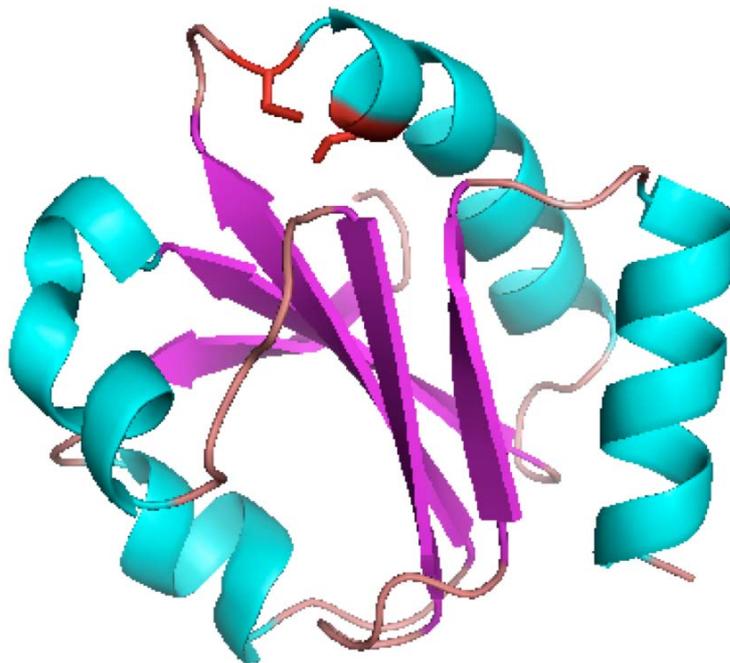


Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la Trx 1 de *E. coli* (d'après Jeng et al., 1994)

Les hélices α et les brins β sont représentés respectivement en bleu et en violet, et les atomes de soufre du motif CGPC sont en en rouge.

Les thiorédoxines réduisent un pont disulfure par un processus catalytique à deux étapes. La cystéine catalytique située du côté N-terminal du motif réalise une attaque nucléophile sur le pont disulfure du substrat, entraînant la réduction d'une des deux cystéines de ce pont et la formation d'un pont intermoléculaire -S-S- entre la Trx et son

substrat (Kallis *et al.*, 1980). Ce pont disulfure intermoléculaire est ensuite attaqué par la deuxième cystéine du site actif, dite de recyclage, permettant la libération du substrat réduit et de la Trx oxydée. Les Trx sont ensuite régénérées sous forme réduite par une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la Trx réductase (Figure 16 page 23) (Jensen *et al.*, 2008). L'abondance et le potentiel redox très bas (-270 mV pour la Trx1 d'*E. coli*) des Trx en font des thiol-oxydoréductases essentielles. De façon plus générale, la Trx, de par sa large spécificité de substrat, permet la réduction des ponts disulfures de nombreuses cibles (Holmgren, 1985), régénérant ainsi l'activité de protéines oxydées, comme les ribonucléotide réductases (Engström *et al.*, 1974) ou les méthionine sulfoxyde réductases (Boschi-Muller *et al.*, 2005). Les Trx sont incapables de réduire directement les ERO. En revanche, leur implication dans le cycle catalytique des peroxydases à thiols leur confère un rôle important dans la réduction des peroxydes (Kang *et al.*, 1998).

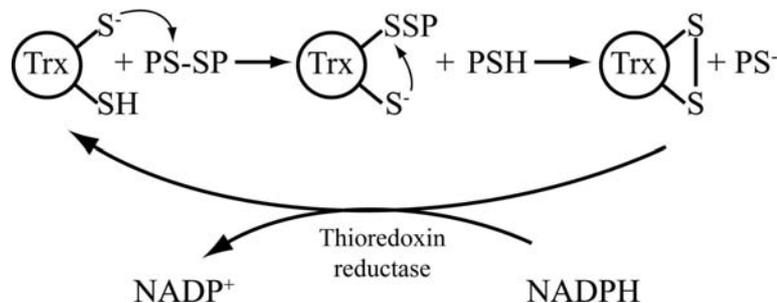


Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des Trx (Jensen *et al.*, 2008).

PS-SP et PS(H) représentent respectivement une protéine à thiol oxydée sous forme pont disulfure et sous forme réduite.

B.1.2 Les glutarédoxines et le GSH.

Les glutarédoxines (Grx) sont des protéines d'environ 100 acides aminés, avec un repliement de type Trx, capables à l'instar des Trx, d'activité thiol-transférase. A la différence des Trx, elles utilisent le pouvoir réducteur du NADPH *via* le GSH et la GSH réductase pour catalyser la réduction de ponts disulfures intramoléculaires ou mixtes protéine-GSH (Figure 17 page 24) (Jensen *et al.*, 2008). Deux types de Grx ont été décrits en fonction de leur activité catalytique et de leur séquence : les Grx à dithiol (consensus CXXC), généralement associées à la réduction de ponts disulfures intramoléculaire et des disulfures mixtes, et les Grx à monothiol (consensus PXCG/AFS/P) (bien qu'elles puissent contenir une autre cystéine) dont l'activité est généralement restreinte à la réduction des ponts disulfure mixtes entre une protéine et un GSH.

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

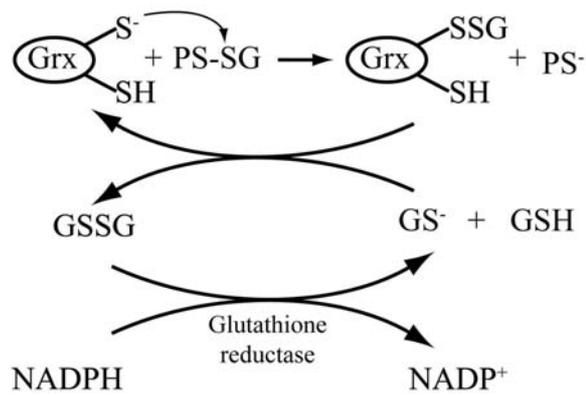


Figure 17 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des Grx (Jensen *et al.*, 2008).

PS-SG représente une protéine à thiol oxydée sous forme pont disulfure avec un GSH et PS⁻ la forme réduite de cette protéine.

Le GSH est le tripeptide (γ Glu-L-Cys-Gly) intracellulaire le plus abondant chez les êtres vivants le synthétisant (de l'ordre du millimolaire) (pour revue Sies, 1999). Son rôle est de protéger les lipides de la peroxydation et les protéines de l'oxydation. Il permet la régénération des groupements thiols des protéines, et peut jouer le rôle de cofacteur dans certaines enzymes. Le GSH est un composé redox qui peut être présent soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GSSG). L'oxydation du GSH en GSSG fait intervenir la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les résidus cystéines de deux molécules de GSH. Le couple GSH/GSSG possède un potentiel redox de -240 mV. L'abondance du GSH associé à un fort pouvoir réducteur lui ont valu d'être défini dans de nombreuses études, comme jouant le rôle de tampon redox, capable d'absorber les équivalents oxydants. Cependant, la capacité du GSH à réduire directement les ERO *in vivo* reste discutée. En revanche, sa participation est démontrée dans la réduction des peroxydes par le biais de la glutathion peroxydase (Gpx) La forme oxydée GSSG est ensuite réduite en deux molécules de GSH par l'action d'une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la GSH réductase.

B.2 Acide sulfénique.

B.2.1 Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr).

Il existe deux familles de Msr différentes par leur spécificité de substrat. La première famille, composée des MsrA et MsrB, permet la réduction des MetSO au niveau des protéines. La classe des MsrA réduit spécifiquement les S-MetSO alors que la classe MsrB

réduit spécifiquement les *R*-MetSO. La deuxième famille est composée de la classe des *fR*Msr qui réduisent spécifiquement les *R*-MetSO au niveau des Met libres. Ces trois classes ont des structures tridimensionnelles différentes, mais opèrent selon un même mécanisme catalytique.

Le mécanisme catalytique implique une Cys essentielle et se déroule en trois étapes (Figure 18 page 25) (Boschi-Muller *et al.*, 2005).

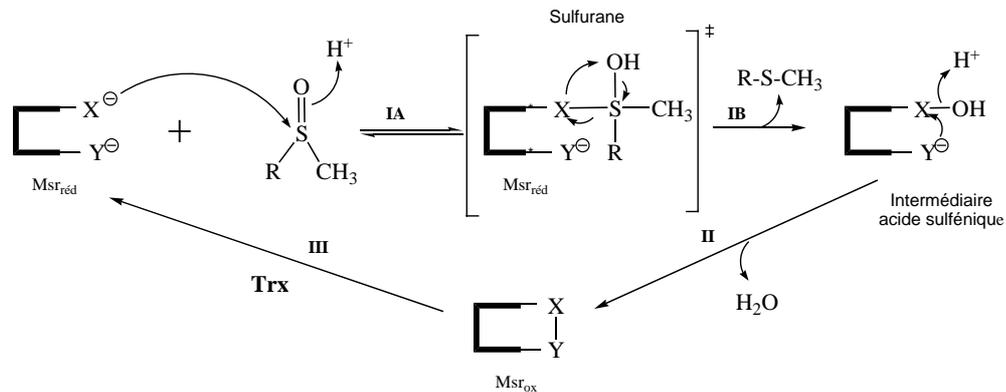


Figure 18 : Mécanisme catalytique simplifié des Msr à deux Cys (Boschi-Muller *et al.*, 2005).

Lors de la première étape, la Cys catalytique de la Msr réduite (Msr_{red}) réalise une attaque nucléophile sur l'atome de soufre de la fonction sulfoxyde du substrat et forme ainsi un état de transition/intermédiaire de type sulfurane. Le sulfurane se réarrange générant un intermédiaire acide sulfénique et libérant une mole de Met par mole d'enzyme. L'ensemble de cette étape correspond à l'étape réductase. Lors de la deuxième étape, une deuxième Cys, appelée Cys de recyclage, vient attaquer l'acide sulfénique pour former un pont disulfure et libérer une mole d'eau par mole d'enzyme. Enfin, lors de la troisième étape, le pont disulfure de la Msr oxydée (Msr_{ox}) est réduit par la Trx, ce qui aboutit à la régénération de la Msr_{red} et à l'oxydation de la Trx sous forme pont disulfure. A noter qu'il existe quelques Msr, en particulier de la classe des MsrB, qui ne possède pas de Cys de recyclage et dont le mécanisme de régénération de l'activité réductase reste à définir.

B.2.2 Activité peroxydase des peroxyrédoxines.

Le mécanisme catalytique de réduction de H_2O_2 par les Prx inclut deux étapes. Trois classes ont été définies en fonction du mécanisme de la deuxième étape.

La première étape, appelée étape peroxydatique, est commune à toutes les Prx et correspond à la réduction du substrat par l'attaque nucléophile de la Cys catalytique (C_p pour Cys peroxydasique) sur un oxygène de H_2O_2 , conduisant à l'oxydation de la C_p sous forme d'acide sulfénique (Baker et Poole, 2003) et au départ d'une molécule d'eau. Cette C_p serait

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

au préalable activée sous forme thiolate par l'abaissement de son pK_a dû à la présence d'une arginine conservée dans le site actif ou par la présence d'un résidu acido/basique non identifié qui jouerait le rôle de base pour déprotoner la C_P , et le rôle d'acide pour faciliter le départ de OH^- sous forme H_2O lors de la deuxième étape (cf § suivant) (Figure 19 page 26) (Wood *et al.*, 2003).

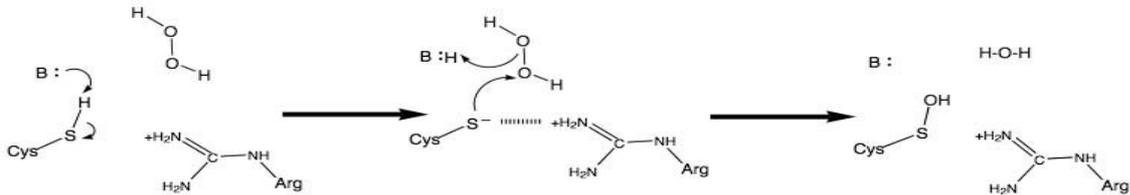
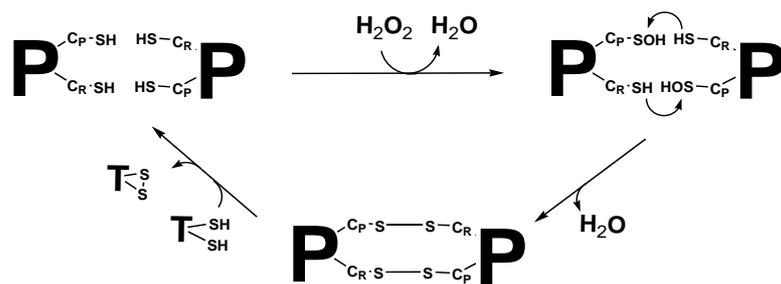


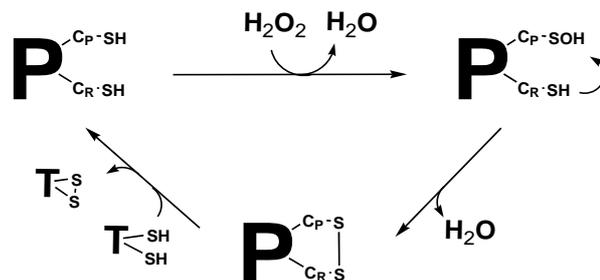
Figure 19: Mécanisme de l'étape peroxydatique catalysée par les Prx (Wood *et al.*, 2003).

La deuxième étape est l'étape de recyclage de l'enzyme par réduction de l'acide sulfénique selon différents modes conduisant à la définition des trois classes (Figure 20 page 27) (Kang *et al.*, 1998 ; Kong *et al.*, 2000). Pour la classe des 2-Cys Prx typiques, enzymes homodimériques, la Cys C_P -SOH d'une sous-unité réagit avec la Cys de régénération C_R de l'autre sous-unité pour former un pont disulfure intermoléculaire et libérer une molécule d'eau. Pour la classe des 2-Cys Prx atypiques, enzymes homodimériques, la Cys C_P -SOH réagit avec le thiol de la Cys C_R de la même chaîne polypeptidique, sauf exception. Les ponts disulfures de ces deux classes d'enzymes sont ensuite réduits par la Trx. Pour les 1-Cys Prx, enzymes homodimériques ne possédant pas de Cys C_R , la Cys C_P oxydée est régénérée par un système réducteur « externe » (Trx, GSH ou acide lipoïque), formant un pont disulfure mixte.

2-Cys Prx typique



2-Cys Prx atypique



1-Cys Prx

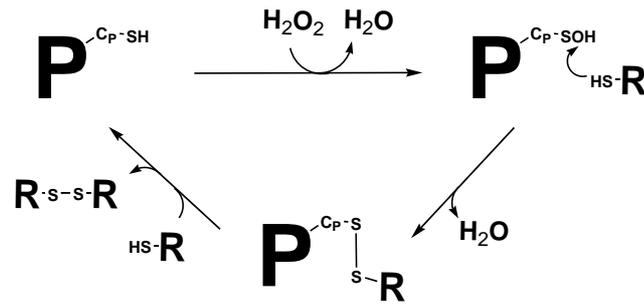


Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des différentes familles de Prx (d'après Kang *et al.*, 1998 ; Kong *et al.*, 2000).

P = Prx, T = Trx, R = réducteur à thiol

Au niveau structural, les Prx sont caractérisées par un repliement de type Trx, comprenant un feuillet β mixte de cinq brins flanqué de trois hélices α réparties de part et d'autre, ainsi que de quelques structures secondaires additionnelles présentes dans des insertions. Il est intéressant de noter que la structure tridimensionnelle des sites actifs est en partie conservée, la Cys catalytique (C_P) étant l'homologue de la Cys de recyclage de la Trx, responsable de la libération de la Trx oxydée de ses cibles (Copley *et al.*, 2004).

Les 2-Cys Prx typiques représentent la classe majoritaire de Prx dans les cellules eukaryotes. Elles sont localisées principalement dans le cytoplasme mais également dans les mitochondries, le reticulum endoplasmique et le noyau. Ces enzymes sont organisées en homodimères structurés tête-bêche, où la Cys C_P d'un monomère est face à la Cys de recyclage (C_R) de l'autre monomère (Figure 21 page 27) (Wood *et al.*, 2003).

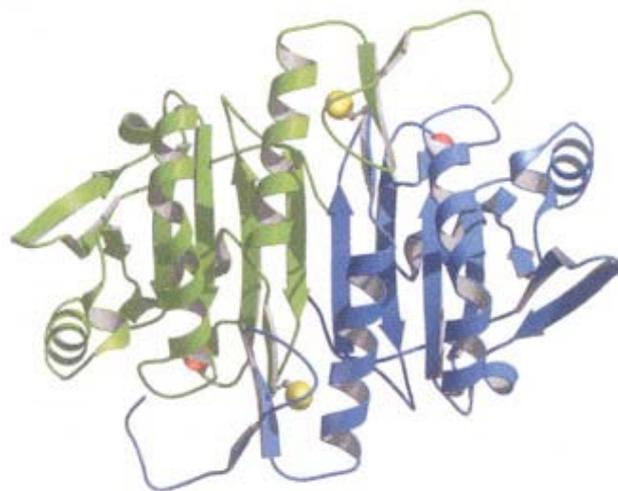


Figure 21 : Structure tridimensionnelle d'un homodimère de 2-Cys Prx typiques, celle de AhpC de *Salmonella typhimurium* (d'après Wood *et al.*, 2003).

Les monomères sont représentés respectivement, en bleu et en vert, et les atomes de soufre des Cys C_P et C_R en rouge et en jaune.

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

Ces dimères peuvent s'assembler en décimères cycliques de forme torique (Figure 22 page 28) (Wood *et al.*, 2002). L'état oligomérique de ces enzymes serait dépendant de leurs états d'oxydation, la forme réduite adoptant une structure décimérique et la forme oxydée sous forme de pont disulfure tendant à se dissocier sous forme dimérique.

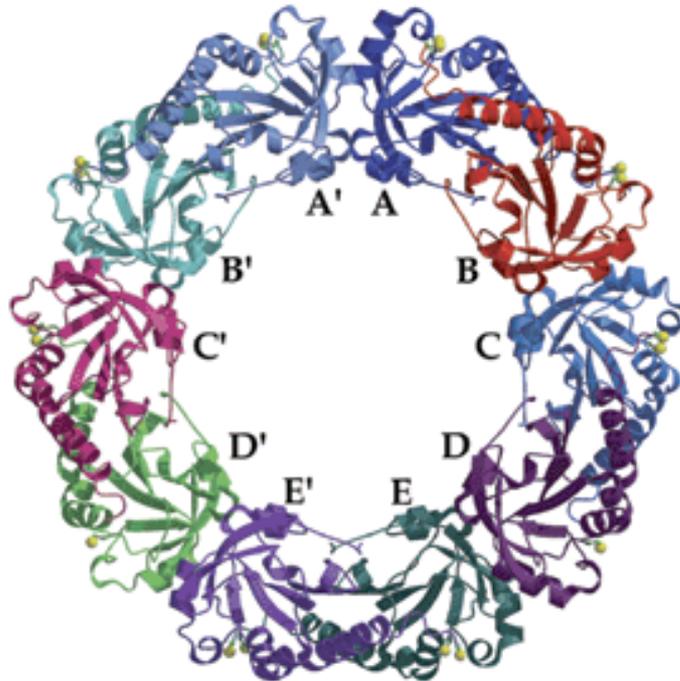


Figure 22 : Structure tridimensionnelle d'un décimère de 2-Cys Prx typiques, celle de AhpC de *Salmonella typhimurium* (d'après Wood *et al.*, 2002).

Chaque monomère de Prx est représenté dans une couleur différente et est nommé de A (A') à E (E'). A-B représente un dimère où les Cys sont représentées en jaune selon le modèle boule et bâton. Chaque dimère est oxydé sous forme de pont disulfure entre la C_P d'un monomère et la C_R de l'autre monomère.

Deux séquences conservées des 2-Cys Prx typiques sont nécessaires à l'oligomérisation de cette classe d'enzyme et sont nommées région I et région II (Figure 23 A page 29). La région I est une partie de la boucle du motif boucle-hélice située dans le site actif et la région II est une hélice α . La région I forme une complémentarité de surface avec la région II d'un monomère du dimère adjacent par des interactions de type hydrophobes entre deux Phe de la région I et les résidus Phe, Ala, Trp de la région II (Schröder *et al.*, 2000). Lors de la réduction de H₂O₂, il y a mouvement du motif boucle-hélice qui déstabilise l'interface entre les régions I et II.

L'analyse du site actif des 2-Cys Prx typiques montre que la C_P est localisée dans le premier tour de l'hélice du motif structural boucle-hélice qui forme une poche étroite au solvant. Trois résidus conservés chez toutes les Prx se trouvent à proximité de la C_P : une Pro, une Thr, toutes deux situées dans la région I, et une Arg (Figure 23 B page 29). La Pro

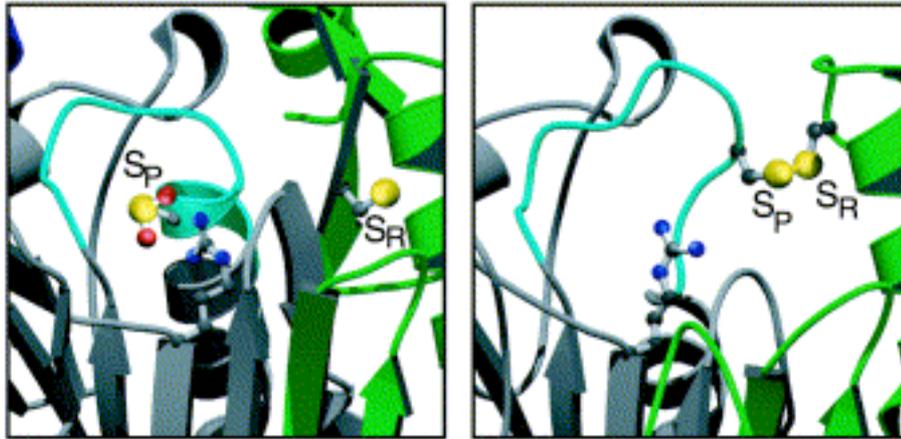


Figure 24 : Structure du site actif des 2-Cys Prx typiques réduites et oxydées sous forme de pont disulfure (d'après Wood *et al.*, 2003).

La boucle et le premier tour d'hélice du motif structural boucle-hélice sont représentés en turquoise, le reste de la structure de ce monomère étant en gris. La structure d'un autre monomère est représentée en vert. L'Arg, la C_P et la C_R sont représentées selon le model boule-baton, avec les atomes de soufre coloré en jaune, les carbones en noirs et les azotes en bleus. Dans la structure de gauche, la C_P est oxydée sous forme acide sulfinique, stabilisée par l'Arg à proximité.

C. Modification post-traductionnelle par oxydation des Cys.

Outre l'importance des ponts disulfures dans la structuration de certaines protéines, d'autres états d'oxydations des Cys sont indispensables à la fonction ou à la protection de protéines.

C.1 Le système OxyR chez *E. coli* : pont disulfure.

Le système OxyR, l'un des systèmes de régulation de l'expression de gènes codant notamment des protéines de résistance au stress oxydant, est retrouvé uniquement chez les bactéries.

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

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

OxyR possède un motif de liaison à l'ADN et interagit directement avec l'ARN polymérase. OxyR se lie à l'ADN sous forme de tétramère (Toledano *et al.*, 1994). Dans les cellules, OxyR est présent sous deux formes en fonction des conditions physiologiques : oxydée sous forme pont disulfure (Cys199-Cys208) ou réduite. En présence d'une faible concentration en H_2O_2 , la Cys199 de OxyR réagit avec H_2O_2 avec une constante de vitesse comparable à la réaction entre les peroxydases et H_2O_2 , et forme une Cys199 oxydée sous forme d'acide sulfénique. La Cys 208 réagit avec cet acide sulfénique formant un pont disulfure intramolécule et entraînant un changement conformationnel de la protéine (Lee *et al.*, 2004). Ce changement de conformation de la protéine modifie la spécificité de liaison à l'ADN de la protéine et permet l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (Figure 25 page 31) (pour revue Stone et Yang, 2006). La forme oxydée de OxyR peut être réduite par le système GSH/Grx1 ou Trx/Trx réductase (Prinz *et al.*, 1997).

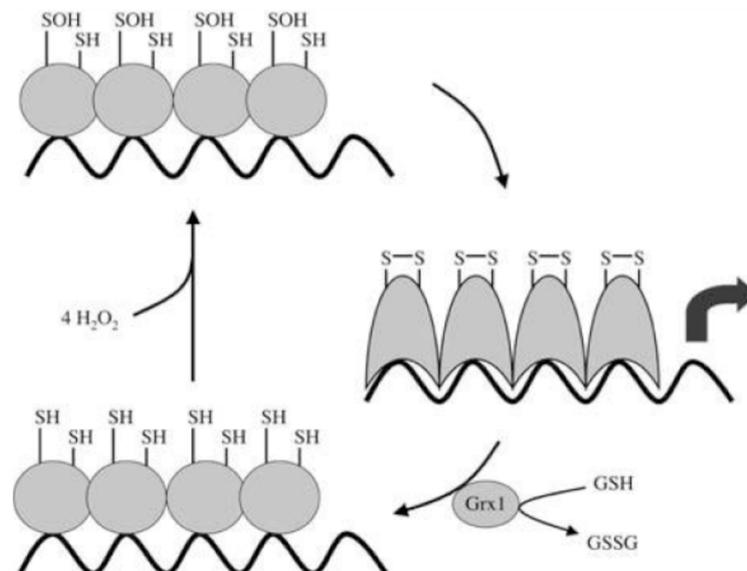


Figure 25 : Schéma de l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant *via* l'oxydation de OxyR par H_2O_2 (d'après Stone et Yang, 2006).

OxyR est représenté par une boule grise. OxyR se fixe sur l'ADN sous forme de tétramère. H_2O_2 oxyde la Cys199 de OxyR qui est attaquée par la Cys204 formant un pont disulfure intramolécule et entraînant un changement de conformation de OxyR permettant la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. OxyR est ensuite réduit par le système Grx.

C.2 Le mécanisme d'activation des facteurs de transcription Yap-1 et Pap-1 chez *S. cerevisiae* et chez *Schizosaccharomyces pombe* : acide sulfénique et pont disulfure.

Le responsable de l'expression des gènes de la réponse antioxydante chez *S. cerevisiae* est le facteur de transcription Yap-1, et son homologue Pap-1 chez *S. pombe*.

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

L'activité de Yap-1, ou de Pap-1, dépend de sa localisation cellulaire, qui est dépendante de son état d'oxydation. Dans des conditions normales, Yap-1 (Pap-1) est séquestrée dans le cytoplasme en raison de son export permanent hors du noyau par l'exportine Crm1, qui interagit avec la séquence d'export nucléaire située du côté C-terminal de Yap-1 (Pap-1). En présence d'H₂O₂, Yap-1 (Pap-1) est oxydée sous forme de pont disulfure intramoléculaire, ce qui déstabilise son interaction avec Crm1, et lui permet de pénétrer dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription. Ce mécanisme d'activation par oxydation fait intervenir soit une Gpx à Cys (Orp1) pour l'activation de Yap-1 soit une 2-Cys Prx typique, Tsa-1 pour l'activation de Yap-1 ou Tpx-1 pour l'activation de Pap-1 (Toledano *et al.*, 2004 ; Vivancos *et al.*, 2005 ; Bozonet *et al.*, 2005). Les mécanismes d'activation de Yap-1 et de Pap-1 étant proches, seul le mécanisme d'activation de Pap-1 sera décrit.

Différentes études montrent que l'expression des gènes dépendant de Pap-1 est régulée par Tpx-1 et que Tpx-1 est spécifiquement requis pour l'oxydation et donc pour l'accumulation nucléaire de Pap-1 induite par un peroxyde (Vivancos *et al.*, 2005 ; Bozonet *et al.*, 2005). Dans des conditions normales, Pap-1 est séquestrée comme Yap-1 chez *S. cerevisiae*, dans le cytoplasme par l'exportine Crm1. En présence d'H₂O₂, Tpx-1 réduit H₂O₂ *via* sa C_P (Cys48), aboutissant à la libération d'une molécule d'eau et à l'oxydation de la C_P sous forme d'acide sulfénique. Ensuite l'oxydation est « transférée » sur une Cys du domaine C-terminal de Pap-1 directement ou non *via* la C_P-SOH de Tpx-1 produisant un complexe Pap-1/protéine lié par un pont disulfure intermoléculaire qui doit être déterminé. L'attaque d'une autre Cys de Pap-1 aboutit à l'oxydation de Pap-1 sous forme pont disulfure intramoléculaire. Cette forme oxydée de Pap-1 n'interagissant plus avec l'exportine Crm1, Pap-1 peut donc entrer dans le noyau et jouer son rôle (Figure 26 page 33). Dans des conditions où la concentration en H₂O₂ est très élevée, la Tpx-1 est suroxydée sous forme acide sulfinique et ne peut plus jouer son rôle et donc Pap-1 n'est plus activée. Dans ces conditions, une autre voie de signalisation entre en jeu (cf Introduction partie III).

Dans ce mécanisme moléculaire permettant l'activation du facteur de transcription Pap-1, ou Yap-1, les 2-Cys Prx typiques joueraient donc un rôle important dans la transmission du signal redox comme protéine senseur de H₂O₂.

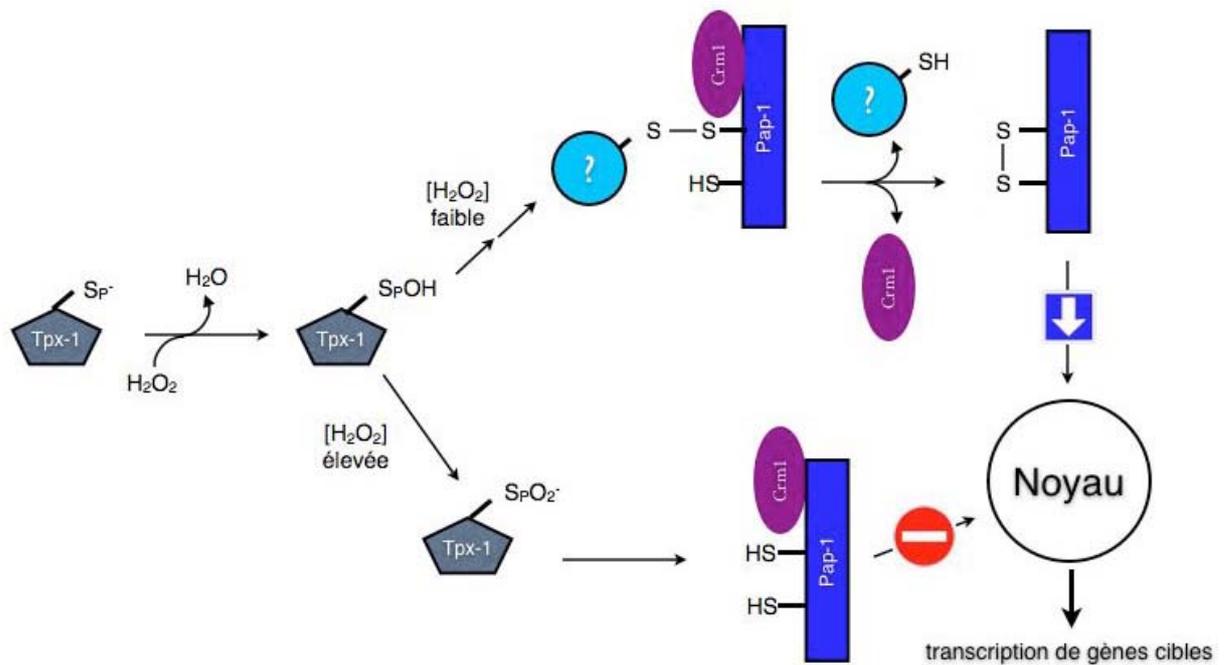


Figure 26 : Représentation schématique du mécanisme d'activation de Pap-1 par H₂O₂ via Tpx-1 chez *S. pombe* (d'après Vivancos *et al.*, 2005 ; Bozonet *et al.*, 2005).

C.3 Les tyrosine phosphatases (PTP) chez les eucaryotes : sulfénamide et pont disulfure.

L'activation des voies de signalisation cellulaire résulte également de modifications post-traductionnelles de protéines impliquées dans la transduction du signal, parmi lesquelles la phosphorylation est un mécanisme majeur. L'état de phosphorylation des protéines dépend de la réactivité des deux classes d'enzymes antagonistes que sont les kinases et les phosphatases. L'inactivation des phosphatases permet de maintenir la phosphorylation de protéines suffisante pour déclencher la cascade de signalisation (Lee *et al.*, 1998 ; Mahadev *et al.*, 2001 ; Meng *et al.*, 2002 ; Kwon *et al.*, 2004). Dans le cas des protéines tyrosine phosphatases (PTP), cette inactivation peut être causée par H₂O₂. En effet, cette famille de phosphatases est caractérisée par un motif conservé His-Cys-X-X-Gly-X-X-Arg où la cystéine est essentielle à la catalyse du transfert du groupement phosphate lors de la déphosphorylation des résidus tyrosines. Cette cystéine possède un pKa particulièrement bas (4,7-5,4) et existe donc sous forme thiolate à pH physiologique, ce qui en fait une cible de l'oxydation par H₂O₂. La Cys du motif des PTP-1B est oxydée sous forme d'acide sulfénique par H₂O₂, et réagit avec le groupement NH d'un résidu de la chaîne principale pour former un sulfényl-amide rendant ainsi l'enzyme inactive (Salmeen *et al.*, 2003 ; van Montfort *et al.*, 2003).

Dans le cas de la phosphatidylinositol phosphate phosphatase (PTEN), l'acide sulfénique formé est attaqué par un autre résidu Cys conduisant à la formation d'un pont

Partie II : Soufre, oxydation et réactivité dans les protéines

disulfure intramoléculaire. Cette oxydation est réversée par l'action de la Trx (Lee *et al.*, 2002). La classe des PTEN n'a pas pour substrat une protéine phosphorylée mais le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). Ce substrat est issu de la phosphorylation du phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), en réponse à l'activation de récepteurs membranaires. Le PIP3 est un activateur de voies de signalisation dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose, et sa déphosphorylation par la PTEN entraîne donc un blocage de ces voies. Le PIP3 est également une molécule impliquée dans l'activation de NOX en réponse à des facteurs de croissance, et donc dans l'activation de la production spécifique de H₂O₂ en tant que messenger cellulaire. L'oxydation des PTEN par H₂O₂ inactive transitoirement ces enzymes sous forme de pont disulfure et permet l'activation des voies de signalisation associées à PIP3 (Figure 27 page 34) (Rhee *et al.*, 2005).

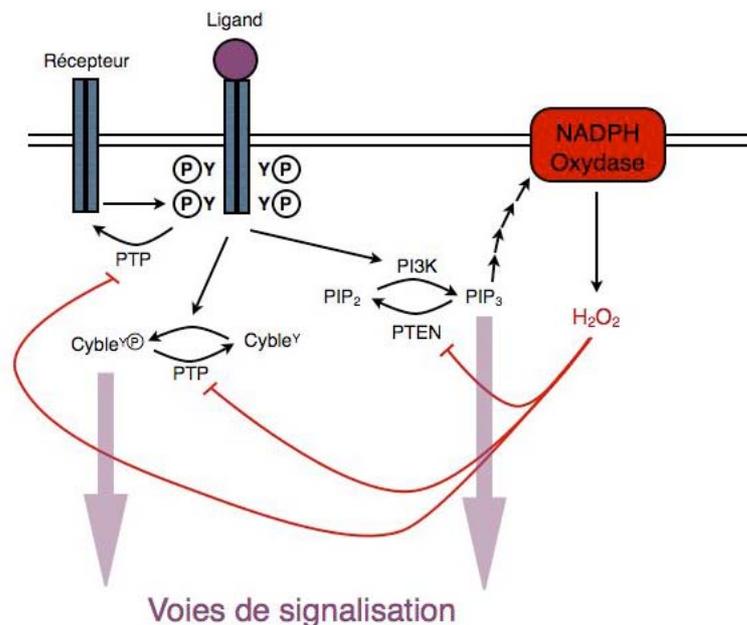


Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de l'activité des tyrosine phosphatases par H₂O₂ (d'après Rhee *et al.*, 2005).

C.4 Activation de la protéine DJ-1 : acide sulfinique.

La protéine DJ-1 est une protéine multifonctionnelle qui a été associée à la maladie de Parkinson sur la base de données génétiques (Hague *et al.*, 2003 ; Bonifati *et al.*, 2003 ; Moore *et al.*, 2003). L'homologie de structure avec la protéine chaperone Hsp31 et sa capacité à interagir avec d'autres protéines confère à DJ-1 de nombreuses fonctions dont celle de protéger les cellules neuronales contre un stress oxydant (Mitsumoto *et al.*, 2001).

Cette protéine existe sous forme d'homodimère et contient trois Cys. Deux Cys de chaque monomère (Cys46 et Cys53 chez DJ-1 humaine) sont retrouvées au niveau du contact entre les monomères alors que la troisième Cys (Cys106) se trouve au centre de la cavité formée par le dimère (Figure 28 page 35) (Canet-Avilés *et al.*, 2004).

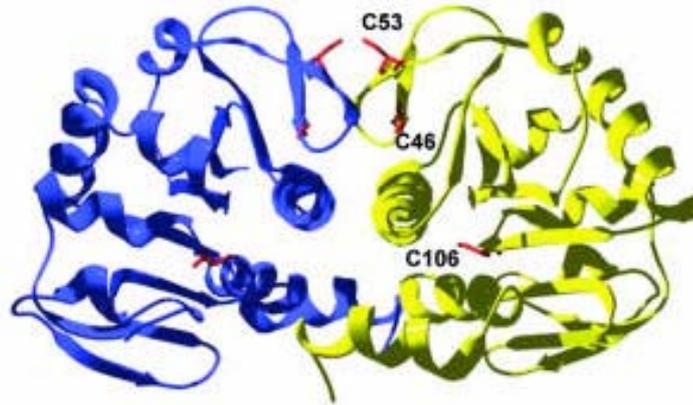


Figure 28 : Structure de l'homodimère de DJ-1 humaine (Canet-Avilés *et al.*, 2004).

Un monomère de DJ-1 est coloré en bleu, l'autre en jaune. Les Cys sont représentées en rouge selon le modèle bâton.

Cette Cys106 est accessible au solvant et est sensible à l'oxydation en présence de H_2O_2 . Elle est retrouvée *in vivo* oxydée sous forme d'acide sulfinique. Cette forme oxydée de DJ-1 aurait un rôle dans la protection des mitochondries de cellules neuronales suite à un stress oxydant, après translocation de cette protéine oxydée dans la mitochondrie, alors que la protéine sous forme réduite ou dépourvue de cette Cys ne pénètre pas dans la mitochondrie et n'a donc pas ce rôle (Canet-Avilés *et al.*, 2004).

DJ-1 a également un rôle dans la fibrillation ou non de l' α -synucléine. L' α -synucléine est une protéine neuronale abondante dont la fibrillation est associée à la maladie de Parkinson, l'aggrégation de cette protéine étant proposée comme l'un des facteurs essentiels au développement de cette maladie. DJ-1 interagit avec l' α -synucléine, mais seule la forme dont la Cys106 est oxydée sous forme acide sulfinique inhibe la fibrillation de l' α -synucléine. La forme native non oxydée ou d'autres formes oxydées de DJ-1 (oxydation des Met ou des autres Cys, Cys106 oxydée sous forme acide sulfonique) n'empêchent pas l'aggrégation (Zhou *et al.*, 2005). La Cys106 étant facilement oxydable sous forme d'acide sulfinique, l'activation de DJ-1 contre l'aggrégation de l' α -synucléine se ferait en présence d'une très faible concentration en H_2O_2 et donc pas nécessairement en conditions de stress oxydant.

C.5 Rôle de protéine chaperon des 2-Cys Prx oxydées : acide sulfi(o)nique.

C.5.1 Mécanisme de suroxydation.

Pour l'ensemble des 2-Cys Prx typiques de mammifères, de plantes et de levures, il a été montré que la C_p pouvait être suroxydée sous forme d'acide sulfinique voir sulfonique (Mitsumoto *et al.*, 2001 ; Rabilloud *et al.*, 2002 ; Wagner *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2002) et que l'enzyme était alors inactivée. Ce phénomène d'inactivation est spécifique des 2-Cys Prx eucaryotes, les Prx procaryotes étant résistantes à la suroxydation puisqu'il est nécessaire d'exposer ces enzymes à des concentrations en H₂O₂ cent fois supérieures par rapport aux enzymes eucaryotes pour qu'elles se retrouvent oxydées sous forme d'acide sulfinique (Wood *et al.*, 2003). Cette suroxydation de la C_p a lieu lors de l'activité peroxydase des 2-Cys Prx eucaryotes. La réduction de l'acide sulfénique formé sur la C_p par la C_R nécessite des réarrangements structuraux locaux, et lors de ces réarrangements la C_p peut être suroxydée par réaction avec une autre molécule de H₂O₂ (Wood *et al.*, 2003) (Figure 29 page 37). La susceptibilité vis-à-vis de la suroxydation en acide sulfinique de la C_p est expliquée par la présence de deux éléments structuraux existant dans les enzymes eucaryotes à l'opposé des procaryotes. Le premier élément est un térapeptide G₉₁GLG situé dans l'environnement de la C_p, le deuxième élément est une hélice α supplémentaire, contenant un Trp et une Phe conservés, située à l'extrémité C-terminale de la protéine qui stabiliserait cette extrémité. Cette hélice est positionnée également dans l'environnement de la C_p. La présence de ces deux éléments structuraux entraîne une baisse de la vitesse de réarrangement requise pour la formation du pont disulfure, et ce ralentissement augmenterait le temps où la C_p-SOH est accessible à l'oxydation par une seconde molécule de H₂O₂. Ceci est confirmé par la résistance à la suroxydation de 2-Cys Prx typiques de levure dans lesquelles ont été mutés ou tronqués ces deux éléments (Koo *et al.*, 2002).

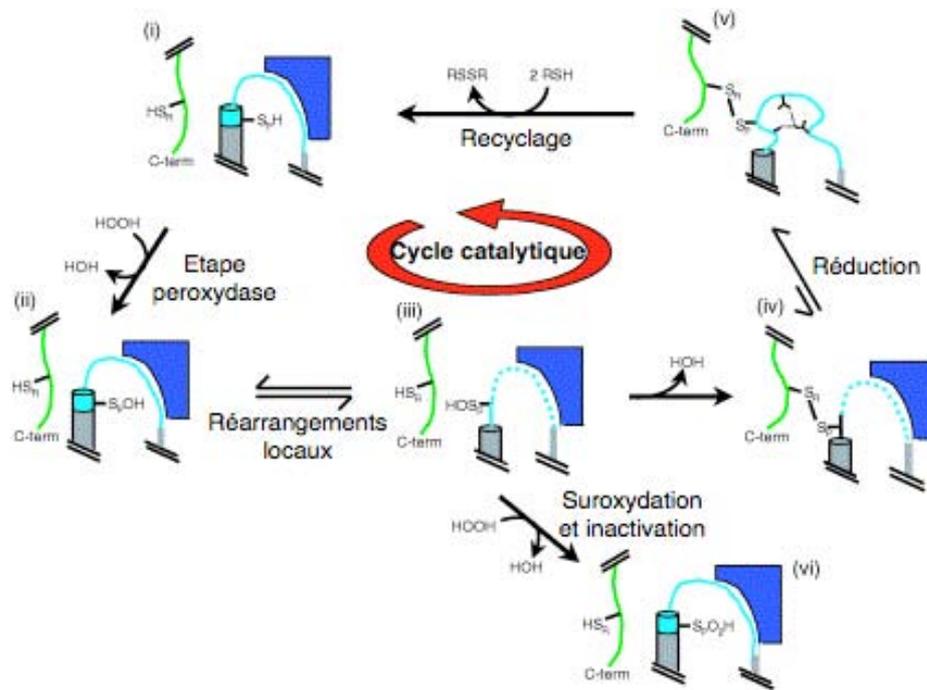


Figure 29 : Représentation des différents états d'oxydation de la C_p des Prx au cours du cycle catalytique des 2-Cys Prx eucaryotes (d'après Wood *et al.*, 2003).

C.5.2 Rôle biologique.

Des études *in vivo* chez la levure montrent que l'absence d'expression des 2-Cys Prx typiques induit une sensibilité des cellules vis-à-vis d'un choc thermique. Par contre, l'expression de ces enzymes, sous forme native ou variant de substitution de la Cys catalytique, entraîne la résistance aux chocs thermiques. Ces observations suggèrent que les 2-Cys Prx typiques auraient une activité de protection distincte de l'activité peroxydase (Jang *et al.*, 2004). Chez l'homme, comme chez la levure, les 2-Cys Prx typiques jouent le rôle de protéines chaperons en protégeant, *in vitro*, la citrate synthase, l'insuline ou encore l' α -synucléine d'une aggrégation induite par un stress (Moon *et al.*, 2005). Cette activité de protéine chaperon serait associée à l'observation de formes de haut poids moléculaires des 2-Cys Prx typiques, correspondant à un empilement de plusieurs décimères superposés alors que l'activité peroxydase est associée, pour les 2-Cys Prx typiques, à la forme décimérique ou dimérique (Figure 30 page 38). La suroxydation des 2-Cys Prx typiques sous forme d'acide sulfinique ou d'acide sulfonique stabilise la forme de haut poids moléculaire. Chez *S. cerevisiae*, la forme acide sulfonique des 2-Cys Prx, observée sous forme de deux dodécamères, a une activité de chaperon, *in vitro*, quatre fois supérieure à la forme réduite qui a été observée dans ces conditions majoritairement sous forme dimérique. Les formes suroxydées de ces Prx pourraient augmenter leur activité de protéine chaperon grâce à la formation de complexes de haut poids moléculaires stables (Lim *et al.*, 2008).

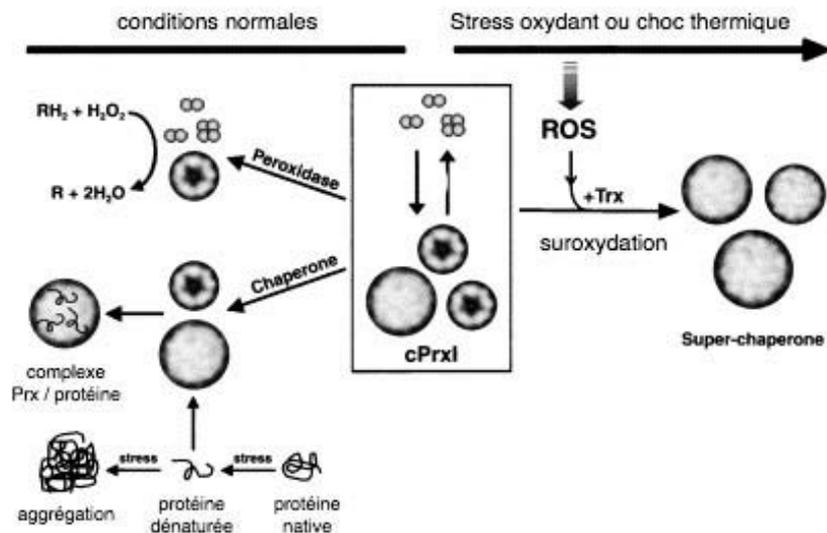


Figure 30 : Représentation des activités peroxydase et de protéine chaperon des 2-Cys Prx typiques en fonction de leur état oligomérique (d'après Jang *et al.*, 2004).

D. Conclusions sur la réactivité des sulfures au niveau des protéines

Les différents exemples détaillés dans ce chapitre montrent que l'oxydation des sulfures au sein des protéines participe à de nombreuses fonctions vitales. En particulier la versatilité des états d'oxydation des Cys permet le fonctionnement d'enzymes où les espèces oxydées des Cys sont des intermédiaires catalytiques. Elle permet la transmission d'informations dans la signalisation cellulaire, et elle permet aussi l'activation de fonctions de protection de certaines protéines.

Les 2-Cys Prx typiques sont un très bon exemple de ces mécanismes dans la physiologie cellulaire de H_2O_2 . Dans le cas des 2-Cys Prx typiques, ces multiples fonctions rendent nécessaire la régulation entre les différentes formes de Prx, et donc la réversibilité de l'oxydation des Cys.

Jusque récemment, l'oxydation sous forme d'acide sulfinique d'une Cys était considérée comme irréversible *in vivo*. La découverte et la caractérisation de nouvelles activités enzymatiques de type sulfinyl réductase, permettant la régénération des 2-Cys Prx typique par réduction de la C_p oxydée sous forme sulfinique, est décrite dans la troisième partie de l'introduction.

Partie III : Enzymes à activité Sulfinyl réductase : les sulfirédoxines

L'oxydation des cystéines sous forme d'acide sulfinique, au sein des protéines, n'est pas une modification fréquente. Seulement 1 à 2 % des résidus cystéines des protéines solubles de foie de rat sont oxydés sous cet état d'oxydation. Jusque récemment, cette forme d'oxydation était considérée comme irréversible dans des conditions biologiques. Depuis, des études ont montré que la cystéine catalytique des 2-Cys Prx typiques oxydées sous forme acide sulfinique (PrxSO₂) pouvait être réduite *in vivo*. Dans cette partie, sera décrit l'état des connaissances (au début de ma thèse) sur les deux types d'enzymes décrites comme étant capables de réduire les PrxSO₂, et plus particulièrement le rôle des sulfirédoxines.

A. Réversibilité de l'oxydation d'une cystéine sous forme acide sulfinique.

A.1 Réduction des 2-Cys Prx eucaryotes suroxydées sous forme d'acide sulfinique, in vivo.

Comme nous l'avons vu précédemment, la cystéine catalytique des 2-Cys Prx eucaryotes peut être sélectivement oxydée sous forme d'acide sulfinique, ceci conduisant à l'inactivation de l'activité peroxydase. Jusqu'en 2003, cet état d'oxydation était considéré comme irréversible *in vivo*. Des études de marquage métabolique au ³⁵S sur des cellules de mammifères ont montré que lors d'un stress induit par H₂O₂, la Prx1 (2-Cys Prx) est suroxydée sous forme d'acide sulfinique, et qu'au cours du temps, il y a régénération de Prx1 sous forme réduite par réduction de l'acide sulfinique et non par synthèse *de novo* de nouvelles Prx1 (Figure 31 page 40) (Woo *et al.*, 2003a).

Des études complémentaires sur plusieurs Prx ont montré que la réduction de l'acide sulfinique était plus rapide sur les 2-Cys Prx typiques cytoplasmiques que sur celles mitochondriales, alors que pour les 1-Cys Prx il n'y a pas de réduction de cette forme d'oxydation (Chevallet *et al.*, 2003 ; Woo *et al.*, 2003b).

Suite à ces observations, deux types d'enzymes à activité sulfinyl réductase ont été décrites.

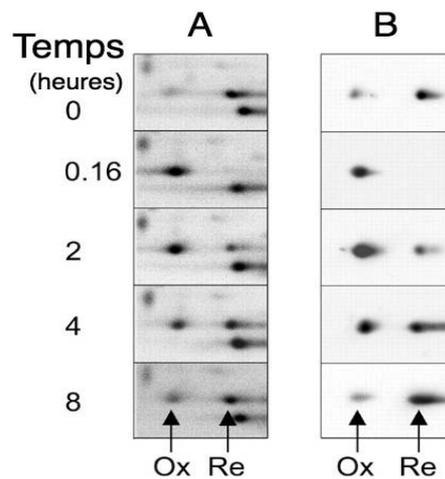


Figure 31 : Réversibilité de l'oxydation sous forme acide sulfinique de Prx1 (Woo *et al.*, 2003a). Les cellules de mammifères, dont les protéines sont marquées au ^{35}S au niveau des Met, sont soumises à un stress par H_2O_2 ($100\ \mu\text{M}$) pendant 10 minutes, puis incubées de 0 à 8 heures dans un milieu salin (DMEM). Les protéines cellulaires sont ensuite séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) puis analysées par autoradiographie (A) ou par Western Blot (B) avec des anticorps anti-Prx1. Est représentée sur la figure la région du gel où est localisée la Prx1 sous forme réduite (-SH) et oxydée ($-\text{SO}_2$).

A.2 Enzymes à activité sulfinyl réductase.

A.2.1 Découverte des sulfirédoxines.

L'activité sulfinyl réductase des sulfirédoxines (Srx) a été mise en évidence par l'équipe du Dr. Toledano (Biteau *et al.*, 2003) chez *S. cerevisiae*. Sa forte expression induite par H_2O_2 et l'intolérance des levures vis-à-vis de H_2O_2 en son absence font de Srx une enzyme impliquée dans le métabolisme cellulaire de H_2O_2 . L'analyse d'extraits cellulaires a montré qu'une fraction de la population de Srx serait liée covalamment avec d'autres protéines. Ces partenaires ont été identifiés après copurification avec Srx, et se sont avérés être les deux 2-Cys Prx les plus abondantes de la levure, Tsa1 et Ahp1, ce qui suggérait que ces enzymes avaient des fonctions associées. Des études *in vivo* ont montré que les levures sauvages peuvent réduire les 2-Cys Prx suroxydées après exposition des cellules à H_2O_2 , alors que des levures n'exprimant plus Srx ($\Delta srx1$) ne permettent plus la réduction des PrxSO_2 (Figure 32 A page 41). De plus, la complémentation par l'expression de Srx recombinante dans des levures $\Delta srx1$ traitées par H_2O_2 montre une restauration de la réduction de l'acide sulfinique par Srx, suggérant une activité sulfinyl réductase (Figure 32 B page 41).

De plus, des études *in vitro* de réduction de Tsa1-SO_2 par Srx ont montré que la réaction nécessite la présence d'ATP, du Mg^{2+} ou du Mn^{2+} , ainsi qu'un système de réduction des thiols comme le DTT ou le système Trx/Trx réductase/NADPH (Figure 33 page 42). Srx contient une Cys conservée dans différents organismes eucaryotes, comme le montre

l'alignement de séquences (Figure 34 page 43), en position 84 chez *S. cerevisiae*. Son remplacement par une Ala abolit l'activité sulfanyl réductase, alors que la substitution des autres Cys non conservées par une Ser n'a pas (C106S) ou a peu d'effet (C48S) sur la réduction des 2-Cys Prx oxydées, *in vivo*. Le fait que C84S Srx1 ne présente pas d'activité sulfanyl réductase *in vitro*, suggérait une fonction essentielle de ce résidu dans la catalyse.

Une recherche de séquences protéiques homologues à celle de scSrx, dans des banques de données (Figure 34 page 43), révèle la présence de Srx uniquement chez certains organismes eucaryotes, ainsi que chez quelques cyanobactéries, avec une identité de séquence d'environ 30 %. Chez les mammifères, Srx est exprimée dans le cerveau, le colon, le foie, la rate et la moelle épinière (Chang *et al.*, 2004) alors que chez les végétaux Srx, comme les 2-Cys Prx, est essentiellement localisée dans les chloroplastes (Dietz *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006).

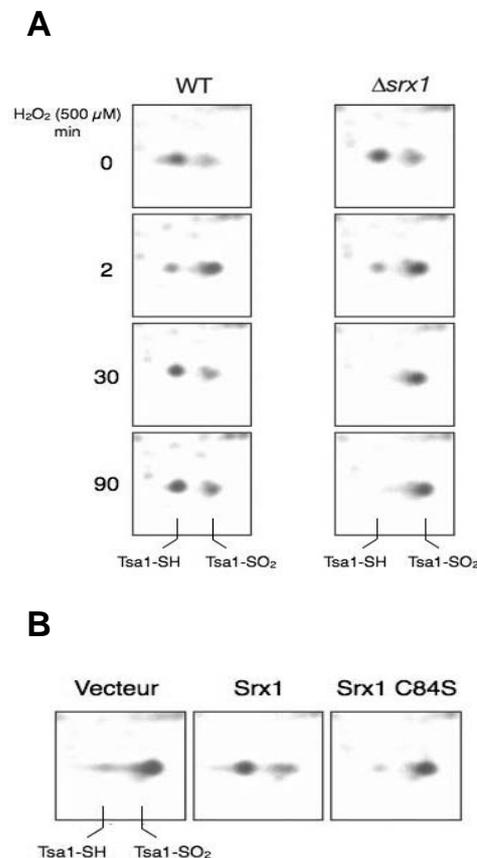


Figure 32 : Réduction *in vivo* par Srx1 de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique (Biteau *et al.*, 2003).

Analyse par électrophorèse 2D-PAGE des formes réduites (SH) et oxydées (SO₂) de Tsa1, marquée au ³⁵S au niveau des Met, dans (A) des levures sauvages ou $\Delta srx1$ exposées à 500 μ M de H₂O₂ durant les périodes mentionnées ou dans (B) des levures $\Delta srx1$ où un vecteur contrôle, exprimant Srx1 sauvage ou exprimant Srx1 mutée est introduit après exposition des levures à 500 μ M de H₂O₂ durant 30 minutes à 30 °C.

Partie III : les Sulfirédoxines

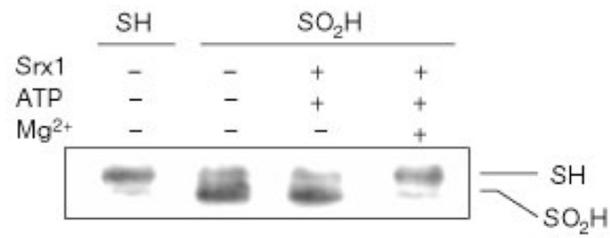


Figure 33 : Réduction *in vitro* de Tsa1 oxydée sous forme acide sulfinique par Srx1 (Biteau *et al.*, 2003).

Analyse par Western Blot avec des anticorps anti-Tsa1 de la réaction *in vitro* contenant de la Srx purifiée, Tsa1 suroxydée, 1 mM ATP, 1 mM de Mg²⁺ et 0,5 mM de DTT, incubée 15 min à 30°C. Les formes réduites et oxydées de Tsa1 sont séparées par alkylation différentielle des thiols libres avec l'acide 4-acétamido-4'-maléimidylstilbène-2,2'-disulfonique (AMS) induisant une augmentation de la masse de 500 Da par Cys alkylée.

A.2.2 Découverte des sestrines.

L'activité sulfanyl réductase des sestrines a été proposée en 2004 par Budanov *et al.* (Budanov *et al.*, 2004) chez l'Homme. Il a été montré que les sestrines sont impliquées dans la défense contre les ERO, comme le produit du gène *hi95* régulé par p53 qui protège les cellules humaines contre l'apoptose induite par H₂O₂ (Budanov *et al.*, 2002), mais dont la fonction est inconnue. L'analyse des séquences a montré que les sestrines possèdent un domaine apparenté à la famille des protéines AhpD bactérienne. AhpD est responsable de la régénération de AhpC, une 2-Cys Prx, qui est oxydée durant la réduction de peroxyde, notamment chez *M. tuberculosis*. L'homologie d'un domaine des sestrines avec AhpD suggèrerait un rôle des sestrines dans la régénération des 2-Cys Prx chez les mammifères. Chez AhpD, les deux Cys du motif CXXC sont essentielles pour la réduction de AhpC oxydée. Chez les sestrines, seule une Cys est conservée au niveau du motif CXXL et cette Cys serait essentielle à l'activité antioxydante des sestrines.

Pour savoir à quel niveau les sestrines sont impliquées dans la régénération des 2-Cys Prx, l'activité de Hi95, immunopurifiée par des anticorps anti-Flag, a été testée *in vitro* en présence de 2-Cys Prx traitée à H₂O₂, de MgCl₂, d'ATP et de DTT (Figure 35 page 45). Comme nous l'avons vu précédemment, en présence de H₂O₂ les 2-Cys Prx s'oxydent sous forme acide sulfinique. La sestrine Hi95 permettrait la réduction de cet acide sulfinique régénérant Prx1 sous forme réduite, et cette activité sulfanyl réductase des sestrines serait dépendante de la Cys du motif CXXL, ainsi que d'ATP et de Mg²⁺.

Aujourd'hui, l'activité sulfanyl réductase des sestrines est remise en cause. En effet, l'étude menée par Rhee *et coll.* (Woo *et al.*, 2009) montre que la surexpression de Hi95, dans des cellules HeLa ou A549, ne permet pas la réduction de Prx suroxydées. Ces résultats sont en accord avec des études que nous avons nous même entreprises sur la sestrine humaine. L'activité observée par Budanov *et al.* pourrait provenir de Srx copurifiée avec Hi95.

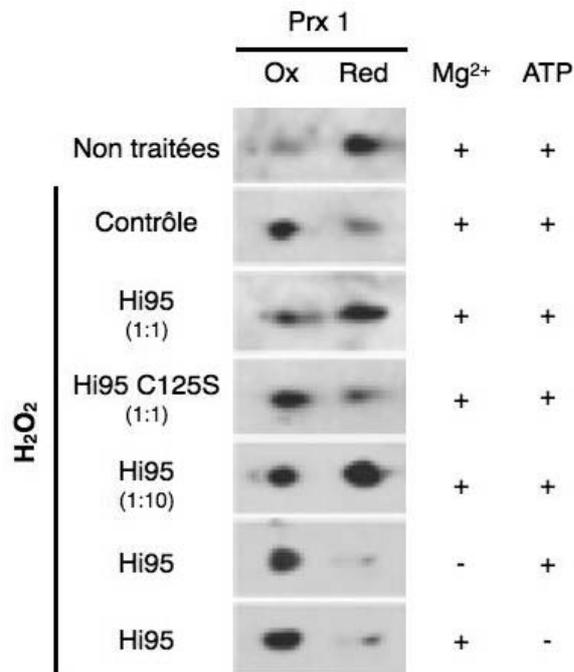


Figure 35 : Réduction *in vitro* par Hi95 de Prx1 oxydée sous forme acide sulfinique (Budanov *et al.*, 2004).

Analyse par électrophorèse 2D-PAGE des formes réduites (SH) et oxydées (SO₂) de Prx1 révélées par Western Blot avec des anticorps anti Prx1. Le mélange de réaction contient 1 µg de Prx1 suroxydée ou non, 4 µg (1:1) ou 0,4 µg (1:10) de Hi95 ou 4 µg de Hi95 C125S (1:1), 1 mM ATP et 1 mM MgCl₂ incubé pendant une heure à 30°C dans du tampon Tris-HCl 50 mM KCl 150 mM pH7.

B. Rôle des sulfirédoxines au niveau cellulaire.

B.1 Rôle dans la régulation de l'activité des 2-Cys Prx.

Le premier rôle identifié de Srx est son activité enzymatique de réduction des 2-Cys Prx suroxydées sous forme d'acide sulfinique. Nous avons vu que les 2-Cys Prx peuvent jouer plusieurs rôles au sein des cellules, d'abord comme peroxydase, comme détecteur de H₂O₂ et enfin comme protéine chaperon, fonctions modulées selon l'état d'oxydation de la C_p. Par son activité sulfinyl réductase, Srx est impliquée dans la nécessaire régulation de ces différentes fonctions. Dans des cellules de mammifères soumises à une hyperoxie, le gène de Srx est la cible de facteur de transcription comme AP-1 ou encore Nrf2, *via* un élément de réponse antioxydant (ARE) (Francesc *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2008 ; Bae *et al.*, 2008 ; Wei *et al.*, 2008).

Chez *S. pombe*, nous avons vu que Tpx-1 joue le rôle de senseur de H₂O₂ et permet l'activation de Pap-1 en présence d'une faible concentration en H₂O₂ alors qu'en présence d'une forte concentration en H₂O₂ Tpx-1 est inactivée sous forme suroxydée. Dans ces

Partie III : les Sulfirédoxines

conditions, il n'y a plus d'expression des gènes dépendant de l'activation de Pap-1, et c'est la voie de Sty-1 qui est activée. Sty-1, une mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoryle le facteur de transcription Aft1 qui permet l'expression de gènes impliqués dans la résistance vis-à-vis des stress oxydants. Après un certain temps d'exposition à H_2O_2 la concentration de Tpx-1 suroxydée diminue au profit de Tpx-1 réduite de façon Srx-dépendante (Vivancos *et al.*, 2005 ; Bozonet *et al.*, 2005). Par contre, dans les cellules n'exprimant pas Sty-1 il n'y a plus de réduction de Tpx-1 suroxydée sous forme d'acide sulfinique, ce qui suggère que la voie de Sty-1 active l'expression de Srx. Donc chez *S. pombe*, Tpx-1 est inactivée par suroxydation ce qui augmente la concentration en H_2O_2 et entraîne ainsi l'activation de la voie de Sty-1. Sty-1 active Aft1 qui va activer la transcription et l'expression de Srx. Srx réduit Tpx-1 suroxydée qui élimine l'excès de H_2O_2 et réactive Pap-1 (Figure 36 page 46).

La suroxydation des 2-Cys Prx typiques conférerait à ces enzymes une activité de protéine chaperon (partie II §D.2). Les Srx, en réduisant les 2-Cys Prx typiques oxydées sous forme d'acide sulfinique, permettraient un équilibre entre les activités peroxydases et protéine chaperon.

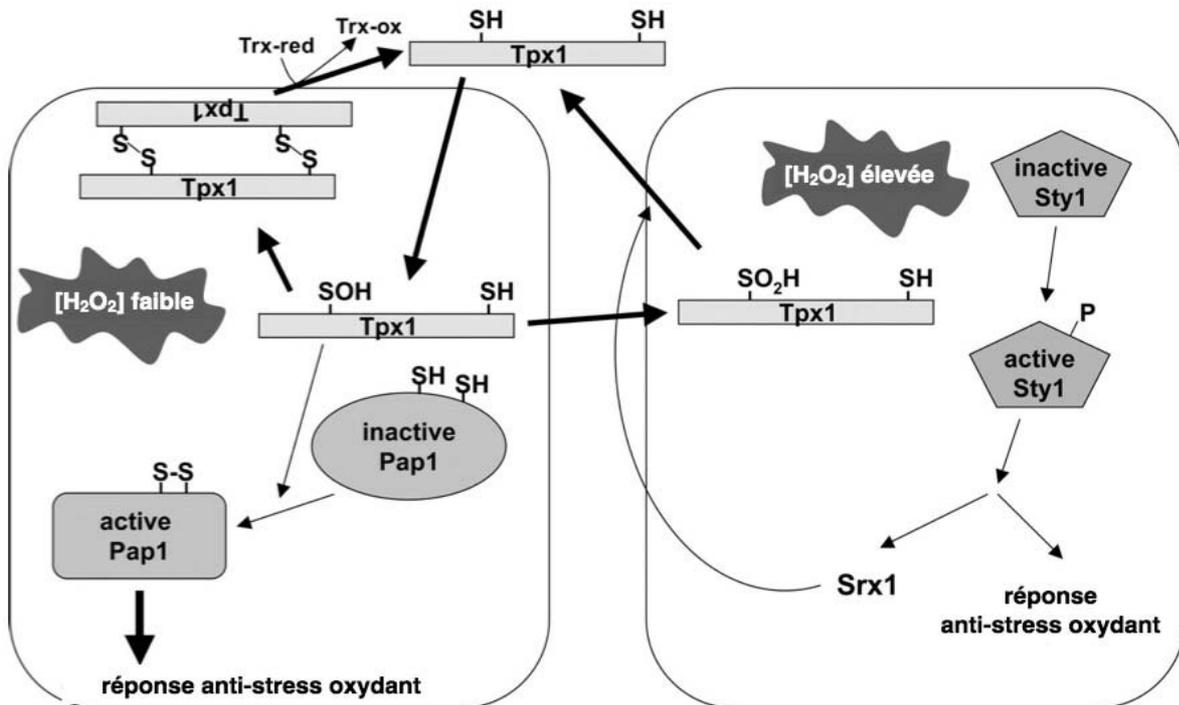


Figure 36 : Modèle de régulation de l'activation de Pap-1 en réponse à un stress induit par H_2O_2 (d'après Vivancos *et al.*, 2005).

B.2 Rôle dans la déglutathionylation de protéines.

Au cours d'un stress causé par des ERO, de nombreuses protéines sont modifiées au niveau de leur Cys par la formation d'un pont disulfure mixte avec le GSH. Ce phénomène est la glutathionylation. Ces modifications post-traductionnelles ont un rôle protecteur ou régulateur de la fonction de protéines, lors d'un stress. Ces modifications sont réversibles, la déglutathionylation de ces protéines étant réalisée par la Grx (voir partie II §B.1.2). Des études récentes ont montré que Srx peut aussi jouer un rôle dans la déglutathionylation de protéines.

En effet, lors d'un stress oxydant causé par l'oxyde nitrique, le taux de protéines glutathionylées dans des cellules humaines de rein (HEK293) exprimant Srx est fortement diminué par rapport aux taux dans des cellules ne l'exprimant pas. Cette observation n'est vraie que dans le cas où la Cys essentielle de Srx n'est pas substituée. L'actine et PTP-1B sont des protéines glutathionylées lors de ce stress. Des études *in vitro* montrent que Srx, possédant sa Cys essentielle, est capable de déglutathionyler ces deux protéines, rendant l'activité phosphatase aux PTP-1B et la possibilité à l'actine de polymériser. L'incubation de Srx avec ces deux protéines pendant le traitement de glutathionylation montre une faible modification des protéines par rapport au traitement sans Srx. Dans ce cas, Srx inhiberait la glutathionylation, et cela indépendamment de la présence de sa Cys essentielle. Srx protégerait donc les protéines de la glutathionylation au cours d'un stress oxydant, permettant aux protéines de rester actives (Findlay *et al.*, 2006).

Aujourd'hui, aucun mécanisme catalytique de déglutathionylation par Srx n'a été proposé. Seule l'observation que la Cys essentielle de Srx n'est pas l'accepteur du GSH à été mentionnée, ce qui semble contradictoire avec le fait que l'activité de déglutathionylation soit dépendante de cette Cys.

C. Structure et mécanisme de Srx.

C.1 Mécanisme enzymatique hypothétique de Srx pour la réduction des Prx oxydées sous forme d'acide sulfinique.

Lors de la découverte de Srx chez *S. cerevisiae*, il a été montré que l'activité sulfinyl réductase nécessite la présence d'ATP, de Mg²⁺ (ou Mn²⁺) et de réducteur à thiols. De plus, l'observation d'un lien covalent réductible par le DTT entre Srx et Tsa1 (2-Cys Prx typique), impliquant la Cys essentielle de Srx, a conduit l'équipe du Dr. Tolédano à proposer un

Partie III : les Sulfirédoxines

mécanisme catalytique de Srx (Biteau *et al.*, 2003). Ce mécanisme comporte plusieurs étapes (Figure 37 page 48).

Au premier abord, une analogie pourrait être établie entre les fonctions chimiques acide sulfinique et carboxylique. Comme c'est le cas pour un acide carboxylique, la réduction *in vivo* d'un acide sulfinique nécessite une activation chimique. Cependant, ces deux groupements diffèrent par leur géométrie, plane pour le carboxylate et tétraédrique pour le sulfinate, et par leur réactivité, le caractère nucléophile du sulfinate étant porté par l'atome de soufre et les atomes d'oxygène alors qu'il est porté seulement par les atomes d'oxygène pour le carboxylate (cf Discussion). La présence d'ATP et de Mg^{2+} a conduit à proposer que la fonction acide sulfinique est activée par transfert d'un groupement phosphate de l'ATP. Cette activation de la fonction sulfinique aboutit à la formation d'un intermédiaire ester phosphoryl sulfinique (ou plus précisément d'un anhydride phosphoryle sulfinique). Cet intermédiaire subit l'attaque nucléophile de la Cys catalytique de Srx qui libère un ion phosphate inorganique et un intermédiaire covalent entre Srx et Prx, caractérisé par une liaison thiosulfinate. Comme nous l'avons vu, cette forme d'oxydation de pont disulfure est peu stable et est sensible à l'attaque nucléophile des thiols au niveau du soufre sulfénique de la liaison (Figure 14 page 21), c'est à dire dans ce mécanisme sur le soufre de la Cys catalytique de Srx. Cette attaque d'un réducteur à thiol permet la libération de la 2-Cys Prx sous forme d'acide sulfénique, qui sera réduit *via* sa Cys de régénération (Figure 20 page 27), et la libération de Srx lié par un pont disulfure avec le réducteur. Srx est ensuite recyclée par la réduction de ce pont disulfure par un autre équivalent de réducteur. Dans ce mécanisme, Srx aurait donc deux activités, une activité de phosphotransférase et une activité de réductase.

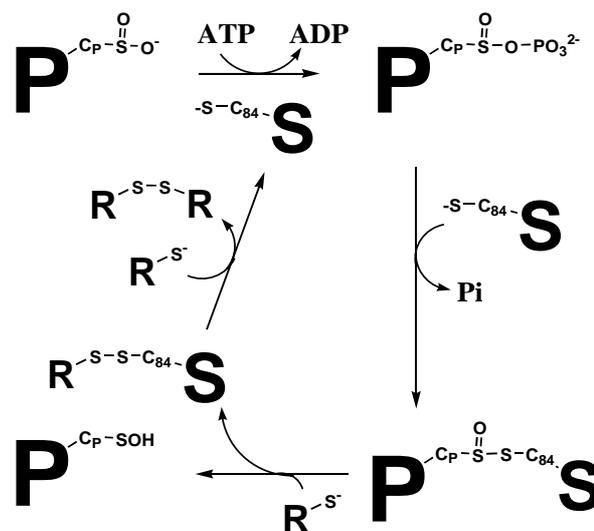


Figure 37 : Mécanisme catalytique proposé pour les sulfirédoxines (d'après Biteau *et al.*, 2003).

S = Srx, P = Prx, T = Trx, R = réducteur à thiol

C.2 Etude des Srx de mammifères.

Suite aux observations faites sur l'enzyme de *S. cerevisiae*, des études ont été entreprises sur les Srx de mammifères (Chang *et al.*, 2004 ; Woo *et al.*, 2004). Après avoir montré que l'inhibition de la traduction de Srx, dans des cellules humaines, abolit la réduction des 2-Cys Prx oxydées sous forme acide sulfinique, des études cinétiques ont été engagées. L'activité de Srx est détectée par la disparition de la forme suroxydée de Prx au cours du temps grâce à une analyse par immunoblot avec des anticorps anti-PrxSO₂, corrélée avec la régénération de l'activité peroxydase de Prx. Pour les enzymes de mammifères étudiées (humaine, souris, rat) la constante catalytique mesurée est de 0,1-0,18 min⁻¹, soit une vitesse très lente. Ces études ont montré également que la réaction était dépendante de l'ATP ; l'ADP ou l'AMP-PNP ne permettant pas la réduction. Parmi d'autres nucléosides triphosphates, le GTP peut remplacer l'ATP dans la réaction alors que les pyrimidine nucléoside triphosphates ne permettent pas la réduction des PrxSO₂ par Srx. Un K_M de Srx pour l'ATP a été mesuré à environ 30 μM. La recherche du réducteur physiologique de la réaction montre que, quel que soit le réducteur utilisé DTT, GSH ou Trx, la constante catalytique est la même. Le GSH ou la Trx auraient donc tous deux le potentiel pour être le réducteur physiologique de la réaction catalysée par les Srx de mammifères.

D'autres études sur la spécificité de substrat de Srx ont été menées. Srx interagit avec les 2-Cys Prx typiques sous formes réduite ou oxydée en acide sulfinique et ce avec la même efficacité. La substitution de la Cys catalytique de Srx en Ser n'affecte pas l'interaction entre les 2-Cys Prx typiques et Srx. Par contre, il n'y a pas d'interaction entre Srx et les Prx des autres classes. Seules les 2-Cys Prx typiques peuvent être réduites par Srx. Les 2-Cys Prx atypiques, les 1-Cys Prx ou encore la GAPDH, suroxydées sous forme d'acide sulfinique ne sont pas réduites par Srx. Srx a donc une spécificité pour les 2-Cys Prx typiques, ce qui ajoute un argument en faveur de son rôle de régulateur.

C.3 Structure de Srx.

Les Srx catalysent la réduction de protéines oxydées spécifique aux 2-Cys Prx typiques suroxydées sous forme d'acide sulfinique. L'alignement de séquences des Srx (Figure 34 page 43) montre que plusieurs résidus sont conservés.

La détermination de la structure de Srx par cristallographie aux rayons X (Jönsson *et al.*, 2005) et par RMN (Lee *et al.*, 2005) montre que Srx possède un nouveau repliement protéique. Srx est structurée en un feuillet β composé de cinq brins β antiparallèles, et de trois hélices α (Figure 38 page 50).

Partie III : les Sulfirédoxines

L'hélice α_2 et la séquence qui la précède contiennent la signature des Srx, F(81)-G/S-G-C-H-R(86) (numérotation de *S. cerevisiae*), qui contient la Cys84 catalytique. Cette Cys est située à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_2 et est proche de l'Arg20 ($\sim 3,5$ Å) qui est située dans la boucle reliant le brin β_2 à l'hélice α_1 . Ces observations suggèrent que le pK_{app} de la Cys catalytique pourrait être abaissé grâce au dipôle induit par l'hélice α et par les interactions stabilisatrices entre la Cys et l'Arg. Ceci est en accord avec la valeur de pK_{app} de 7,3 mesurée pour la Srx humaine (Chang *et al.*, 2004).

Le mécanisme catalytique de Srx nécessite la phosphorylation de l'acide sulfinique, grâce au transfert du phosphate γ de l'ATP. Ceci implique qu'il y a une reconnaissance de l'ATP par Srx et donc l'existence d'un site de fixation de l'ATP dans la structure de Srx. La structure cristalline de Srx montre la présence d'une molécule de phosphate dans le site actif (Figure 39 page 51). Cette molécule est stabilisée par trois molécules d'eau, le δNH de l'His85 et deux azotes du noyau guanidinium de l'Arg86 (dont le ϵNH). Ce site pourrait correspondre au site de fixation d'un des phosphates de l'ATP.

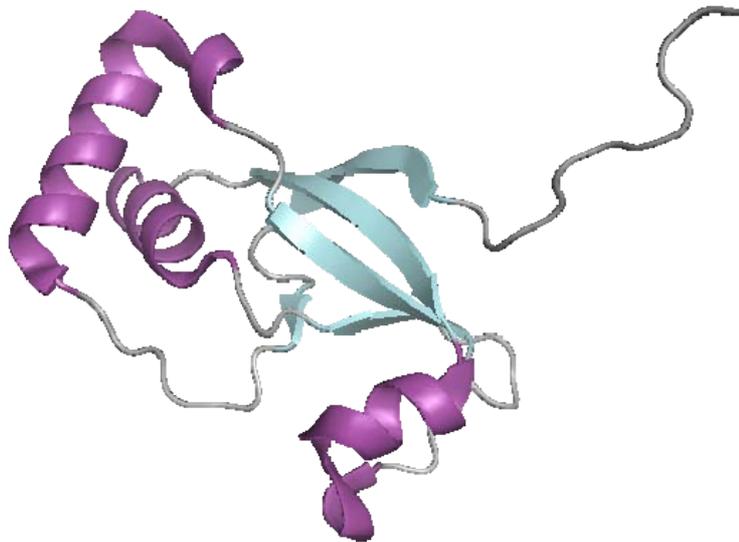


Figure 38 : Structure de la Srx humaine (d'après Jönsson *et al.*, 2005).

Les hélices α sont colorées en violet, les régions non structurées en gris et les brins β en bleu.

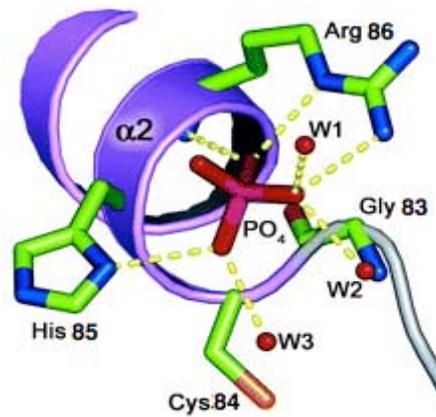


Figure 39 : Structure du site de fixation d'une molécule de phosphate dans la Srx humaine (d'après Jönsson *et al.*, 2005).

Les hélices α sont colorées en bleu, les régions non structurées en gris. La numérotation des acides aminés suit celle de la Srx de *S. cerevisiae*. Les molécules d'eau sont indiquées W.

La structure du complexe Srx cocristallisée avec l'ADP a mis en évidence un nouveau motif de fixation de nucléotide (Jönsson *et al.*, 2005) (Figure 40 page 51). Dans ce motif, le noyau adénine de l'ADP interagit avec la Thr/Ser 37 et la Ser 33 (non conservée) situées dans l'hélice α 1. Un des oxygènes du phosphate α interagit avec la Lys 30, le phosphate β prend la place du groupement phosphate vu dans la structure de Srx seule et interagit avec l'His85 et l'Arg86 ainsi qu'avec deux molécules d'eau. Ces deux molécules d'eau sont également incluses dans un réseau de liaisons hydrogène impliquant d'autres molécules d'eau et l'azote du NH de la Gly83 et l'oxygène du carbonyl de la Val25. Dans cette structure, l'interaction entre la Cys catalytique et l'Arg20 est bien caractérisée.

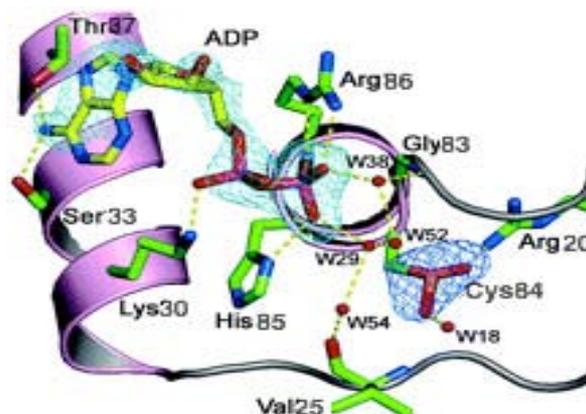


Figure 40 : Structure du site de fixation de l'ADP dans la Srx humaine (d'après Jönsson *et al.*, 2005).

Les hélices α sont colorées en violet, les régions non structurées en gris. La numérotation des acides aminés suit celle de la Srx de *S. cerevisiae*. La Cys catalytique est représentée sous forme oxydée acide sulfinique. Les molécules d'eau sont indiquées W.

Partie III : les Sulfirédoxines

La structure cristalline du complexe hSrx-ATP-MgCl₂ a été obtenue avec le variant Ser de la Cys catalytique, par remplacement moléculaire utilisant l'enzyme apo comme modèle, à une résolution de 1,8 Å (Jönsson *et al.*, 2008b). La comparaison de cette structure avec la structure contenant l'ADP, montre que le noyau adénine est positionné de la même façon dans les deux structures, l'un des oxygènes du phosphate α interagissant avec la Lys30 et le phosphate β interagissant avec l'His85 et l'Arg86 (Figure 41 A page 53). Cependant dans cette structure, la chaîne principale de l'His85 fait une rotation qui permet au noyau imidazole d'interagir aussi bien avec le phosphate β qu'avec le phosphate γ . L'ion Mg²⁺ est coordonné à trois oxygènes portés par les trois groupements phosphates de l'ATP ainsi qu'avec deux molécules d'eau (Figure 41 B page 53). Cette structure montre également que la Cys catalytique de Srx (ici Ser84, suivant la numérotation de *S. cerevisiae*) n'interagit pas avec le phosphate γ de l'ATP, compte tenu de sa distance de 4 Å et de son orientation par rapport au groupement phosphate γ induit par son interaction avec le Mg²⁺ (Figure 41 B page 53).

Ces structures et modèles montrent que Srx possède un nouveau type de repliement protéique et un nouveau site de fixation des nucléotides avec une séquence consensus GCHR. Elles suggèrent que plusieurs résidus de Srx pourraient être impliqués dans la catalyse, mais elles ne répondent pas à la question des résidus impliqués dans l'interaction entre Srx et Prx, ni à la question de l'implication de résidus de PrxSO₂ dans la réaction de réduction de l'acide sulfinique.

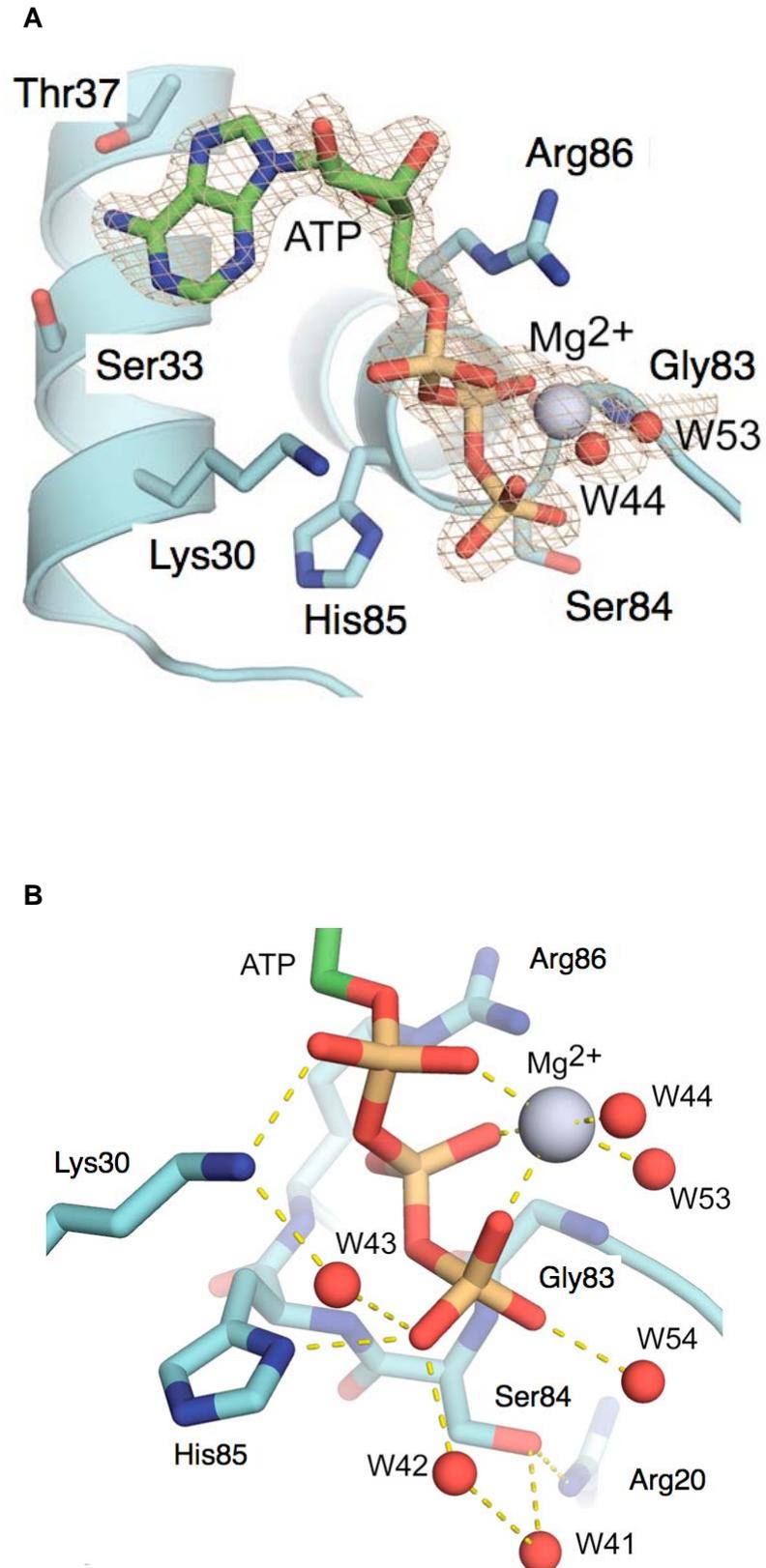


Figure 41 : Structure du site de fixation de l'ATP dans la Srx humaine (d'après Jönsson *et al.*, 2008b).

La numérotation des acides aminés suit celle de la Srx de *S. cerevisiae*. La Cys catalytique est remplacée par une Ser. Les molécules d'eau sont indiquées W. **(A)** montre la fixation de l'ATP dans Srx et **(B)** montre les interactions entre certains résidus de Srx et les phosphates de l'ATP. Les liaisons hydrogènes entre Srx et l'ATP sont indiquées en pointillés.

Objectifs

Lorsque j'ai débuté mon projet de thèse, les sulfirédoxines venaient d'être découvertes. Leur rôle *in vivo* chez la levure *S. cerevisiae* avait été décrit et un mécanisme catalytique avait été proposé (Biteau *et al.*, 2003).

Ce nouveau type d'activité enzymatique soulevait de nombreuses questions. L'activité réductase de Srx restait à caractériser, et en particulier la nature de l'intermédiaire impliqué dans le processus catalytique de réduction de la fonction sulfinique. La question du recyclage de l'activité Srx était également posée, tant au niveau du mécanisme de recyclage que de la nature du réducteur impliqué. Enfin, les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans l'activité réductase et dans le recyclage de l'activité de Srx, étaient à définir. En effet, aucune structure tridimensionnelle de la Srx de *S. cerevisiae* seule, et *a fortiori* en complexe avec la Prx et l'ATP, n'était disponible.

Mon projet de thèse avait pour objectif principal la caractérisation du mécanisme catalytique de la sulfirédoxine de *S. cerevisiae*. Pour ce faire, après avoir établi une stratégie de production et de purification en grande quantité de Srx de *S. cerevisiae* et de son substrat Tsa1, et après avoir obtenu ce substrat sous forme oxydée acide sulfinique sur la C_p, nous avons élaboré et mis au point des tests d'activité enzymatiques adaptés pour caractériser chacune des étapes du mécanisme réactionnel de Srx et chacun des intermédiaires formés au cours de la catalyse.

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés en trois parties. La première partie, qui fait l'objet d'un article publié dans *J. Biol. Chem*, est consacrée à la détermination de l'activité réductase de Srx, en particulier de l'intermédiaire thiosulfinate entre Srx et Prx. Cette activité a été caractérisée cinétiquement par le suivi de la libération du phosphate inorganique provenant de l'anhydride phosphoryl sulfinique. La deuxième partie, qui fait également l'objet d'un article en cours de soumission, traite du recyclage de la Srx de *S. cerevisiae* à partir de l'intermédiaire covalent Srx/Prx, et de l'implication des différents résidus Cys de Srx dans ce mécanisme. Enfin la troisième partie aborde l'étape de transfert de phosphate, première étape dans le schéma catalytique de Srx, qui a été caractérisée cinétiquement par le suivi de l'ADP libéré au cours de la réaction, ce qui a permis d'identifier l'étape limitante de la réaction. Cette partie fait également l'objet d'un article en préparation.

L'ensemble des résultats est ensuite discuté dans la partie Discussion/Perspectives.

Résultats

Résultats I : Caractérisation de l'activité réductase de Srx.

Lorsque j'ai débuté mon stage de DEA, tout un travail d'études *in vivo* et *in vitro* avait conduit, comme indiqué dans l'Introduction, l'équipe du Dr. Tolédano à caractériser une activité Srx dans *S. cerevisiae*, et à proposer un mécanisme catalytique basé sur la chimie des thiosulfates (Biteau *et al.*, 2003) (cf Introduction partie III §C.1). Dix huit mois après le début de mon stage de DEA, l'équipe de Rhee *et coll.* publia, début 2006, un article proposant un autre mécanisme catalytique pour les Srx de mammifères (Jeong *et al.*, 2006). Dans ce mécanisme, Srx présente toujours une activité de phosphotransférase, mais n'a pas d'activité réductase (Figure 42 page 55).

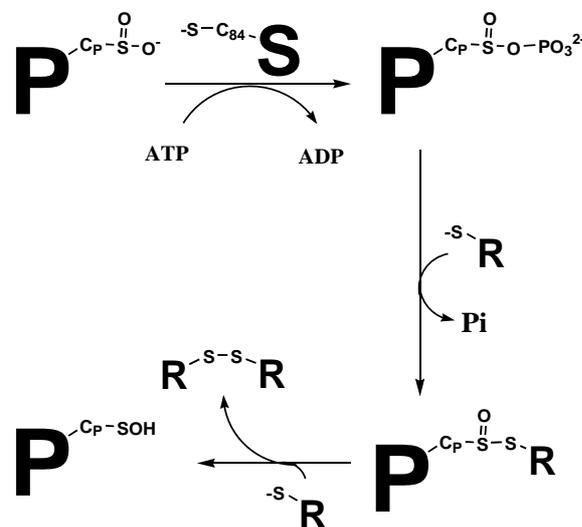


Figure 42 : Mécanisme catalytique proposé pour les sulfirédoxines (d'après Jeong *et al.*, 2006).
S = Srx, P = Prx, R = réducteur à thiol.

Suite aux travaux de Tolédano *et coll.*, le premier objectif de mon travail a été de caractériser les étapes conduisant à la réduction de la PrxSO₂ par la Srx, et en particulier de valider l'hypothèse de la formation d'un intermédiaire thiosulfinate entre Srx et Prx. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'étape correspondant à la libération du phosphate inorganique.

Quelque soit le mécanisme considéré, il y a toujours formation de l'anhydride phosphoryl sulfonique qui est réduit *via* l'attaque soit d'un thiol externe soit d'une Cys de la Srx, et conduit à la formation d'un intermédiaire thiosulfinate de nature différente avec, quelque soit l'intermédiaire, libération d'un phosphate. (Remarque : comme expliqué dans la partie Discussion page 139, l'intermédiaire thiosulfinate peut éventuellement être formé *via* la formation d'un intermédiaire thiosulfonate). Ceci étant, suivant les conditions expérimentales, il doit être possible de différencier les deux mécanismes. En effet, dans des conditions où la

Résultats I : activité réductase de Srx

concentration en Srx est limitante par rapport à celle de PrxSO₂, la quantité de Pi libérée au cours de la réaction, en l'absence de réducteur, doit être dans le cas du mécanisme proposé par l'équipe de Rhee soit nulle si l'anhydride mixte est stable dans les conditions expérimentales utilisées soit largement supérieure à la concentration de Srx si l'anhydride mixte est instable, alors que la quantité de Pi libérée doit être égale à la concentration en Srx utilisée dans le mécanisme proposé par l'équipe de Tolédano. Dans un deuxième temps, la nature de l'intermédiaire postulé devait être démontrée et son statut d'intermédiaire catalytique devait être montré par des approches cinétiques.

Dans ce chapitre, je présenterai d'abord un résumé des résultats obtenus par l'équipe de Rhee sur la caractérisation du mécanisme enzymatique de la Srx humaine (hSrx), avant de présenter la méthode que nous avons adoptée au cours de notre étude de la Srx de *S. cerevisiae* (scSrx) et qui nous a permis de démontrer l'existence d'un intermédiaire covalent thiosulfinate entre Srx et Prx. Je montrerai notamment comment expliquer les résultats obtenus par l'équipe de Rhee sur l'enzyme humaine sur la base de l'existence d'un intermédiaire thiosulfinate entre Srx et Prx. Enfin, la publication issue de notre étude est présentée dans un dernier paragraphe.

A. Travaux de l'équipe de Rhee.

Au cours de l'étude ayant conduit à la découverte des sulfirédoxines, Biteau *et al.* avaient montré *in vivo* que suite à un stress oxydant généré par H₂O₂, Srx et Prx copurifiaient sous une forme liée covalamment par une liaison réductible par le DTT. Rhee *et coll.* ont cherché à caractériser cette espèce *in vitro* sur les protéines correspondantes humaines. Pour cela, ils ont analysé les produits de la réaction entre hSrx sauvage et hPrxSO₂ sauvage en présence d'ATP et en absence de réducteur sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions non réductrices et par Western Blot avec des anticorps anti-Srx et anti-Prx. En plus des bandes de Srx et de Prx, ils ont observé quatre bandes réductibles par le DTT, de masse moléculaire apparente de 35, 48, 60 et 70 kDa qui pouvaient correspondre à des complexes Prx-Srx, Prx-(Srx)₂, (Prx)₂-Srx et (Prx)₂-(Srx)₂ respectivement. Seul le complexe de 35 kDa a été analysé par digestion à la trypsine puis par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Aucun pic de ratio m/z correspondant à la masse du peptide portant une liaison thiosulfinate entre la Cys catalytique de Srx et la C_p de Prx n'a été observé. Par contre, un peptide, réductible par le DTT, contenant la C_R de Prx et la Cys catalytique de Srx a été observé. De ces observations, il a été conclu que l'espèce de 35 kDa observée par électrophorèse et Western Blot était un complexe covalent entre Srx et Prx où la Cys

catalytique de Srx formait un pont disulfure avec la C_R de Prx, et que cette espèce correspondait à un artefact réactionnel (voir autre explication page 58).

En suivant la diminution de l'intensité des bandes de la PrxSO₂ au cours du temps par Western blot, l'équipe de Rhee a déterminé une constante de vitesse à l'état stationnaire (k_{ss}), en présence de GSH, de $\sim 0,2 \text{ min}^{-1}$ (Chang *et al.*, 2004). De plus, cette équipe a étudié l'étape «réductase» de la réaction en suivant au cours du temps la libération de phosphate inorganique à partir de γ -[³²P]-ATP, en absence et en présence de réducteur. Ils ont montré de façon attendue qu'en présence de GSH, de Trx ou de DTT, le k_{ss} est dépendant de la concentration de hSrx et la quantité de ³²Pi libérée est égale à la concentration en PrxSO₂. Le k_{ss} mesuré est de $0,2 - 0,5 \text{ min}^{-1}$ à 30°C. Par contre, en absence de réducteur, la constante de vitesse de libération de ³²Pi est toujours dépendante de la concentration en hSrx mais la quantité de ³²Pi libérée est supérieure à la concentration en hSrx et même en PrxSO₂.

De l'ensemble de ces observations, ils en concluent qu'en absence de réducteur, l'acide sulfinique activé ne serait pas réduit, comme l'indique l'absence d'espèce thiosulfinate Prx-SO-S-Srx observée, mais s'hydrolyserait en libérant un Pi et la Prx sous forme d'acide sulfinique. La PrxSO₂ pourrait à nouveau être phosphorylée par Srx pour redonner une espèce activée de Prx qui serait aussi hydrolysée, et ainsi de suite au cours d'un cycle futile, conduisant à une stoechiométrie de Pi bien supérieure à la concentration en Srx présente (Figure 43 page 57). En présence de réducteur comme le GSH, le dosage d'une mole de Pi libérée pour une mole de PrxSO₂ implique alors que l'acide sulfinique activé serait réduit directement par le réducteur ajouté (Figure 42 page 55) (Jeong *et al.*, 2006). Srx interviendrait dans l'activation de l'acide sulfinique mais pas dans la réduction de cette espèce. Srx n'aurait donc qu'une activité phosphotransférase.

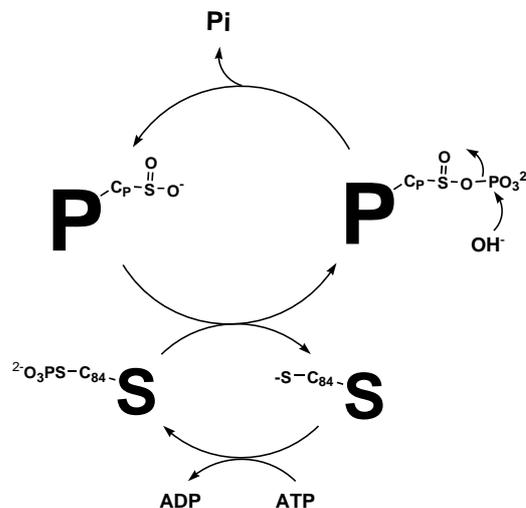


Figure 43 : Mécanisme proposé du cycle futile de phosphorylation et de déphosphorylation de PrxSO₂ (d'après Jeong *et al.*, 2006).

S = Srx, P = Prx.

B. Mise en évidence de l'activité réductase de scSrx.

Les résultats obtenus par l'équipe de Rhee peuvent s'expliquer différemment. La forme disulfure considérée comme artéfactuelle serait en fait un produit secondaire dû à la réactivité de l'intermédiaire thiosulfinate vis-à-vis des thiols. En effet, dans l'étude faite par l'équipe de Rhee, les réactions ont été suivies sur une échelle de temps de l'ordre de l'heure, les produits ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE, et enfin la bande correspondant au complexe entre Srx et Prx a été hydrolysée par la trypsine à pH neutre avant analyse en MALDI-TOF. Ce sont des conditions dans lesquelles une espèce thiosulfinate n'est pas stable. De plus, la réaction est réalisée avec la Prx sauvage dans laquelle la Cys C_R est présente. Cette Cys peut éventuellement réagir de façon intramoléculaire sur le thiosulfinate au niveau du soufre sulfénique et former un pont disulfure entre la Cys catalytique de Srx et la C_R de Prx (Figure 44 page 58), correspondant à l'espèce observée lors de leur étude. Enfin, la vitesse des deux premières étapes de la réaction, à savoir celles du transfert de phosphate et de réduction de l'acide sulfénique activé, pouvait se révéler beaucoup plus rapide que celle mesurée à l'état stationnaire. L'analyse de la réaction sur une échelle de temps de l'ordre de l'heure, par des méthodes discontinues impliquant des prélèvements manuels suivis d'une analyse des produits de réaction, ne permet pas d'accéder à une constante de vitesse de la réaction de l'ordre de la min⁻¹ ou plus rapide.

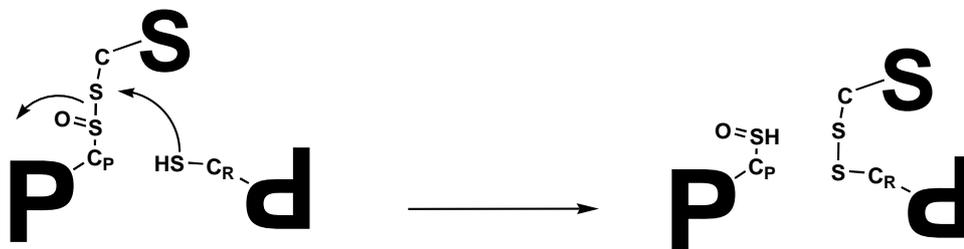


Figure 44 : Représentation schématique de la formation du pont disulfure entre Srx et la C_R de Prx à partir de l'intermédiaire thiosulfinate.

S = Srx, P = Prx

Dès le début de notre étude, ayant intégré l'ensemble de ces limitations et artéfacts possibles, nous avons élaboré la stratégie suivante pour l'étude de l'activité réductase de scSrx : i) compte tenu de la réactivité des espèces thiosulfinate vis-à-vis des thiols, nous avons utilisé des conditions expérimentales où seuls les résidus Cys essentiels étaient conservés. Nous avons donc travaillé avec des protéines dans lesquelles les Cys non catalytiques (la C_R de la Prx, et les Cys48 et Cys106 de scSrx qui ne sont pas conservées dans les Srx de mammifères) étaient substituées par Ala ou Ser ; ii) les réactions sont arrêtées par acidification du milieu afin de rendre les intermédiaires potentiels moins

sensibles à l'hydrolyse ; iii) les produits de la réaction ont été caractérisés après séparation des espèces par chromatographie en phase inverse et en milieu acide, couplée directement à une analyse par spectrométrie de masse ; iv) nous avons mis au point une méthode permettant de suivre la production de Pi en temps réel dans le but de distinguer cinétiquement la réaction spécifique du bruit de fond plus lent dû aux réactions secondaires.

Nous avons ainsi montré l'existence d'une espèce covalente contenant à la fois scSrx et Prx, réductible par le DTT. En collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (UMR 7178 CNRS-ULP), nous avons ensuite pu établir que cette espèce correspondait au complexe $\text{PrxC}_P\text{SO-SC}_{84}\text{Srx}$, puis son rôle en tant qu'intermédiaire catalytique.

B.1 Paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

La détermination des paramètres cinétiques est un pré-requis pour mettre au point les conditions expérimentales optimales permettant de suivre les différentes étapes de la réaction catalysée par scSrx. Dans ce but, après avoir mis au point les conditions de production et de purification de la scSrx et d'une 2-Cys Prx typique (Tsa1) oxydée sous forme d'acide sulfonique de *S. cerevisiae*, nous avons développé un test cinétique permettant de suivre la réaction à l'état stationnaire. En couplant la réaction au système Trx/Trx réductase de *E. coli*, nous mesurons un k_{ss} de $\sim 2 \text{ min}^{-1}$ ($k_{ss} = 1,9 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ avec PrxSO_2 sauvage et $k_{ss} = 1,7 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ avec C171A PrxSO_2 i.e. sans C_R) dix fois supérieur à celui mesuré par l'équipe de Rhee sur les enzymes de mammifères. Cette méthode nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques de scSrx pour ses substrats, à savoir un K_M de $87 \pm 3 \mu\text{M}$ pour l'ATP (Figure 45 A page 60) et un K_M de $20 \pm 6 \mu\text{M}$ pour la PrxSO_2 (Figure 45 B page 60), et ainsi de définir les conditions de concentrations optimales pour la réaction (ATP 1 mM, MgCl_2 1 mM et PrxSO_2 80-100 μM).

Résultats I : activité réductase de Srx

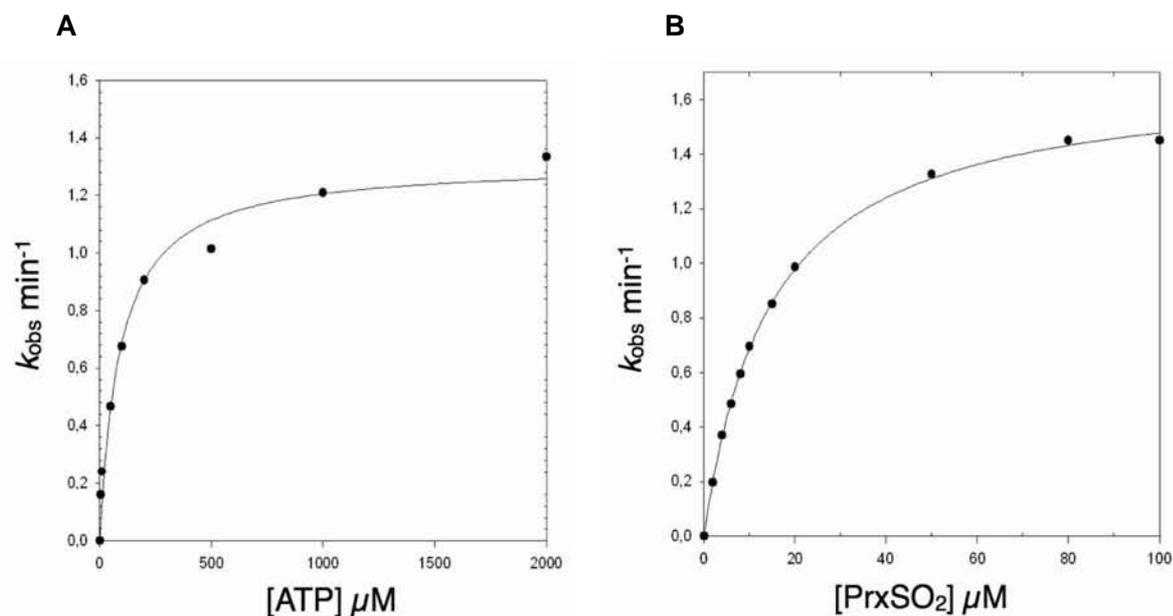


Figure 45 : Paramètres cinétiques à l'état stationnaire pour la scSrx vis-à-vis de l'ATP et de la PrxSO₂, avec Trx comme réducteur.

L'activité est mesurée à 30°C dans du tampon TK, avec comme réducteur la Trx de *E. coli* (ecTrx) couplée à la Trx réductase de *E. coli*, en suivant la consommation du NADPH à 340 nm. Les concentrations sont fixes en scSrx (10 μM), en MgCl₂ (1 mM), en Trx (50 μM), en Trx réductase (500 nM) et en NADPH (200 μM).

A : la concentration en PrxSO₂ est fixée à 100 μM et celle en ATP varie de 0 à 2000 μM .

B : la concentration en ATP est fixée à 1 mM et celle en PrxSO₂ varie de 0 à 100 μM .

Les résultats ont été analysés suivant le modèle classique de Michaelis-Menten. Un K_M de $87 \pm 3 \mu\text{M}$ pour l'ATP et un K_M de $20 \pm 6 \mu\text{M}$ pour PrxSO₂ ont été déterminés avec un k_{ss} de $1,7 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$.

B.2 Suivi cinétique de la libération de phosphate au cours de la réaction.

Pour suivre cinétiquement l'étape de réduction de l'acide sulfonique activé, nous avons mis au point un test d'activité qui permet de suivre la libération du Pi au cours de la réaction en temps réel. Le k_{ss} de la réaction étant de 2 min^{-1} et les étapes précédant la réduction étant potentiellement plus rapides, nous avons vérifié que ce système couplé pouvait mesurer des constantes de vitesse supérieures à 1 s^{-1} . Ce système repose sur la baisse de l'intensité du message de fluorescence de la 7-méthyl-guanosine (^{m7}Guo) après le clivage de la liaison ose-base par phosphorylation du ribose en position 1, catalysée par la purine nucléoside phosphorylase (PNP) qui utilise le phosphate inorganique comme substrat (Figure 46 page 61). L'analyse des cinétiques réactionnelles permet, outre la mesure des constantes de vitesse, de déterminer la concentration de phosphate inorganique libérée grâce à une gamme étalon signal de fluorescence vs concentration en Pi, établie indépendamment. Cette méthode a été validée sur la réaction à l'état stationnaire en présence de ecTrx, qui nous a permis de doser la totalité de PrxSO₂ présente dans le mélange réactionnel, avec un k_{ss} de $1,7 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ (publication 1, Figure 6 C page 76) similaire à celui mesuré avec le système couplé Trx/Trx réductase/NADPH.

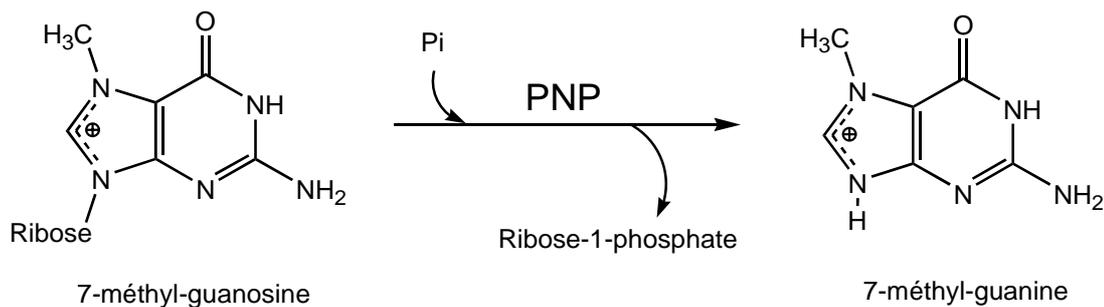


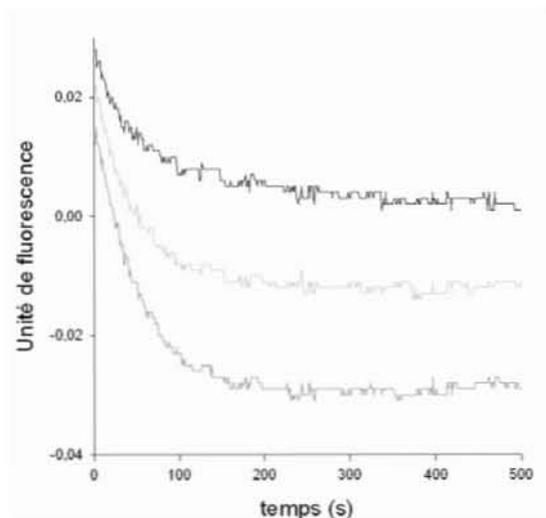
Figure 46 : Schéma du suivi de la libération de Pi au cours de la réaction par le système couplé PNP.

En absence de réducteur («single turnover»), la cinétique de la réaction est décrite par un signal exponentiel décroissant, caractérisé par un k_{obs} de $1,8 \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$ indépendant de la concentration en scSrx, similaire à ce qui est mesuré en présence de ecTrx. Par contre, l'amplitude du signal n'est ni nulle, ni supérieure ou égale à la concentration de PrxSO₂ présente dans le mélange réactionnel, mais dépend de la concentration de Srx (publication1, Figure 6 A page 76), avec une stœchiométrie de $0,96 \pm 0,16$ mole de phosphate libérée pour 1 mole de scSrx (publication 1, Figure 6 C page 76). Un comportement similaire a été obtenu pour la réaction de scSrx avec la C171A PrxSO₂. De même, pour différentes concentrations de C48A-C106A scSrx, nous mesurons des k_{obs} de $2,0 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ (Figure 47 A page 62), identiques à celui de la scSrx sauvage, avec une stœchiométrie de $1,3 \pm 0,2$ mole de phosphate libérée pour 1 mole de scSrx (Figure 47 B page 62).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par l'équipe de Rhee. En effet, nous constatons que la stœchiométrie de phosphate libéré est environ de 1:1 par rapport à la concentration de Srx. Ceci implique donc que Srx doit participer aux étapes chimiques conduisant à la libération de phosphate et être piégée sous forme covalente, soit sous forme d'un intermédiaire covalent entre Srx et Prx, soit sous une forme oxydée de Srx. En absence de réducteur ajouté, la forme oxydée de Srx ne serait donc pas recyclée.

Résultats I : activité réductase de Srx

A



B

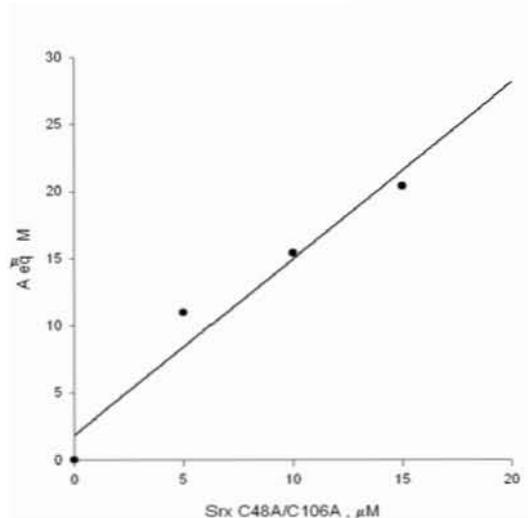


Figure 47 : Cinétique de libération de phosphate inorganique catalysée par scSrx C48A/C106A avec PrxSO₂ C171A.

L'activité est mesurée à 30°C dans du tampon TK, en suivant la libération de phosphate grâce au système couplé PNP/^{m7}Guo, à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les concentrations sont fixes en ATP (1 mM), en MgCl₂ (1 mM), en ^{m7}Guo (300 μM), en PNP (12,5 μM) et en PrxSO₂ WT (100 μM).

A : la concentration en scSrx sauvage est de 5, 10, 15 μM, en absence de réducteur.

B : représentation de la concentration de phosphate inorganique libéré en fonction de la concentration de C48A-C106A scSrx dans le mélange réactionnel.

B.3 Caractérisation de l'intermédiaire réactionnel thiosulfinate entre scSrx et Prx.

B.3.1 Mise en évidence d'un complexe covalent thiosulfinate entre scSrx et Prx.

Compte-tenu de ces résultats, nous avons cherché à caractériser l'intermédiaire non réduit correspondant à la forme bloquée de scSrx. Pour cela, les produits de la réaction catalysée par scSrx ont été séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions non réductrices et révélés par immunodétection avec des anticorps anti-scSrx et anti-HisTag (Prx est fusionnée à une étiquette HisTag) (publication 1, Figure 2 page 71). La nature chimique de ces produits, stockés en conditions acides afin de limiter la réactivité des thiols et de l'espèce thiosulfinate, a été ensuite analysée par spectrométrie de masse après séparation des différentes espèces par chromatographie en phase inverse (publication 1, Figure 3 page 72 et Table 1 page 73), en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (UMR 7178CNRS-ULP).

Les résultats obtenus avec les variants de scSrx et de Prx ne possédant que les Cys essentielles montrent un pic chromatographique contenant deux espèces, un complexe Srx/Prx lié par un pont disulfure (comme le prouve sa sensibilité au DTT) et un complexe de

masse + 16 Da par rapport à celle du complexe précédent (publication 1, Figure 4 page 74). Cette dernière espèce, également réduite par le DTT, pouvait être un complexe scSrx/Prx lié par un pont disulfure, et oxydé sur l'une ou l'autre des protéines (au niveau d'une Met par exemple), ou un complexe Srx/Prx lié par une liaison thiosulfinate. Une analyse plus poussée par digestion trypsique puis séquençage par MS-MS ont permis de confirmer la présence de la liaison S-S entre les Cys C84 de Srx et C_p de Prx. Par contre, aucun peptide contenant une fonction thiosulfinate entre ces résidus cystéines n'a pu être mis en évidence, probablement en raison de l'instabilité de cette liaison dans les conditions de digestion trypsique. Cependant, plusieurs arguments nous ont permis de conclure en faveur de l'hypothèse «thiosulfinate» : (i) la cinétique d'évolution des quantités relatives de ces deux espèces, montre la diminution de la surface du pic de l'espèce oxydée +16 concomitante à l'augmentation de la surface du pic de l'espèce oxydée pont disulfure, démontrant que l'espèce oxydée +16 n'est pas un produit d'oxydation de l'espèce oxydée pont disulfure (publication 1, Figure 4 page 74) ; (ii) la présence de produits de réactions secondaires comme le dimère de Srx lié par pont disulfure entre les Cys84, également caractérisé par digestion trypsique puis séquençage par MS-MS ne peut s'expliquer que par l'hydrolyse de l'espèce thiosulfinate accumulée, conduisant à une cascade de réactions secondaires non spécifiques (publication 1, Figure 5 page 75) ; en particulier l'attaque d'un résidu thiol de Srx sur l'espèce thiosulfinate est responsable de la libération de PrxSOH qui aboutit à la formation du complexe PrxS-SSrx observé ; (iii) de façon analogue, les produits de la réaction observés en présence de Srx sauvage impliquent nécessairement le passage par une telle espèce (publication 1, Figure 5 A page 75). Dans ce cas, la réactivité intramoléculaire de l'espèce thiosulfinate vis-à-vis d'une Cys non-catalytique de scSrx a été révélée par la formation d'une forme monomérique oxydée de Srx observée par spectrométrie de masse et sur gel ; (iv) les produits d'évolution de l'espèce thiosulfinate purifiée, ont été suivis à pH neutre par chromatographie en phase inverse avec le même programme d'élution qui a permis de séparer les produits de la réaction. Trois zones d'élution avaient ainsi été définies, pour les espèces contenant Srx (zone 1), Prx (zone 3) et les complexes Srx/Prx (zone 2) (publication 1, Figure 3 page 72). Les produits issus de l'évolution du thiosulfinate (Figure 48 page 64) peuvent ainsi être attribués aux espèces scSrx libre et dimérique, aux complexes scSrx/Prx pont disulfure et/ou thiosulfinate, et à des espèces de Prx (publication 1, Figure 5 B page 75). Cette expérience a ainsi permis de montrer que, en solution à pH neutre, l'espèce thiosulfinate est particulièrement réactive et conduit aux mêmes espèces secondaires que celles observées au cours de la réaction enzymatique.

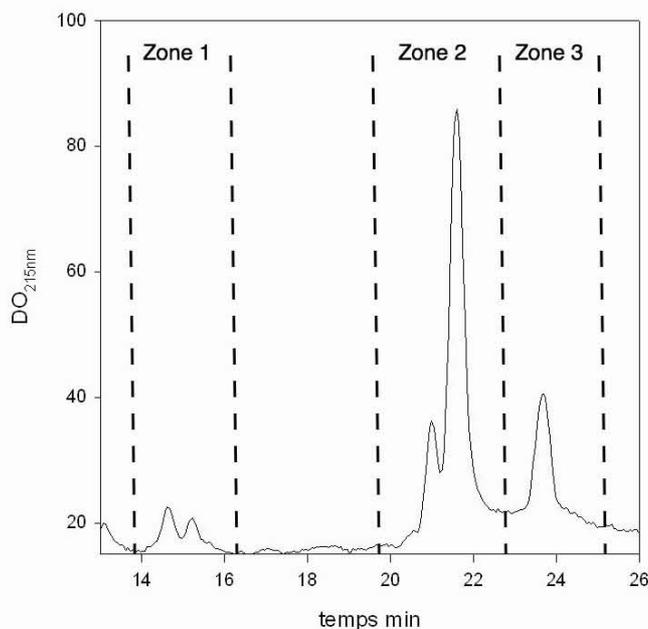


Figure 48 : Chromatogramme de la séparation des produits issu de l'évolution de l'intermédiaire thiosulfinate scSrx/Prx.

L'intermédiaire thiosulfinate est purifié par chromatographie en phase inverse sur C8. Le pH de la solution, acide après purification de l'espèce, est ajusté à 7. La solution est incubée à 37°C pendant 2 heures. La solution est ensuite analysée par chromatographie en phase inverse sur C8, suivant un gradient d'acétonitrile de 0 à 80% contre un tampon eau/TFA à 0,1%.

B.3.2 Compétence catalytique de l'intermédiaire thiosulfinate.

Nous avons donc montré la formation d'un complexe entre scSrx et Prx lié par une liaison thiosulfinate. Ce complexe est formé suite à l'attaque de la Cys catalytique de scSrx sur l'acide sulfinique activé de la C_p de Prx. Cependant, cette réaction pouvait également représenter une réaction secondaire non spécifique due à l'accumulation de l'espèce $PrxSO_2$ activée. Pour que le complexe thiosulfinate entre Srx et Prx puisse être qualifié d'intermédiaire catalytique, il faut que la constante cinétique de formation de cette espèce soit au moins égale à la constante de vitesse de la réaction à l'état stationnaire ($k_{ss} \sim 2 \text{ min}^{-1}$).

Pour démontrer cette compétence catalytique, nous avons suivi la formation du thiosulfinate au cours du temps. Sachant que la formation du complexe scSrx/Prx lié par un pont disulfure est un produit secondaire lié à la réactivité du complexe thiosulfinate, nous avons mesuré au cours du temps l'aire du pic de chromatographie correspondant aux complexes Prx/Srx (publication 1, Figure 7 page 76). La constante de vitesse k_{obs} de formation du thiosulfinate ainsi mesurée est de $1,2 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$, soit du même ordre de grandeur que celle mesurée avec le système couplé PNP/ m^7 Guo et que celle mesurée à l'état stationnaire en présence de réducteur k_{ss} . Ceci montre donc que le complexe thiosulfinate Srx/Prx est formé avec la même constante de vitesse que celle de la réduction globale de

PrxSO₂ par scSrx en présence de réducteur. Donc, ce complexe doit être un intermédiaire catalytique de la réaction.

C. Conclusion.

Nos travaux démontrant la formation d'un intermédiaire catalytiquement compétent de type thiosulfinate entre Srx et Prx, et donc une activité réductase de Srx, ont été confirmés par les travaux de Jönsson *et al.* sur la Srx humaine publiés à la suite de nos travaux sous forme d'une publication accélérée (Jönsson *et al.*, 2008c). Par une approche de cinétique rapide couplée en ligne à la spectrométrie de masse, ces auteurs ont caractérisé les deux mêmes espèces que celles que nous avons observées, correspondant à un complexe entre hSrx et hPrx lié par un pont disulfure et à un complexe équivalent de masse augmentée de +16. La liaison thiosulfinate a été révélée par l'utilisation de hPrx marquée à l'¹⁸O. A partir des intensités relatives des spectres de masses, Jönsson *et al.* ont déterminé une constante de vitesse de formation de l'intermédiaire thiosulfinate de 1,4 min⁻¹ du même ordre que ce que nous avons mesurée pour scSrx. Ces résultats confirment bien que Srx porte une activité réductase. En outre, ils ont montré qu'en présence de GSH, il n'y a pas de formation de complexe thiosulfinate entre Prx et GSH, infirmant l'hypothèse de l'équipe de Rhee proposant une attaque directe du GSH sur le substrat phosphorylé. Enfin, la modélisation du complexe hSrx et hPrxSO₂ suggère que la Cys catalytique de Srx est proche de l'acide sulfonique activé, en position pour attaquer le soufre du substrat (Figure 49 page 66) (Jönsson *et al.*, 2008b) et conduire à l'intermédiaire thiosulfinate.

La formation d'un intermédiaire thiosulfinate catalytiquement compétent entre Srx et Prx, posait la question du mécanisme de recyclage de la Srx et de la libération de la Prx sous forme d'acide sulfénique. Cette question fait l'objet de la deuxième partie des Résultats.

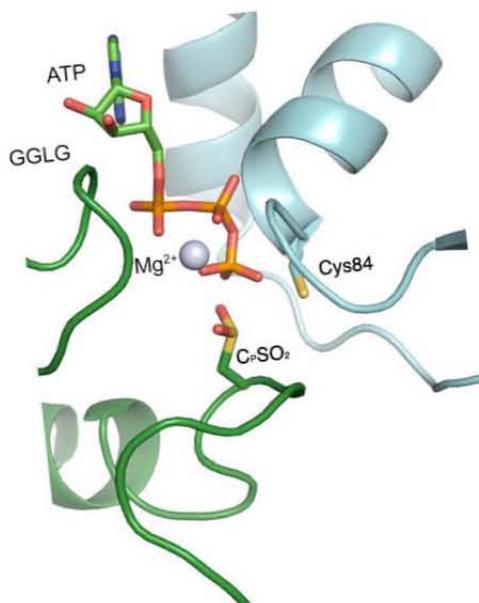


Figure 49 : Modèle du complexe ternaire hSrx/hPrxSO₂/ATP (Jönsson *et al.*, 2008b)

Les éléments de structures en rubans de Prx sont représentés en vert, ceux de Srx en bleu. La Cys catalytique de Srx (Cys84), la C_pSO₂ de Prx et l'ATP sont représentées en stick.

D. Publication 1.

X. ROUSSEL, G. BECHADE, A. KRIZNIK, A. VAN DORSSELAER, S. SANGLIER-CIANFERANI, G. BRANLANT et S. RAHUEL-CLERMONT. (2008) Evidence for the formation of a covalent thiosulfinate intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.*, 283, 22371-22382.

Pages 67 à 83.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M800493200/DC1>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 283, NO. 33, PP. 22371–22382, AUGUST 15, 2008
© 2008 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

Evidence for the Formation of a Covalent Thiosulfinate Intermediate with Peroxiredoxin in the Catalytic Mechanism of Sulfiredoxin*[§]

Received for publication, January 18, 2008, and in revised form, May 28, 2008. Published, JBC Papers in Press, June 14, 2008, DOI 10.1074/jbc.M800493200

Xavier Roussel^{†1}, Guillaume Béchade^{§1}, Alexandre Kriznik[‡], Alain Van Dorsselaer[§], Sarah Sanglier-Cianferani[§], Guy Branlant^{†2}, and Sophie Rahuel-Clermont^{‡3}From the [†]Unité Mixte de Recherche, CNRS-UHP 7567, Maturation des Acide Ribonucléique et Enzymologie Moléculaire, Nancy Université, Faculté des Sciences, Bld. des Aiguillettes, BP 239, Vandoeuvre-lès-Nancy 54506, France and the [§]Unité Mixte de Recherche, CNRS-ULP 7178, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Département Sciences Analytiques, Ecole de Chimie, Polymères et Matériaux, 25, rue Becquerel, Strasbourg 67087, France

The typical 2-Cys peroxiredoxins are thiol-peroxidases involved in the physiology of hydrogen peroxide not only as a toxic but also as a signaling molecule. Coordination of these functions depends on the sulfinylation of the catalytic Cys, a modification reversed by ATP-dependent sulfiredoxin, which specifically reduces the sulfenic acid group of overoxidized 2-Cys peroxiredoxins into a sulfenic acid. Sulfiredoxin was originally proposed to operate by covalent catalysis, with formation of a peroxiredoxin-sulfiredoxin intermediate linked by a thiosulfinate bond between the catalytic Cys of both partners, a hypothesis rejected by a study of the human enzyme. To settle the argument, we investigated the catalytic mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* sulfiredoxin, by the characterization of the nature and kinetics of formation of the protein species formed between sulfiredoxin and its substrate in the presence of ATP, using mutants of the non-essential Cys residues of both proteins. We observed the formation of a dithiothreitol-reducible peroxiredoxin-sulfiredoxin species using SDS-PAGE and Western blot analysis, and its mass was shown to correspond to a thiosulfinate complex by high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography. We next measured indirectly and directly a rate constant of formation of the thiosulfinate species of $\sim 2 \text{ min}^{-1}$, for both wild-type and mutant sulfiredoxins, at least equal to the steady-state rate constant of the reaction, with a stoichiometry of 1:1 relative to peroxiredoxin. Taken altogether, our results strongly argue in favor of the formation of a covalent thiosulfinate peroxiredoxin-sulfiredoxin species as an intermediate on the catalytic pathway.

Reactive oxygen species, including hydrogen peroxide originating both from exogen and endogen sources, are compounds

deeply involved in cellular physiology. They can result in either toxic or beneficial effects through chemical modification of cellular components. Sulfinylation of a protein cysteine thiol was considered to be a biologically irreversible event *in vivo* until the discovery of new enzymatic sulfinyl reductase activities referred to as sulfiredoxin (Srx)⁴ (1) and sestrins (2), capable of reducing a sulfenic acid group $-\text{SO}_2\text{H}$ (sulfur oxidation number + II) into a sulfenic acid $-\text{SOH}$ (oxidation number 0). The strong interest toward the elucidation of the molecular and structural enzymology of these enzymes lies in their potential regulatory functions affecting the bipolar nature of H_2O_2 as a toxic and a carcinogen, and as a signaling molecule (3–5).

In these mechanisms specific to eukaryotic organisms, a family of thiol-peroxidases susceptible to Cys sulfinylation, the peroxiredoxins (Prx), plays a central role and constitutes the specific substrate of Srx and sestrins (2, 6). Typical 2-Cys Prx (2-Cys-Prx) represents a class of peroxidase distinct from catalase and glutathione peroxidase, the functional unit of which is structured as a symmetrical homodimer. Typical 2-Cys-Prxs reduce H_2O_2 by oxidation of the N-terminal catalytic Cys (C_p) to a sulfenic acid intermediate, then recycled by disulfide formation with a regenerating Cys (C_r) located on the symmetrical subunit, finally coupled to reduction by thioredoxin. Furthermore, Prxs have been proposed to participate in the transduction and regulation of H_2O_2 -mediated cell signaling (7).

The modulation of Prx activity by post-translational modification adds another layer to the potential regulations of H_2O_2 effects in eukaryotic cells. The Prx peroxidase activity is inhibited by Thr phosphorylation (8). In addition, eukaryotic 2-Cys-Prxs have been described to be susceptible to the oxidation of the catalytic Cys to a higher level, the sulfenic acid state, during the catalytic cycle, by a mechanism of escape of the reactive sulfenic acid intermediate (9). This overoxidation of 2-Cys-Prx, also observed *in vivo*, not only abolishes peroxidase activity but

* This work was supported in part by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, and by the French Agence Nationale de la Recherche (Program ANR-06-BLAN-0369). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental text and Figs. S1–S5.

[†] Supported by the French Research Ministry.

[‡] To whom correspondence may be addressed. Tel: 33-3-83-68-43-04; Fax: 33-3-83-68-43-07; E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel: 33-3-83-68-43-12; Fax: 33-3-83-68-43-07; E-mail: sophie.rahuel@maem.uhp-nancy.fr.

⁴ The abbreviations used are: Srx, sulfiredoxin; Prx, peroxiredoxin; 2-Cys-Prx, two-cysteine peroxiredoxin; C_p , 2-Cys-Prx catalytic Cys; C_r , 2-Cys-Prx regeneration Cys; DTT, 1,4-dithiothreitol; IAM, iodoacetamide; LC-MS, reversed-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry; ^{m7}Guo, methyl-7-guanosine; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; NTR, *E. coli* NADPH thioredoxin reductase; PNP, His-tagged purine nucleoside phosphorylase from *E. coli*; PrxSO₂, overoxidized *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1; Trx, *E. coli* thioredoxin 1; FWHM, full width at half-maximum.

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

also stabilizes high molecular weight forms of Prx, which show chaperone-like activities. Therefore, sulfanyl reductase activities can potentially regulate several aspects of H₂O₂ physiology involving Prx in eukaryotes, by restoring the native state of 2-Cys-Prx: 1) in the "floodgate" theory (9), sulfinylation/sulfanyl reduction would be associated with the requirement of temporary and/or local inactivation of Prx peroxidase activity to allow the transmission of H₂O₂-mediated signal; 2) as proven in *Schizosaccharomyces pombe*, Prx overoxidation and its reversion by Srx constitute a redox switch between two signal transduction paths dependent on H₂O₂ concentration (10); and 3) in view of the recently reported chaperone activity induced by overoxidation, sulfanyl reductase would also regulate a switch between oxidative stress conditions, with overoxidized 2-Cys-Prx acting as a cellular protector, and H₂O₂ signaling conditions, with native reduced 2-Cys-Prx acting as redox sensor for example (11). In addition, a new regulator function for human Srx has been proposed, by catalysis of the deglutathionylation of several distinct proteins in response to oxidative stress (12). In support of the role of Srx as part of cellular redox regulation and signaling systems, several studies have shown that expression of Srx is induced under oxidation stress conditions, including yeasts, plants, and mammals (1, 13–15).

Srxs are small proteins of 13–18 kDa generally with a basic character, identified in the genome of some eukaryotes (in plant and algae, metazoans, and fungi) and some cyanobacteria species. They catalyze the ATP-dependent reduction of the overoxidized catalytic Cys C_p (as sulfinic acid) of typical 2-Cys-Prx, with substrate specificity exclusive of other Prx classes or of other proteins possessing a Cys sensitive to overoxidation (e.g. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (6). The Srx activities described so far for mammalian enzymes are slow, with turnover numbers of 0.2–0.5 min⁻¹ (16, 17).

The Srx activity was initially described by Biteau *et al.* (1), on the *Saccharomyces cerevisiae* enzyme, who proposed a catalytic mechanism in which Srx acted first as an ATP-dependent phosphotransferase to activate the sulfinic group of the Prx substrate as a phosphoryl sulfinic intermediate, leading to the release of ADP. In a second step, Srx would act as a reductase through the formation of a PrxSO-SSrx thiosulfinate intermediate involving Srx essential Cys (Cys-99 in mammalian enzymes, Cys-84 in *S. cerevisiae* enzyme), a phosphate group being thus released in this step (Fig. 1A). This intermediate would be reduced by thioredoxin or by another thiol reductant, leading to the release of the Prx reduced in the sulfenic acid state and of a mixed disulfide thioredoxin-Srx, followed by recycling of Srx to the reduced form and release of oxidized thioredoxin. In 2006, an alternative mechanism based on a kinetic study of the human enzyme reaction and infirming the reductase role of Srx was supported. In this mechanism, the Prx phosphoryl sulfinic intermediate is directly reduced by a thiol reducter distinct from Srx (17) (Fig. 1B).

In the present report, we examined the catalytic mechanism of *S. cerevisiae* Srx. First, we characterized the protein species formed between Srx and its overoxidized 2-Cys-Prx substrate in the absence of added reducer by the use of SDS-PAGE, Western blot, and mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Second, to validate the formation of these species as part

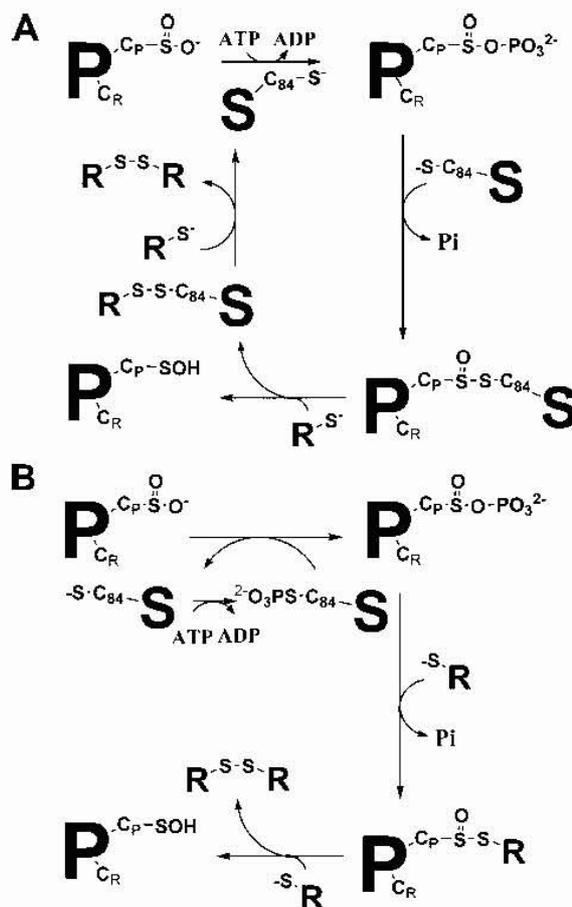


FIGURE 1. Srx hypothetical catalytic mechanisms. In hypothesis A, Srx catalyzes both the phosphotransferase and the reductase steps by reductive attack of the catalytic Cys on the phosphorylated substrate, leading to a covalent thiosulfinate intermediate with Srx. Subsequent reduction is achieved by an external reducter. In hypothesis B, Srx only catalyzes the reductase step by a phosphorylated Srx intermediate. All subsequent reduction steps depend on an external reducter. No covalent intermediate is formed between Srx and the Prx substrate. P, Prx; S, Srx; C_p, peroxidatic Cys; C_R, regeneration Cys; C₈₄, Srx catalytic Cys; R, thiol reducter distinct from Srx.

of the catalytic mechanism, we then designed kinetic approaches aimed at monitoring the kinetics and stoichiometry of the putative steps. To avoid secondary reactions, we used mutants of the non-essential Cys residues of both Srx and the overoxidized Prx. Altogether, our results favor the formation of a covalent thiosulfinate Prx-Srx species as an intermediate of Srx catalytic pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Tris was from VWR (West Chester, PA). KCl and MgCl₂ were from Merck (Darmstadt, Germany), NADPH was obtained from Roche (Basel, Switzerland), and dithiothreitol (DTT) and ammonium sulfate were from Euromedex (Souffleweyersheim, France). ATP, MES, iodoacetamide (IAM), ammonium hydrogen carbonate, and horse heart myoglobin were from Sigma-Aldrich, and phosphoric acid and H₂O₂ were from Acros Organics (Geel, Belgium). Rabbit antiserum specific for purified *S. cerevisiae* Srx was produced by Centre Lago (Vonnas, France). Mouse antiserum specific for His tag was

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on January 8, 2009

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

from Qiagen (Hilden, Germany), and secondary antisera were obtained from Pierce. Trifluoroacetic, formic acids, and m^7 guanosine (m^7 Guo) were from Fluka. Acetonitrile was obtained from Carlo Erba Reactifs SDS (Val de Reuil, France).

Thioredoxin 1 (Trx) and NADPH thioredoxin reductase (NTR) from *Escherichia coli* were prepared following experimental procedures described previously (18, 19). Purine nucleoside phosphorylase from *E. coli* was expressed from a plasmid derived from pET28b(+) encoding the N-terminal His tag fusion protein of the enzyme (referred to as PNP), obtained by cloning the *deoD* open reading frame amplified by PCR using *E. coli* K12 genomic DNA as template between the NdeI and SacI sites (oligonucleotides not shown). The PNP was produced and purified according to the same procedures as the His-tagged *S. cerevisiae* Prx (see below), and stored as a lyophilizate at -20°C .

Plasmid Constructions and Preparation of Recombinant *S. cerevisiae* Srx and Prx Proteins—The plasmid pET20bSrx Σ encoding the *S. cerevisiae* Srx protein was obtained by subcloning the synthetic *srx Σ open reading frame optimized for expression in *E. coli* (GeneArt AG, Regensburg, Germany), into the pET20b(+) plasmid (Novagen, Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) between the NdeI and SacI sites. The plasmid pET28bHTTsaI encoding the N-terminal His tag fusion protein of *S. cerevisiae* 2-Cys-Prx Tsal (referred to as Prx in the following text) was obtained by cloning the *tsaI* open reading frame amplified by PCR (GC-rich system, Roche Applied Science, Basel, Switzerland) using *S. cerevisiae* W303 genomic DNA as template, into the pET28b(+) plasmid between the NdeI and SacI sites. The forward primer contained an NdeI restriction site, and the reverse primer contained an SacI restriction site (sequences of oligonucleotides not shown). The mutant proteins C48A-C106A Srx and C171A Prx were generated by standard PCR site-directed mutagenesis. *E. coli* C41(DE3) [F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)] (20) transformants containing the wild-type or mutant pET20bSrx Σ were grown at 37°C for 24 h and 30 h, respectively, in the autoinducible media ZYM-5052 or N-5052 (21), respectively, supplemented with ampicillin (200 mg l^{-1}). Wild-type and mutant Prxs were overexpressed in the same strain transformed by the pET28bHTTsaI plasmid, by overnight culture at 37°C in the ZYM-5052 medium supplemented with kanamycin (200 mg l^{-1}).*

For Srx purification, cells were harvested by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer A (100 mM MES pH 6.1) containing 20 mM DTT, and disrupted by sonication. Srx contained in the soluble fraction of the cellular extract was then precipitated by ammonium sulfate at 55% saturation, followed by cation exchange chromatography on a sulfopropyl-Sepharose column connected to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A. Srx was eluted by a 0–1 M KCl linear gradient with a step at 350 mM. Final purification of Srx was achieved by hydrophobic chromatography on a phenyl-Sepharose column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A plus 1 M ammonium sulfate, eluted with a linear 1 to 0 M ammonium sulfate gradient. For Prx purification, cells were harvested by centrifugation, resuspended in a minimal volume of buffer B (20 mM K_2HPO_4 ,

1 M KCl, pH 7.5) containing 20 mM DTT and disrupted by sonication. Prx contained in the soluble fraction was purified on nickel-Sepharose column equilibrated with buffer B plus 50 mM imidazole, connected to a fast protein liquid chromatography system, and eluted by a 0.5 M imidazole step.

At this stage, wild-type and mutant proteins were pure as checked by electrophoresis on 15% SDS-polyacrylamide gel followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and by electrospray mass spectrometry analyses. Purified Srx and Prx were stored at -20°C in the presence of 20 mM DTT, and 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 15% glycerol, respectively, and were stable for several weeks under these conditions. Immediately before use, both proteins were incubated with 50 mM DTT at 4°C , followed by desalting or oxidation reaction. Protein molar concentrations were determined spectrophotometrically, using extinction coefficients at 280 nm determined experimentally, of $7280\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for wild-type and mutant Srxs, and of $29500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for wild-type and mutant Prxs. Prx enzymatic activity was measured by a coupled assay using the Trx recycling system (0.5 μM NTR, 200 μM NADPH, 50 μM Trx), with 100 μM H_2O_2 as substrate. Initial rate measurements were carried out at 30°C in buffer TK (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7.0) on a UV mc2 spectrophotometer (Safas, Monaco) by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. A steady-state rate constant of 2 s^{-1} was measured in these conditions.

Preparation of Overoxidized Prx—Oxidation of Cys C_p of both wild-type and C171A Prxs was achieved in TK buffer at 30°C , by incubation of 500 μM Prx with 5 mM H_2O_2 in the presence of 100 mM DTT, followed by two additions of 5 mM H_2O_2 at 10-min intervals. The oxidized protein (PrxSO₂) was then desalted through an Econo-Pac 10 DG column (Bio-Rad) equilibrated with buffer TK. The sulfinic oxidation state of Cys C_p was checked by titration of the protein with 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzoate under denaturing conditions (1% SDS), by following the loss of Prx enzymatic activity and by electrospray mass spectrometry analysis. PrxSO₂ molar concentration was determined spectrophotometrically, using extinction coefficients at 280 nm determined experimentally of $27500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for the wild-type and mutant proteins.

Kinetics of Srx Reaction under Steady-state Conditions—The reaction was followed in the steady state using Trx as reducer and the Trx recycling system as a coupled assay (50 μM Trx, 0.5 μM NTR, and 200 μM NADPH), in the presence of 1 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , 100 μM PrxSO₂, and variable concentrations of Srx. Initial rate measurements were carried out at 30°C in buffer TK on a Safas UV mc2 spectrophotometer by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH. A blank measurement recorded in the absence of Srx was systematically deduced from the assay to account for the nonspecific oxidation of NTR. When wild-type PrxSO₂ was used as substrate, a stoichiometry of 2 mol of NADPH per mol of PrxSO₂ was used in rate calculations to account for the oxidation of 1 mol of Trx per mol PrxSO₂ in Prx own catalytic cycle, following the reduction of Cys C_p to the sulfenic acid state.

SDS-PAGE and Immunoblot Analysis—Reaction mixtures containing 30 μM Srx and 30 μM PrxSO₂, 1 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , were incubated in buffer TK for 30 s, 1 min, and 2 min at

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

30 °C. DTT was added to 50 mM in an additional sample incubated for 2 min. All reactions were then treated by 250 mM IAM, and the proteins were immediately loaded onto 15% SDS-PAGE gel in non-reducing conditions, followed by Coomassie Blue staining. The proteins separated on two additional identical gels run in parallel were transferred on nitrocellulose membranes for revelation with antibodies against Srx or His tag. Immune complexes were detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagents (Pierce).

PNP-coupled Assay—The kinetics of P_i release were followed by the decrease of the emission fluorescence intensity associated with the phosphorylation of ^{m7}Guo catalyzed by PNP as a coupled assay (22). Time courses were recorded at 30 °C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics, Leatherhead, UK) fitted for fluorescence measurements, with the excitation wavelength set at 305 nm, and the emitted light was collected above 455 nm using a cutoff filter. One syringe contained 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 300 μM ^{m7}Guo, 5 μM PNP in buffer TK, and the other contained 100 μM PrxSO₂, 20 μM PNP, variable concentration of Srx in the presence or absence of 300 μM Trx (final concentrations after mixing). For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and deduced from the corresponding experience in the presence of Srx. An average of three runs was recorded for each set of conditions. Under single turnover conditions (in the absence of Trx), the rate constant *k*_{obs} was obtained by fitting fluorescence traces after blank deduction against Equation 1, in which *c* represents the end point and *a* is the amplitude of the fluorescence decrease.

$$y = ae^{-k_{obs}t} + c \quad (\text{Eq. 1})$$

The steady-state rate constant was obtained by measurement of initial rate in the presence of Trx. The fluorescence signal was calibrated against P_i concentration to allow determination of the stoichiometry of P_i released during Srx reaction.

Kinetics of Formation of the Prx-Srx Complexes followed by Reverse Phase Chromatography—Reaction mixtures containing 20 μM C48A-C106A Srx and 100 μM C171A PrxSO₂, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂ were incubated in the TK buffer at 30 °C. Aliquots were quenched by using trifluoroacetic acid, 0.1%, and analyzed by reversed-phase liquid chromatography on an Aquapore RP-300 (C8) column, 4.6 × 100 mm, 7 μm (PerkinElmer Life Sciences), coupled to the ÄKTAexplorer system (Amersham Biosciences), using the same gradient as described below for LC-MS.

Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: Sample Preparation—Reaction mixtures containing 30 μM Srx (C48A-C106A double mutant/wild-type Srx) and 30 μM PrxSO₂ (C171A/wild-type PrxSO₂), 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂ were incubated in buffer TK for 30 s, 2 min, and 10 min at 30 °C. Reactions were then treated by 25 mM IAM. Finally, samples were diluted 2.5 times and were analyzed by reversed-phase LC-MS immediately to cope with thiosulfinate instability and to prevent secondary reactions.

LC-MS Analyses—MicroLC-MS analyses were performed on a Hewlett Packard 1100 Series Analytic LC system coupled with a MicroTOF-Q Mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bre-

men, Germany). An aliquot of 50 μl of each sample was loaded immediately after preparation onto a Vydac 208TP52 (C8) column, 2.1 × 250 mm, 5 μm. Proteins were eluted from the column using a linear gradient from 30 to 60% of B in 30 min and from 60 to 80% of solvent B in 1 min with A:H₂O plus 0.1% trifluoroacetic acid (v/v) and B:acetonitrile plus 0.08% trifluoroacetic acid (v/v) at a flow rate of 250 μl min⁻¹. The column was then flushed with 80% of solvent B during 5 min.

The capillary and end plate voltage of the mass spectrometer were set to -4500 V and -500 V, respectively. The complete system was fully controlled by HyStar and microTOFControl software (Bruker Daltonics). For the measurements, external calibration was performed with a horse heart myoglobin solution at 0.2 pmol μl⁻¹ in a water/acetonitrile mixture (1:1, v/v) acidified with 1% (v/v) formic acid. The MS acquisition range was set between *m/z* 500 and 3000, and three scans were averaged to obtain MS spectra. Collected data were treated using DataAnalysis software (Bruker Daltonics). For all spectra, the baseline was subtracted before they were smoothed once using the Savitsky-Golay algorithm with a smoothing width of 0.2 *m/z*. Deconvoluted mass spectra were performed using the Maximum Entropy Charge Deconvolution module (Bruker Daltonics). Ratios of thiosulfinate and disulfide intermediates were estimated from peak heights of the deconvoluted mass spectra.

High Resolution MS Analysis—To achieve the required resolution to discriminate co-eluting Prx-Srx thiosulfinate and disulfide complexes (mass difference of 16 Da), a fine tuning of the mass spectrometer was performed to get a minimal theoretical mean mass resolution (full width at half-maximum (FWHM)) of 2,350 at 37 kDa. Preliminary experiments performed in the “focus mode” with tuning mix solution (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), aiming at maximizing resolution around *m/z* 1000, allowed to reach a mean resolution (FWHM) of 18,000 for a 15-kDa protein. This optimization subsequently led to a resolution (FWHM) of 2,800 for a 37-kDa protein complex.

Control Experiments—Prior to each reaction monitoring, a control experiment, in the same conditions as those described above but without ATP addition, was performed (see Fig. 3). Mass assignments were performed after LC-MS analysis. The following molecular masses were measured: (i) peak 1': wild-type Srx plus 2 IAM (13,836.9 ± 0.1 Da); (ii) peak 2': wild-type PrxSO₂ plus IAM (23,711.4 ± 0.1 Da), wild-type PrxSOH plus IAM (23,694.6 ± 0.6 Da), wild-type PrxSO₂ (23,654.3 ± 0.3 Da) and wild-type PrxSO₃ (23,726.4 ± Da); (iii) peak 3': wild-type Srx plus 2 IAM (13,835.8 ± 0.1 Da) and wild-type Srx plus IAM (13,778.8 ± 0.2 Da); (iv) peak 5': C171A PrxSO₂ (23,620.1 ± 0.3), C171A PrxSOH (23,603.1 ± 0.5 Da) and C171A PrxSO₃ (23,635.5 ± 0.5 Da); (v) peak 7': C48A/C106A Srx plus IAM (13,715.17 ± 0.4 Da); and (vi) peak 9': C171A PrxSO₂ (23,621.0 ± 0.6 Da), C171A PrxSOH (23,604.1 ± 0.5 Da), and C171A PrxSO₃ (23,636.6 ± 0.6 Da).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of Prx-Srx Species Formed in the Absence of Added Reducer—Mechanistic studies on Srxs have been reported for *S. cerevisiae* and mammalian enzymes, including searching for covalent intermediates between overoxidized Prx

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

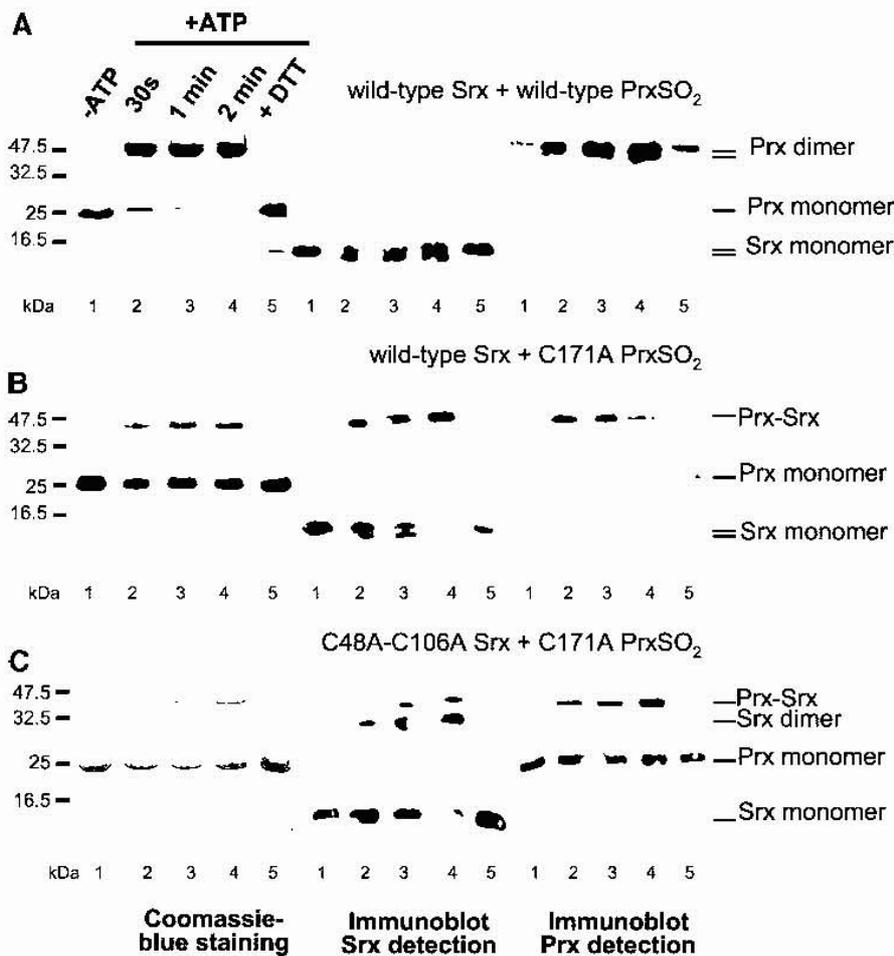


FIGURE 2. Non-reducing SDS-PAGE and immunoblot analysis of the species formed for the reaction catalyzed by Srx in the absence of added reducer. Equimolar concentrations (30 μ M) of Srx and PrxSO₂ were mixed in the absence (lane 1) or presence of 1 mM ATP-MgCl₂ for the indicated times (lanes 2–4), and for 2 min followed by the addition of 50 mM DTT (lane 5), immediately followed by addition of 25 mM IAM and non-reducing SDS-PAGE fractionation. Reactions were carried out in TK buffer at 30°C. Three identical SDS-PAGE gels were run in parallel for Coomassie Blue staining (left panel) or immunoblot revelation against Srx (middle panel) and His tag (right panel) specific antisera. A, wild-type PrxSO₂ and wild-type Srx; bands corresponding to monomeric Prx in the immunoblot are very faint due to the relative amounts and sensitivity to His tag antisera of both species; B, C171A PrxSO₂ and wild-type Srx; C, C171A PrxSO₂ and C48A-C106A Srx.

substrate and Srx enzyme. Studies on *S. cerevisiae* cells subjected to H₂O₂ stress identified a Cys-84-dependent (Prx)₂-Srx species with DTT-sensitive linkage in cellular extracts which, although not fully chemically characterized, led to the suggestion that Srx catalytic Cys could be involved in the formation of a Prx-Srx thiosulfinate intermediate species (1). On the contrary, no thiosulfinate species could be detected after *in vitro* reaction of human overoxidized Prx1 and human Srx in the presence of ATP, followed by Western blot and mass spectrometry analyses (17). We therefore tackled the *in vitro* study of the reaction products of *S. cerevisiae* Srx with the His-tagged overoxidized peroxiredoxin Tsa1 (referred to as PrxSO₂), shown to interact with Srx *in vivo* (1), in non-reducing conditions to allow the accumulation of intermediate species.

The potential reactivity and instability of the thiosulfinate bond have already been studied on model compounds. In particular, it is known that thiosulfinate reacts readily with thiols,

which are described to attack preferentially on the sulfenic sulfur (-S-) rather than on the sulfinic sulfur (-SO-) of the thiosulfinate bond, giving off a disulfide product and a sulfenic acid product (23, 24). Therefore, we set up experimental conditions aiming at reducing secondary reactions on this putative intermediate. First, the potential secondary reactions of free thiol groups of Srx and Prx with intermediate species in the absence of reducer were avoided during the subsequent analysis steps by carbamidomethylation with IAM, which alkylates the remaining free thiol groups, immediately followed by non-reducing SDS-PAGE or LC-MS. Second, because free thiols of Srx and PrxSO₂ could lead to secondary reactions also during the time course of experiments, assays were carried out both on wild-type and C48A-C106A double mutant Srx and both on wild-type and C171A PrxSO₂. Indeed, *S. cerevisiae* Srx contains two non-conserved Cys in positions 48 and 106 in addition to the catalytic Cys-84, for which substitutions were described to have minor effects on the reaction *in vivo* (1). Using the C171A mutant PrxSO₂, which lacks the regeneration Cys C_R, as a substrate for Srx, gave a similar steady-state rate constant as wild-type PrxSO₂ (1.7 ± 0.4 min⁻¹ versus 1.9 ± 0.4 min⁻¹) in the presence of Trx as reducer by the Trx/NTR assay. This suggests that this residue was not

involved in Srx catalytic mechanism, as observed for the human enzyme (17).

The products of the reaction between wild-type Srx and wild-type or C171A PrxSO₂ and between C48A-C106A Srx and C171A PrxSO₂ in non-reducing conditions were analyzed by SDS-PAGE and Western blots against Srx and His tag antisera, after 30-s, 1-min, and 2-min incubations (Fig. 2). For the wild-type proteins, in the presence of ATP/MgCl₂, two major species migrating at ~47 kDa were formed at the expense of the one corresponding to monomeric Prx (23.6 kDa) and were sensitive to DTT (Fig. 2A). Immunoblots revealed that these species comprised only the Prx protein, suggesting that dimeric, DTT-reducible Prx species were formed. Srx was found almost exclusively as a monomeric species (13.7 kDa), although it migrated slightly higher than expected with regard to its molecular weight, probably due to its basic character (theoretical pI of 9.2). In addition, two bands with migration similar to mono-

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

meric Srx were observed in the presence of ATP, suggesting that a significant fraction of the Srx population migrated slightly faster, resulting in the apparent doubling of this band into two bands. Addition of DTT after 2-min incubation restored the population of Srx migrating as observed before ATP addition, suggesting that the band migrating slightly faster corresponded to an oxidized Srx monomer with an intramolecular disulfide bond. When C171A PrxSO₂ was used as the substrate with wild-type Srx (Fig. 2B), a major DTT-sensitive species migrating at ~45 kDa appeared in the presence of ATP, corresponding to a Prx-Srx species, as revealed by immunoblotting. Again, likely due to Srx basic character, this species migrated significantly higher than expected for a molecular mass of 37.6 kDa. Division of the Srx band into two was also suggested by Coomassie staining and confirmed by immunoblotting against Srx antisera. Similar to the experiment with wild-type PrxSO₂, this phenomenon was reversed by DTT treatment. However, no apparent doubling of the monomeric Srx band occurred for the C48A-C106A mutant of Srx incubated with the C171A substrate (Fig. 2C), thus supporting the formation of an oxidized Srx monomer with an intramolecular disulfide bond in the case of wild-type Srx. Instead, a new species migrating at ~32 kDa appeared that comprised only Srx, thus indicating the formation of dimeric Srx, whereas in the same conditions, a Prx-Srx species was produced. As observed in previous conditions, both species dissociated in the presence of DTT, indicating covalent linkages involving oxidized Cys residues.

Given that they were produced specifically in the presence of ATP, several hypotheses on the origins of these species can be raised based on the catalytic mechanisms proposed for Srx. First, the formation of oxidized forms of Srx implies chemical activation of Cys-84. This residue could be activated either as a phosphorylated intermediate according to Jeong *et al.* (17), or as a thiosulfinate intermediate (Fig. 1). In the case of wild-type Srx, intramolecular attack of either Cys-48 or Cys-106 would prevail, resulting in a monomeric oxidized species, whereas in the case of C48A-C106A mutant Srx, intermolecular attack of Cys-84 from native Srx would occur concurrently to the catalytic reactions, leading to a dimeric species. In the hypothesis of formation of a PrxSO-SSrx thiosulfinate intermediate, an important point to note is that this reaction would result in release of the reactive sulfenate form of the peroxidatic Cys C_p of Prx. Second, formation of the dimeric Prx species is associated with the presence of Cys-171 (C_p), suggesting the reaction of Cys C_r on the activated Cys C_p of Prx, likewise the regeneration step in the catalytic cycle of any typical 2-Cys-Prx. Species that could play the role of activated Prx are either the phosphorylated, the thiosulfinate intermediates or the oxidized form of Prx with a sulfenate Cys C_p. Two forms, including one or two symmetrical bonds, would be expected, as observed in Fig. 2A (lanes 2–4) and in a previous study (25). Finally, the Prx-Srx species observed with the C171A mutant of PrxSO₂ (Fig. 2, B and C) can only be explained by the hypothesis involving a PrxSO-SSrx thiosulfinate intermediate: either it corresponds to the intermediate itself, or to a disulfide issued from the reaction of a free thiol of Srx with the sulfenic Prx-C_pSOH released from the thiosulfinate intermediate, as suggested above.

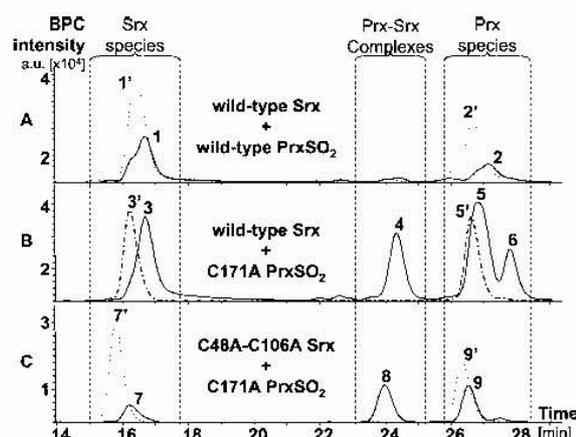


FIGURE 3. LC-MS analysis of the reaction catalyzed by Srx in the absence of added reducer. Reactions were carried out for 2 min in the same conditions as in Fig. 2, in the absence (dashed lines) and in the presence of ATP (solid lines), immediately followed by addition of 25 mM IAM and by LC-MS analysis. Base peak chromatograms of wild-type PrxSO₂ and wild-type Srx (A), C171A PrxSO₂ and wild-type Srx (B), and C171A PrxSO₂ and C48A-C106A Srx (C) are presented. Protein species are eluted in three clusters of peaks corresponding to Srx species, covalent Prx-Srx complexes and Prx species. Peaks are numbered for reference in the text and in Table 1.

Identification of a Thiosulfinate Intermediate by LC-MS and NanoLC-MS/MS Analyses—To test the hypothesis of the formation of a thiosulfinate complex, we focused on the structural characterization of the various products of the reactions between Prx (wild type/C171A mutant) and Srx (wild type/C48A-C106A double mutant) species by LC-MS. To distinguish between possible disulfide and thiosulfinate complexes between Srx and Prx, which are differentiated by a mass increase of 16 Da, a minimal theoretical mean mass resolution (FWHM) of 2,350 at 37 kDa is needed, which implies the use of a mass spectrometer finely tuned for high resolution (see “Experimental Procedures” for details).

Fig. 3 presents base peak chromatograms obtained for control experiments performed in the absence of ATP and for enzymatic reactions run for 2 min in the presence of ATP, in conditions similar as for Western blot analyses. For control experiments (dashed lines), two main peaks were detected. MS analysis showed that species eluting at retention times between 15 and 18 min and between 26 and 28 min corresponded to monomeric Srx and to monomeric PrxSO₂, respectively, labeled with carbamidomethyl groups inherent to IAM treatment. Molecular masses measured for control experiments (peak numbers 1', 2', 3', 5', 7', and 9') are given under “Experimental Procedures.”

In the presence of ATP, one additional peak eluting between 23 and 25 min was observed for reactions involving the C171A PrxSO₂ mutant (Fig. 3, B and C, solid lines), which corresponds to Prx-Srx complexes (peaks 4 and 8). Mass assignments after LC-MS analyses in the presence of ATP are reported in Table 1. By contrast, for the reaction of wild-type Srx with wild-type PrxSO₂, no additional Prx-Srx complex peak was observed on the chromatogram (Fig. 3A), which is in agreement with the results of Western blots. Peak 2 (at retention time ~27 min) revealed two major species, with masses that may be attributed to dimeric Prx linked with one (PrxS-SPrxSO₂) or two (PrxS-S/

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

TABLE 1

Mass assignments obtained after LC-MS analysis for the reaction catalyzed by Srx in the absence of added reducer

Reactions were carried out for 2 min in the same conditions as in Fig. 2, immediately followed by addition of 25 mM IAM and by LC-MS analysis. Minor species (<10%) are not reported, and major ones are in bold. Peak numbers refer to Fig. 3. Data are expressed in daltons.

RT <i>min</i>	Species	Wild-type Srx and Prx		Wild-type Srx and C171A Prx		C48A-C106A Srx and C171A Prx	
		Observed molecular mass	Expected molecular mass	Observed molecular mass	Expected molecular mass	Observed molecular mass	Expected molecular mass
15–18	Srx	Peak 1		Peak 3		Peak 7	
			13,722.7		13,722.7		13,658.6
	+IAM	13,779.6 ± 0.3	13,779.8	13,779.9 ± 0.3	13,779.8	13,715.5 ± 0.1	13,715.6
	+2 IAM	13,836.8 ± 0.4	13,836.8	13,836.4 ± 0.7	13,836.8		13,772.6
	SS Bridge	13,721.0 ± 0.2	13,720.7	13,721.1 ± 0.1	13,720.7		
	Dimer of Srx		27,443.4		27,443.4	27,316.6 ± 0.7	27,315.2
	+2 IAM		27,557.5		27,525.5	27,430.6 ± 0.5	27,429.3
	+4 IAM		27,671.6		27,639.6	27,543.6 ± 0.7	27,543.4
23–25	Disulfide complex			Peak 4		Peak 8	
	PrxS-SSrx		37,342.3		37,310.3	37,247.3 ± 0.4	37,246.1
	+IAM		37,399.4	37,368.7 ± 0.2	37,367.3		
	Thiosulfinate complex	PrxSO-SSrx	37,358.3		37,326.3	37,262.6 ± 0.4	37,262.1
26–29	Oxidized Prx	Peak 2		Peak 5		Peak 9	
			23,654.6 ± 0.5	23,653.6	23,622.2 ± 0.4	23,621.5	23,621.9 ± 0.4
		PrxSO ₂		23,669.6	23,638.3 ± 0.1	23,637.5	23,637.6 ± 0.3
		PrxSO ₃					23,637.5
	Reduced Prx				Peak 6	Peak 10	
			23,621.6	23,590.2 ± 0.2	23,589.5	23,589.9 ± 0.4	23,589.5
	Dimer of Prx	PrxS-S/S-SPrx	47,241.5 ± 0.3	47,239.2	47,177.1		47,177.1
		PrxS-SPrxSO ₂	47,277.8 ± 0.7	47,273.2			
		+IAM	47,338.2 ± 0.6	47,330.2			

S-SPrx) disulfide bonds (Table 1), likely between the Cys C_P and C_R from symmetrical subunits. However, the resolution of the MS instrument at 47 kDa did not allow us to discriminate between these two species. Such a result provides the first evidence in favor of the formation of a thiosulfinate intermediate between Srx and Prx, because it implies the reaction of the Cys C_R on a released sulfenic Prx-C_PSOH species. Therefore, reduction of the sulfenic PrxSO₂ is possible by a Srx thiol group in the absence of added reducer. For the reaction of wild-type Srx and C171A PrxSO₂, *peak 4* (Fig. 3B) corresponds to one single ion series with a measured molecular mass of 37,368.7 ± 0.2 Da (Table 1), which could be attributed to a disulfide PrxS-SSrx complex with one IAM adduct (expected molecular mass of 37,367.3 Da), which is in agreement with Western blot analyses.

Finally, direct evidence in favor of the formation of a thiosulfinate-type PrxSO-SSrx species was obtained by LC-MS analysis of the reaction of the C48A-C106A double mutant Srx and C171A PrxSO₂. Indeed, MS analysis of *peak 8* complexes showed a mixture of two species (Fig. 3C, Table 1): i) a compound with a mass of 37,262.6 ± 0.4 Da which could correspond to the expected PrxSO-SSrx thiosulfinate complex (expected MW: 37,262.1 Da, see Table 1) and ii) a species with a mass of 37,247.3 ± 0.4 Da which could be attributed to the PrxS-SSrx disulfide complex (expected MW: 37,246.1 Da, see Table 1). Since Srx Cys-84 and Prx C_P are the only Cys residues available for the reaction, this result strongly argues in favor of the accumulation of a PrxSO-SSrx thiosulfinate species involving Srx Cys-84 and Prx C_P in these conditions.

Even if the most probable explanation for the 37,262-Da species detected by LC-MS is the formation of the thiosulfinate intermediate, another hypothesis cannot be ruled out at this stage. Indeed, the 37,262-Da species could also correspond to a PrxS-SSrx disulfide compound with an additional oxidation of a non-Cys residue. However, LC-MS-monitored kinetic evolution of the ratio of putative thiosulfinate *versus* disulfide species

contained in *peak 8* invalidates this hypothesis. Indeed, the fraction of the 37,262-Da complex, which constitutes the major Prx-Srx species after 30-s reaction, decreased with time while the fraction of disulfide PrxS-SSrx species increased (Fig. 4). If the 37,262-Da species was a disulfide, the additional oxidation located for example on a Met residue, could not be reduced in these *in vitro* conditions to produce the PrxS-SSrx species. On the contrary, the evolution observed in Fig. 4 could be explained by the release of PrxSOH from a thiosulfinate species, followed by the attack of a reduced Cys thiol from Srx, which would lead to the increase of the disulfide species. In addition, these reactions would produce a disulfide SrxS-SSrx species. Indeed, such a complex was observed by immunoblotting (Fig. 2C) and by LC-MS (*peak 7*, Fig. 3C, Table 1). Although no free Cys is available on the SrxS-SSrx dimer, it was observed with two and four carbamidomethyl adducts, which can probably be attributed to increased His and Met reactivity toward IAM for this mutant Srx (26, 27).

To further establish the chemical nature of the bridging bond, *peak 8* was collected after LC-MS analysis and submitted to enzymatic digestions, followed by subsequent tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis (see supplemental materials). First, these conditions allowed us to unambiguously confirm the existence of the peptide corresponding to the 74–86 (GQT-LYYAFGGCHR)₂ disulfide dipeptide of the SrxS-SSrx dimer (see supplemental Fig. S1). Because the digestions were performed on the isolated complexes from *peak 8*, this species can only be explained by the release of free reduced Srx, and it thus implies the hydrolysis of a thiosulfinate species. Indeed, model thiosulfinate compounds have been shown to be sensitive to hydrolysis at neutral or basic pH. Although the mechanism of thiosulfinate hydrolysis appears more complex than nucleophilic attack by thiols, it would significantly involve release of reduced Srx and PrxSO₂ as an initial step (28, 29). This result again supports the thiosulfinate nature of the 37,262-Da species. In addition, the dipeptide resulting from the PrxS-SSrx

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

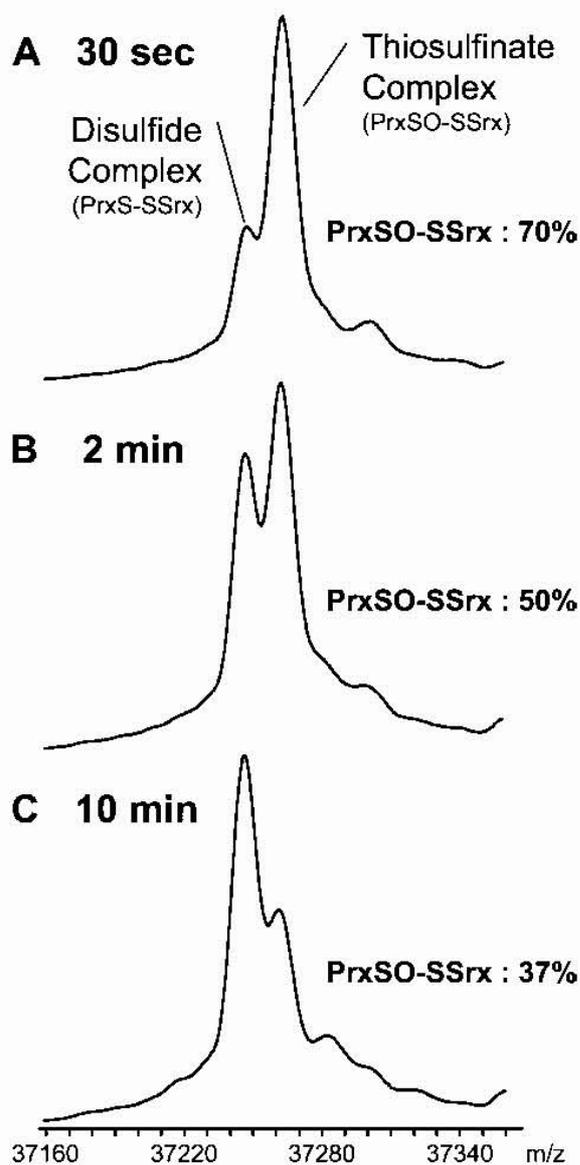


FIGURE 4. Kinetic evolution of the ratio of thiosulfinate versus disulfide complexes monitored by MS. Deconvoluted mass spectra of the covalent species formed between C171A PrxSO₂ and C48A-C106A Srx in the presence of ATP (*peak 8*, Fig. 3) obtained after 30 s (A), 2 min (B), and 10 min (C) reaction in identical conditions as in Fig. 2C.

species was also detected, showing the cross-linking of Prx Cys C_p and Srx Cys-84. Indeed, the ion at m/z 887.65 corresponds to the 5+ charge state of the 54–80 YVVLAFIPLAFTFVCPTELIAFSEAAK Prx peptide cross-linked by a disulfide bond to the 74–86 GQTLYYAFGGCHR Srx peptide (see supplemental Fig. S2). Due to the instability of thiosulfinate bonds at near neutral pH, no tryptic peptide containing a thiosulfinate cross-link was detected by nanoLC-MS/MS.

To attempt to directly characterize the putative thiosulfinate intermediate, pepsin digestions were performed at acidic pH, which is expected to stabilize the thiosulfinate bond (28). Despite accurate mass measurement of pepsic peptides, no peptide containing either the disulfide or the thiosulfinate bond

could be unambiguously sequenced even if molecular masses that could correspond to such peptides were measured with a high accuracy. Two reasons can account for this failure: (i) pepsin is a highly aspecific enzyme, and thus numerous missed cleavages can be considered resulting in a high number of potential theoretical proteolytic peptides, and (ii) MS/MS data for pepsic peptides were of low quality, which made precise sequence determination impossible.

However, analysis of the enzymatic digestions of the complexes by nanoLC-MS/MS allowed us to unambiguously localize the putative thiosulfinate bond on the amino acid scaffold. Indeed, the only peptides that could not be detected after enzymatic digestion (trypsin or pepsin) correspond to peptides containing either Prx Cys C_p or Srx Cys-84 (see supplemental Fig. S3). When reduction (DTT) and alkylation (IAM) treatment was performed before tryptic digestion, the 74–86 GQTLYYAFGGC_{cam}HR peptide corresponding to the Srx Cys-84-containing peptide was clearly detected and sequenced by nanoLC-MS/MS analysis (supplemental Fig. S4). Even if the corresponding Prx Cys C_p-containing peptide could not be observed after trypsin digestion, it could be sequenced in acidic conditions after pepsin digestion (supplemental Fig. S5).

Based on the preceding results, we propose the following scenario to explain the evolution of the reaction products (Fig. 5): formation of a thiosulfinate intermediate between Srx Cys-84 and Prx Cys C_p occurs first after activation of Prx by phosphorylation. All secondary products derive from the high reactivity of this species, in particular toward thiols. For the reaction of C48A-C106A double mutant Srx with C171A PrxSO₂ (Fig. 5B), reduced Srx, resulting from the hydrolysis of the thiosulfinate intermediate, would attack the sulfenate sulfur of the thiosulfinate intermediate, producing dimeric oxidized Srx (*peak 7*, Figs. 3C and 5B) and PrxC_pSOH. PrxC_pSOH would then react rapidly with reduced Srx, generating the PrxS-SSrx species observed in *peak 8* (Figs. 3C and 5B). Finally, a second attack of reduced Srx on the PrxS-SSrx disulfide complex would then result in the formation of a small amount of reduced Prx observed (*peak 10*, Fig. 3C, Table 1, and Fig. 5B). Reduced Prx was no longer observed after 10-min incubation (data not shown), likely due to the formation of a mixed disulfide with reduced Srx.

For wild-type Srx (Fig. 5A), the hypothesis of an intramolecular attack of a non-catalytic Cys thiol on Cys-84 sulfur atom is supported both by the electrophoretic shift of the monomeric Srx band (Fig. 2) and by LC-MS analysis. Indeed, a species at $13,721.0 \pm 0.2$ Da, corresponding to a decrease of 2 Da compared with the expected molecular mass for Srx (13,722.7 Da, see Table 1) was observed in *peaks 1* and *3* when wild-type Srx reacts with wild-type and C171A PrxSO₂, respectively (Fig. 3, A and B). Such an intramolecular disulfide bond was not detected for the reaction of C48A-C106A Srx double mutant with C171A PrxSO₂. Alternatively, the hypothesis of an intramolecular attack of a non-catalytic Cys on the putative cysteinylphosphate intermediate (Fig. 1B) cannot be definitely ruled out. The highly reactive sulfenic species PrxC_pSOH then rapidly evolved (within 30-s incubation, data not shown) into dimeric disulfide Prx species (*peak 2*, Fig. 3A) in the presence of the regeneration Cys C_R (Fig. 5A). Indeed, this reaction is part of

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

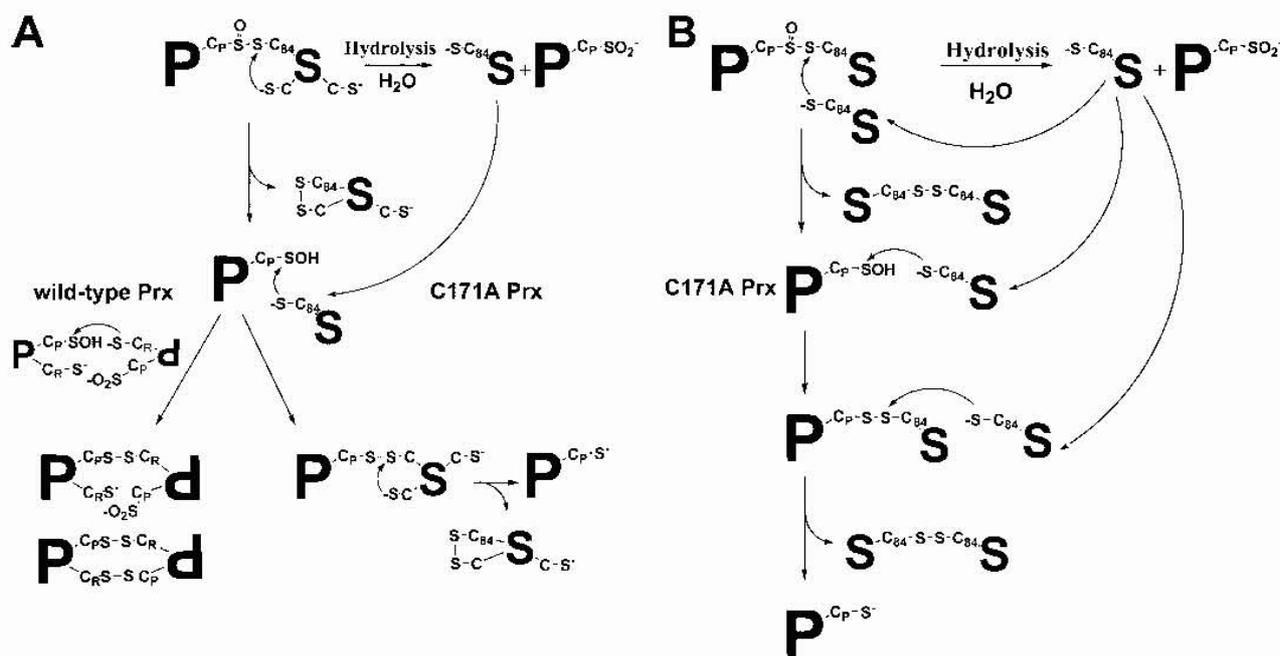


FIGURE 5. **Proposed scenario for the evolution of the thiosulfinate species.** Secondary reactions are deduced from SDS-PAGE, immunoblot, and LC-MS analysis of the reaction of wild-type Srx with wild type and C171A PrxSO₂ (A) and of C48A-C106A mutant Srx with C171A mutant PrxSO₂ (B), run in the conditions of Fig. 2.

the catalytic cycle of the peroxidase, at rates at least 50 times higher than Srx (rate constants of 2 s^{-1} versus 1.8 min^{-1}). When the regeneration Cys of Prx is mutated, the residual free thiols are carried only by Srx, which explains the formation of intermolecular mixed disulfide PrxS-SSrx as secondary species (peak 4, Fig. 3B). If hydrolysis of the thiosulfinate is significant during the time scale of the reaction, release of reduced Srx could provide the free thiol groups (Fig. 5A). Two arguments support the later proposition: first, the disulfide PrxS-SSrx species is labeled by IAM and thus cannot arise from reaction of the remaining Cys of oxidized Srx released, and second, there is formation of a significant amount of reduced Prx (Fig. 3B, peak 6, and Table 1) in less than 30 s (data not shown). This probably results from an intramolecular attack of a thiol of Srx on the PrxS-SSrx disulfide linkage, similar to the reaction taking place within the thiosulfinate intermediate (Fig. 5A). Therefore, no significant reaction would occur between the released Prx sulfenate and the remaining thiol of oxidized Srx, which suggests that recognition between both partners is needed for efficient attack of Srx catalytic Cys-84 on Prx Cys C_p. In addition, a significant hydrolysis of the thiosulfinate complex would also explain why a substantial fraction of PrxSO₂ is left non-reacted, as visible both on SDS-PAGE (Fig. 2, B and C) and by LC-MS (Fig. 3, peaks 2, 5, and 9, and Table 1).

Kinetic Analysis of the Formation of the Prx-Srx Species—Because all products of the reactions between the wild-type and mutant forms of both Srx and PrxSO₂ can be explained by the formation of a thiosulfinate PrxSO-SSrx complex, the question arises of the relevance of this species as an intermediate in the catalytic pathway. We addressed this question by a kinetic approach for real-time monitoring of the formation of this species by the production of P_i. For this purpose, we used the PNP

coupled assay, which monitors the decrease of fluorescence upon phosphorolysis of ^{m7}Guo. The assay was validated in the steady-state conditions by comparison with the Trx/NTR coupled assay in the presence of Trx as the reducing agent, which gave a rate constant of $1.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ for wild-type PrxSO₂, similar to 1.9 min^{-1} for the Trx/NTR assay using saturating/optimal concentrations of PrxSO₂, ATP, MgCl₂, and Trx. This value was also confirmed by a method based on the titration of the product of the Srx reaction, *i.e.* reduced Prx, by following the regeneration of its peroxidase activity in the presence of 10 mM DTT as electron donor, which gave a slightly slower steady-state rate constant of $1.5 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$.

Each of the reactions analyzed previously by Western blot and LC-MS was followed by the PNP assay. Single turnover conditions were used, *i.e.* absence of reducer and excess PrxSO₂ relative to Srx, to allow the determination of the rate constant and stoichiometry of formation of the intermediate relative to Srx. If the formation of the intermediate is part of the catalytic pathway, the rate constant of the reaction is expected to be at least equal to the steady-state rate constant, and the amplitude of the reaction should be equal to the limiting concentration, *i.e.* Srx. Indeed, depending on the relative rates of the secondary reactions following the formation of thiosulfinate, the species that accumulates will be either the intermediate itself, or an oxidized form of Srx (Fig. 5). Furthermore, one advantage of this method is to “filter off” secondary reactions such as formation of the disulfide species Prx-Srx, which are not monitored by the PNP assay.

The kinetics recorded for the reaction of wild-type Srx with wild-type and C171A PrxSO₂ gave very similar results. In the absence of Srx, a nonspecific linear phosphate release was measured, at a rate constant of $\sim 0.015 \text{ min}^{-1}$. After subtract-

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

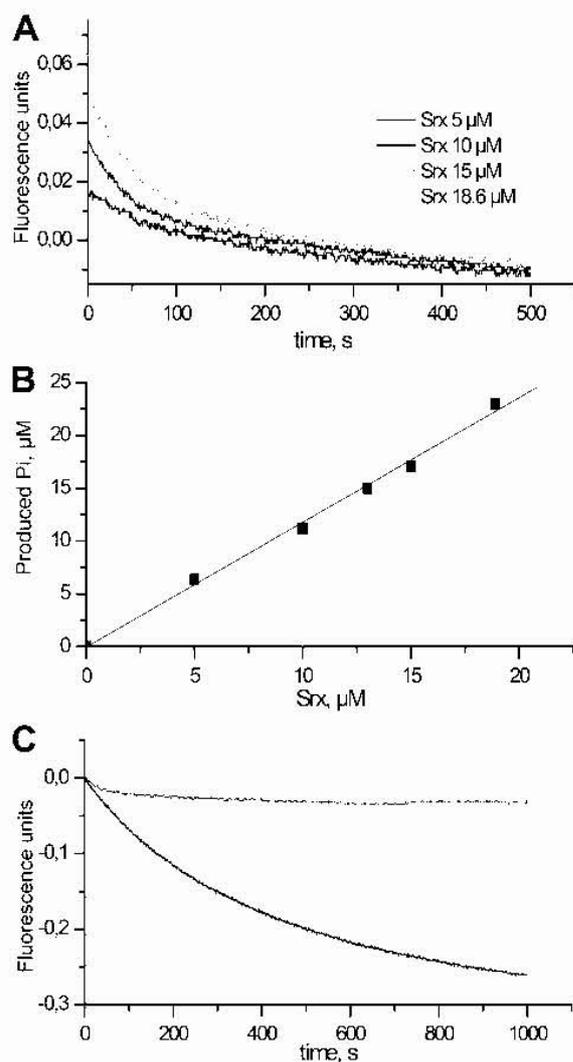


FIGURE 6. Kinetics of the reaction catalyzed by wild-type Srx with wild-type PrxSO₂ monitored by P_i release. *A*, the reaction of 100 μM wild-type PrxSO₂ with variable concentrations of wild-type Srx (5, 10, 15, and 18.6 μM) in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ was monitored on a rapid kinetics spectrofluorometer by the PNP coupled assay (see text). Reactions were carried out in TK buffer at 30 °C. The progress curves are corrected from blank traces collected in the absence of Srx. *B*, stoichiometry of P_i produced as a function of Srx concentration deduced from the amplitude of the time courses from panel *A* analyzed as monoexponential processes, and from a calibration curve of the fluorescence signal against P_i established in identical conditions. *C*, comparison of the kinetics of P_i release for the reaction of wild-type Srx (5 μM) with 100 μM wild-type PrxSO₂ in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ in the presence (thick line) or absence (thin line) of 300 μM Trx.

tion from the traces collected in the same conditions in the presence of increasing concentrations of Srx, the resulting progress curves were best described by a monoexponential equation, corresponding to a first order process, characterized by a rate constant of $1.8 \pm 0.7 \text{ min}^{-1}$ independent of Srx concentration (Fig. 6A). This rate constant is equal to the steady-state rate constant of the Srx-catalyzed reaction measured in the presence of a thiol reducer ($1.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$). Furthermore, the fluorescence response of ^{m7}Guo phosphorolysis was calibrated against phosphate (see "Experimental Procedures"), which

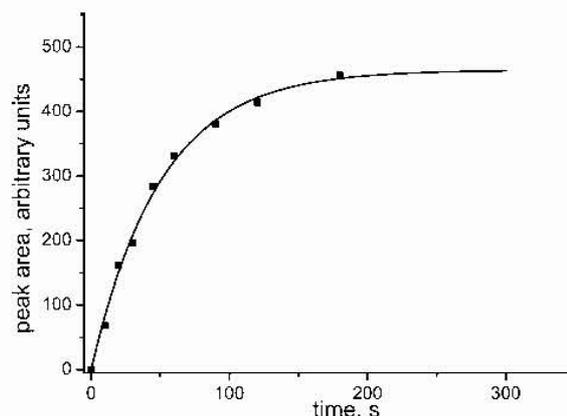


FIGURE 7. Kinetics of the reaction catalyzed by C48A-C106A Srx with C171A PrxSO₂ monitored by reversed-phase chromatography. The reaction of 100 μM C171A PrxSO₂ with 20 μM C48A-C106A Srx in the presence of 1 mM ATP and MgCl₂ at 30 °C was followed by analysis of aliquots of the reaction mixture quenched by acidification in trifluoroacetic acid 0.1%, on reversed-phase chromatography with the same gradient as in Fig. 3, monitored by absorption spectrophotometry at 215 nm. The evolution of the area of the peak corresponding to the Prx-Srx complexes (see Fig. 3B, peak 8) is plotted as a function of time (dots) and analyzed by a monoexponential kinetic model (solid line) with a rate constant of $1.2 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$.

allowed the analysis of the amplitude of the process as a function of Srx concentration. As shown on Fig. 6B, the reaction occurs with a stoichiometry of $0.96 \pm 0.16 \text{ mol of P}_i$ released per mol of Srx. These results support the accumulation of an intermediate species, the stoichiometry of which is limited by Srx concentration, at a rate compatible with catalysis. On the contrary, the amount of P_i released in the presence of an excess of Trx was compatible with the initial concentration of PrxSO₂ in the assay (Fig. 6C). Therefore, formation of the thiosulfinate species is strongly supported as a specific step on the catalytic pathway. In addition, the similarity between the rate constant measured in single turnover conditions and in steady-state conditions indicates that the rate-limiting step of the overall reaction occurs before or at this step. The kinetics of the reaction of C48A-C106A Srx with C171A PrxSO₂ revealed a similar behavior in the absence of reducer, with a rate constant of P_i release of $2.0 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ independent of Srx concentration (data not shown). A slightly higher stoichiometry of P_i release of 1.3 mol of P_i released per mol of Srx was observed. This supports hydrolysis of the thiosulfinate intermediate, as hypothesized above, which would result in 30% additional catalytic cycles in addition to the secondary reactions on the thiosulfinate intermediate already described (Fig. 5B).

To confirm the catalytic intermediacy of the thiosulfinate species, we followed the kinetics of evolution of the area of the chromatographic peak corresponding to peak 8 (Fig. 3C), after reaction of C48A-C106A Srx with C171A PrxSO₂ in the presence of ATP, monitored by UV spectrophotometry. Indeed, we showed that this peak contains two species, the putative thiosulfinate PrxSO-SSrx and the disulfide PrxS-SSrx which, assuming the scenario proposed in Fig. 5B, should derive from the secondary reactions of the thiosulfinate species. Therefore, the kinetics of evolution of the area of this peak should approximate the kinetics of production of the PrxSO-SSrx species. As shown in Fig. 7, this follows monoexponential kinetics with a

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

rate constant of $1.2 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ close to the rate of P_i release. Such results again support the role of the Prx-Srx species with a mass corresponding to a thiosulfinate as a catalytic intermediate. The slightly lower rate constant measured by chromatography can probably be attributed to the evolution of this reactive species by the side reactions described Fig. 5B.

This interpretation raises the problem of the compatibility of the results obtained on *S. cerevisiae* (this study) and mammalian Srx (17). In their study on human Srx, Jeong *et al.* did not detect an Srx-Prx thiosulfinate species, but a disulfide species between the human Srx catalytic Cys and the regeneration Cys C_R of the Prx. The Prx protein exists in solution as an obligate dimer, or decamer. Because experiments were conducted on the wild-type substrate PrxSO₂, this species could result from the attack of Cys C_R from the symmetrical Prx monomer on the sulfinyl sulfur of the thiosulfinate bond, a reaction favored by the existence of the complex. After a 10-min reaction, the greater part of the thiosulfinate intermediate would have reacted to give the disulfide species observed. In addition, it would release Prx with a Cys C_P as a sulfenate, which can react with the catalytic Cys-99 of another human Srx molecule to eventually produce the Prx-(Srx)₂ species, the second most abundant form in the experiment shown in Jeong *et al.*, study (17). This interpretation was supported by a control experiment performed on the equivalent reaction for the *S. cerevisiae* proteins, using C48A-C106A Srx and wild-type PrxSO₂ for 5 min in the presence of ATP/MgCl₂. LC-MS analyses revealed a complex mix, including three chromatographic peaks in addition to the peaks of Srx and Prx, corresponding to mixed disulfide species formed between Prx and Srx (1:1 and Srx 1:2 complexes) and PrxSO₂ and Srx (1:1 complex) (data not shown). The authors also reported that these species were formed non-specifically between Srx and reduced Prx, a result that we also observed in the yeast system (data not shown). However, for the reaction between the substrate PrxSO₂ and *S. cerevisiae* Srx, no Prx-Srx species was produced in the absence of ATP (Fig. 2), clearly supporting that the thiosulfinate species observed in this study is specifically formed along the catalytic mechanism.

Kinetics of P_i release for the reaction of human Srx and sulfinic Prx in the absence of reducer were characterized by a stoichiometry largely higher than Srx concentration (17). They were described as a linear phase interpreted as a futile cycle of hydrolysis of the phosphorylated substrate, followed by inactivation of Srx from the nonspecific reaction between the catalytic Cys and Cys C_R of the substrate. However, as proposed above, thiosulfinate hydrolysis would also lead to a futile cycle of recycling of the sulfinic acid substrate and Srx. The kinetics of P_i release for human Srx in the absence of reducer could correspond to hydrolysis. As shown for the yeast system, secondary reactions of hydrolysis and reaction with thiols could compete with the slow formation of the thiosulfinate intermediate (the rate constant for the reaction catalyzed by mammalian Srx is reported to be of $0.2\text{--}0.5 \text{ min}^{-1}$ (16, 17)). Therefore, for human Srx, either the rate of formation of the thiosulfinate intermediate would be too slow to be resolved from the process of thiosulfinate hydrolysis, or the technique of P_i detection on the hour time scale employed by Jeong *et al.* could not resolve

the kinetics of formation of the thiosulfinate (on the minute time scale for yeast Srx) and of secondary reactions.

CONCLUSION

In the present study, the role of Srx as a reductase has been proven by three types of arguments from the analysis of the Srx reaction in the absence of added reducers: first, the observation of the transient formation of a DTT-reducible species with a mass compatible with the thiosulfinate intermediate postulated in Fig. 1A, second, the analysis of the different species formed in secondary reactions, which implies obligatory transit through such an intermediate, and finally, the kinetics and stoichiometry of the reaction indirectly monitored in real-time by the release of P_i , or directly by the evolution of the Prx-Srx complex chromatographic peak, which authenticated this species as a catalytic intermediate. Such an interpretation can probably be extrapolated to the catalytic mechanism of Srx from mammals for which no such results were obtained in a previous study by Jeong *et al.* (17), likely due to secondary reactions of the regeneration Cys of the Prx substrate on the thiosulfinate intermediate.

This interpretation implies the attack of Srx catalytic Cys on the phosphorylated Prx substrate, which therefore requires precise recognition and positioning of the reacting Cys from both partners at distances compatible with the chemical steps. Observations from this study, and substrate specificity of Srx for the class of the typical 2-Cys-Prx (6), are in agreement with these conclusions. Furthermore, when this report was under submission, the structure of an artificial human PrxS-SSrx disulfide complex was published (30). This structure strongly supports the formation of a covalent Prx-Srx intermediate involving Prx Cys C_P and Srx catalytic Cys, through the local unfolding of Prx active site triggered by Srx binding. The complex is also stabilized by an interaction with the unfolded C-terminal tail of Prx acting as an embrace onto the Srx molecule.

In addition, catalysis of the ATP-dependent activation of PrxSO₂ as a phosphorylated intermediate remains to be elucidated for *S. cerevisiae* Srx. In this regard, the hypothesis of the existence of a phosphorylated Srx intermediate (Fig. 1B) is not supported by the structural data on the PrxS-SSrx complex (30). The importance of an Asn residue in position 186 from the Prx was suggested for the human enzyme (31). The role of the corresponding Thr residue in Prx will require further investigation at the chemical level. Finally, the results obtained with wild-type Srx from *S. cerevisiae*, showing the release of oxidized Srx with intramolecular disulfide bond, raise the question of the potential role of the non-catalytic Cys residues of Srx Cys-48 and Cys-106, which are not conserved in human Srx.

Acknowledgments—We thank J. Ugolini and S. Alaoui for excellent technical assistance and Prof. S. Boschi-Muller, Dr. A. Gruez, Dr. H. Mazon, and Dr. C. Schaeffer-Reiss for helpful discussions.

REFERENCES

1. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) *Nature* **425**, 980–984.
2. Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., and Chumakov, P. M. (2004) *Science* **304**, 596–600.
3. Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., and Woo,

Prx-Srx Thiosulfinate Intermediate in the Srx Mechanism

- H. A. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 183–189
4. Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., and Finkel, T. (1995) *Science* **270**, 296–299
 5. Rhee, S. G. (2006) *Science* **312**, 1882–1883
 6. Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T. S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., and Rhee, S. G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 3125–3128
 7. Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., and Choi, M. H. (2005) *Trends Mol. Med.* **11**, 571–578
 8. Chang, T. S., Jeong, W., Choi, S. Y., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25370–25376
 9. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) *Science* **300**, 650–653
 10. Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B., and Hidalgo, E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8875–8880
 11. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) *Cell* **117**, 625–635
 12. Findlay, V. J., Townsend, D. M., Morris, T. E., Fraser, J. P., He, L., and Tew, K. D. (2006) *Cancer Res.* **66**, 6800–6806
 13. Liu, X. P., Liu, X. Y., Zhang, J., Xia, Z. L., Liu, X., Qin, H. J., and Wang, D. W. (2006) *Cell Res.* **16**, 287–296
 14. Glauser, D. A., Brun, T., Gauthier, B. R., and Schlegel, W. (2007) *BMC Mol. Biol.* **8**, 54–67
 15. Diet, A., Abbas, K., Bouton, C., Guillon, B., Tomasello, F., Fourquet, S., Toledano, M. B., and Drapier, J.-C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 36199–36205
 16. Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50994–51001
 17. Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y., and Rhee, S. G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 14400–14407
 18. Mulrooney, S. B. (1997) *Protein Expr. Purif.* **9**, 372–378
 19. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233–1244
 20. Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298
 21. Studier, F. W. (2005) *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234
 22. Banik, U., and Roy, S. (1990) *Biochem. J.* **266**, 611–614
 23. Kice, J. L., and Liu, C.-C. A. (1979) *J. Org. Chem.* **44**, 1918–1923
 24. Kice, J. L., and Rogers, T. E. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 8015–8019
 25. Chae, H., Uhm, T., and Rhee, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7022–7026
 26. Veniamin, N., Lapko, D. L. S., and Smith, J. B. (2000) *J. Mass Spectrom.* **35**, 572–575
 27. Lundell, N., and Schreitmuller, T. (1999) *Anal. Biochem.* **266**, 31–47
 28. Nagy, P., and Ashby, M. T. (2007) *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1364–1372
 29. Kice, J. L., and Rogers, T. E. (1974) *J. Am. Chem. Soc. U. S. A.* **96**, 8009–8015
 30. Jonsson, T. J., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) *Nature* **451**, 98–101
 31. Lee, D. Y., Park, S. J., Jeong, W., Sung, H. J., Oho, T., Wu, X., Rhee, S. G., and Gruschus, J. M. (2006) *Biochemistry* **45**, 15301–15309

Supplemental data for

EVIDENCE FOR THE FORMATION OF A COVALENT THIOSULFINATE INTERMEDIATE WITH PEROXIREDOXIN IN THE CATALYTIC MECHANISM OF SULFIREDOXIN

by

Xavier Roussel, Guillaume Béchade, Alexandre Kriznik, Alain Van Dorsselaer, Sarah Sanglier-Cianferani, Guy Branlant and Sophie Rahuel-Clermont

Methods for supplemental data:

NanoLC-MS/MS experiments

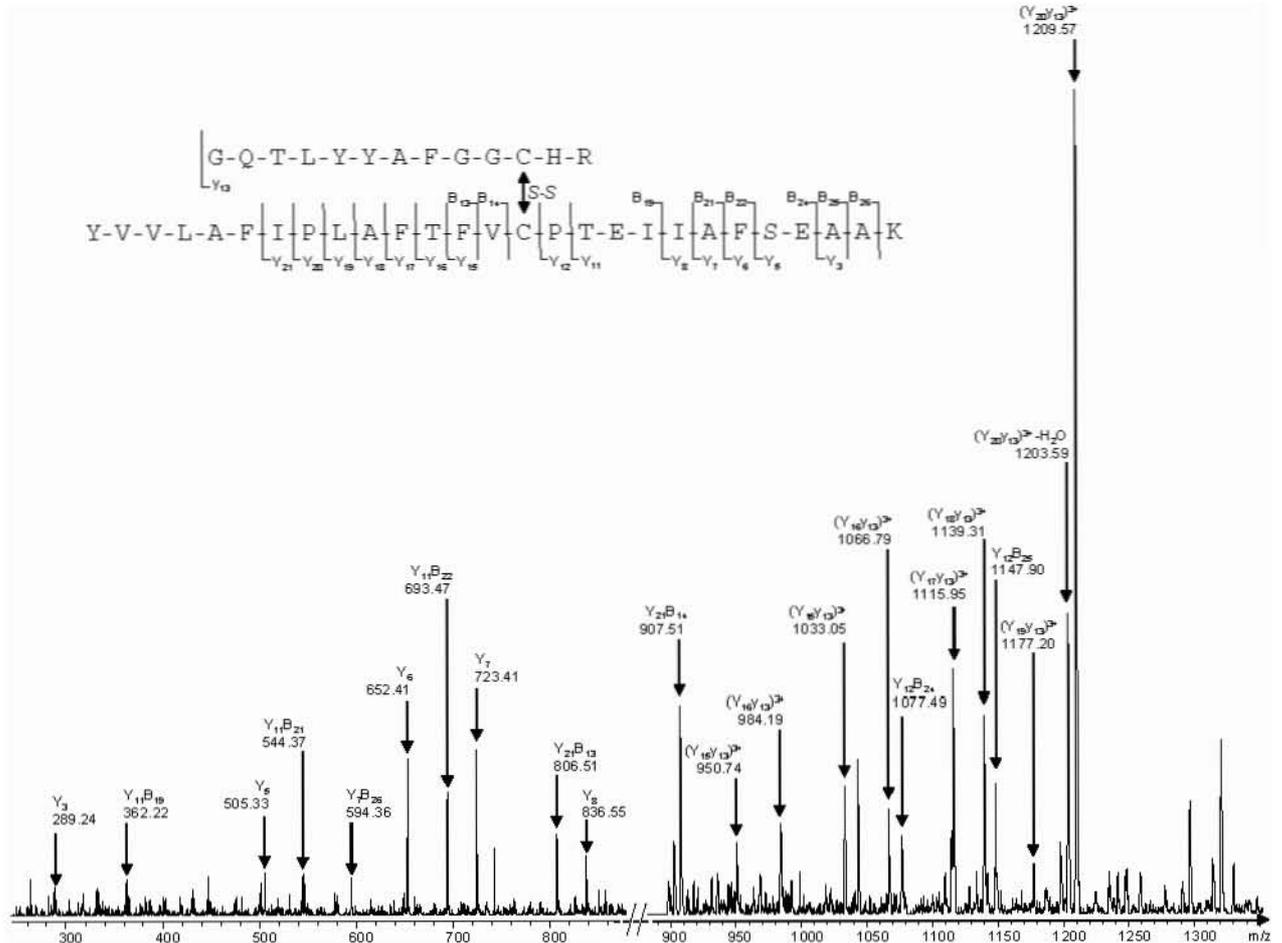
Samples preparation- Peaks containing complexes of interest were collected after LC-MS (see above). Acetonitrile was removed from these samples using Savant Speedvac Plus (ThermoQuest, San Jose, CA, USA). For reduction and alkylation treatment, the pH was first adjusted to 7.5 by addition of 250 μ l of ammonium hydrogen carbonate (25 mM) followed by addition of 100 μ l of 10 mM dithiothreitol (1 h at 60°C) and 55 mM IAM (1 h at room temperature).

Digestion step- Trypsin digestion (Promega, Madison, WI, USA) was performed at pH 7.5 in 25 mM ammonium hydrogen carbonate, over 4 h at 37°C. Digestion was stopped by addition of formic acid. Pepsin digestion (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was conducted at pH 1.6 in 0.11 M phosphoric acid over 1 h at 4°C. NanoLC-MS/MS analyses were performed immediately after pepsin digestion.

NanoLC-MS/MS analyses- NanoLC-MS/MS analyses were performed on an Agilent 1100 Series capillary LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a HCT Ultra Ion Trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Coupling was ensured by HPLC-Chip Cube interface (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) loaded with a HPLC-Chip. The chip comprised a 40 nl enrichment column and a 75 μ m x 150 mm separation column packed with Zorbax 300SB-C18 5 μ m material.

Aliquots of 4 μ l of each sample were loaded on the precolumn, the gradient was set at a 300 nl min⁻¹ flow rate and with a linear profile from solvent A (92% H₂O/1% formic acid, v/v) to solvent B (40% acetonitrile/1% formic acid, v/v) over 45 min. A second ramp up to 70% of B followed over 4 min. The capillary and cone voltage were set to 1850 V and -500 V respectively. Automatic switching between MS and MS/MS modes was used. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent Technologies) and EsquireControl (Bruker Daltonics) softwares.

NanoLC-MS/MS accurate mass measurements were performed on a nanoAquity HPCL system coupled to a Synapt HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) and equipped with lock-spray. Aliquots of 4 μ l of each sample were loaded on a 5 μ m Symmetry C18 180 μ m x 20 mm precolumn coupled to a 1.7 μ m BEH130 C18 180 μ m x 20 mm separation column. The gradient was set at a 400 nl min⁻¹ flow rate and with a linear profile from solvent A (99% H₂O/0.1% formic acid, v/v) to solvent B (50% acetonitrile/0.1% formic acid, v/v) over 35 min. A second ramp up to 90% of B followed over 4 min. The capillary and cone voltage were set to 3.3 kV and 35 V respectively. The complete system was fully controlled by MassLynx and Synapt HDMS software (Waters).



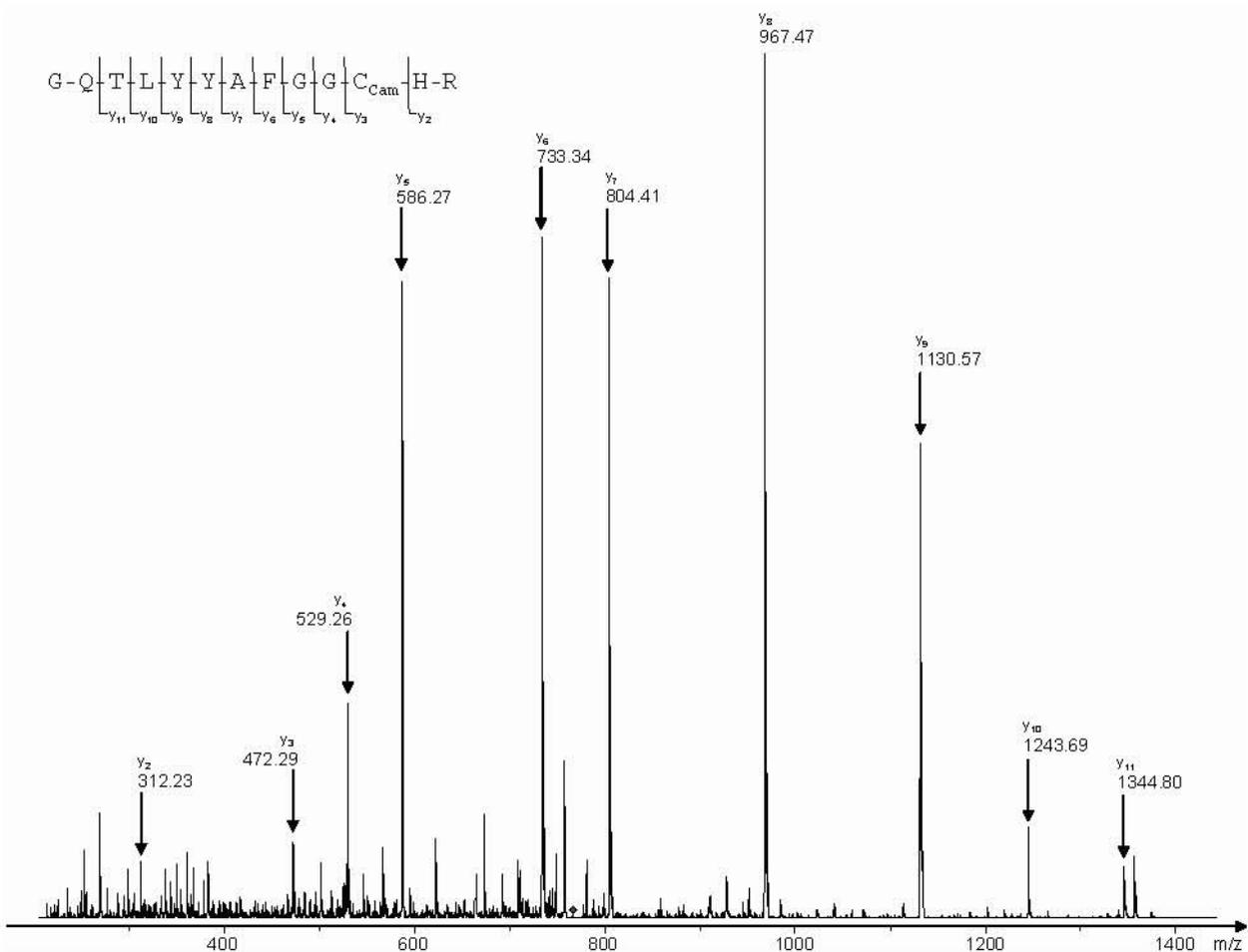
Suppl. Figure 2: Tandem mass spectrum (nanoLC-Chip-IT) of the $[M+5H]^{5+}$ precursor ion at m/z 887.65 of the disulfide-bonded (Prx Cys C_p - Srx C84) dipeptide Prx 54-80 and Srx 74-86 obtained after trypsin digestion without prior reduction/alkylation treatment. The major fragment ion $(Y_{20}/Y_{13})^{3+}$ and the subsequent amino acid tags unambiguously attest the existence of the PrxS-SSrx species.

Résultats I : activité réductase de Srx

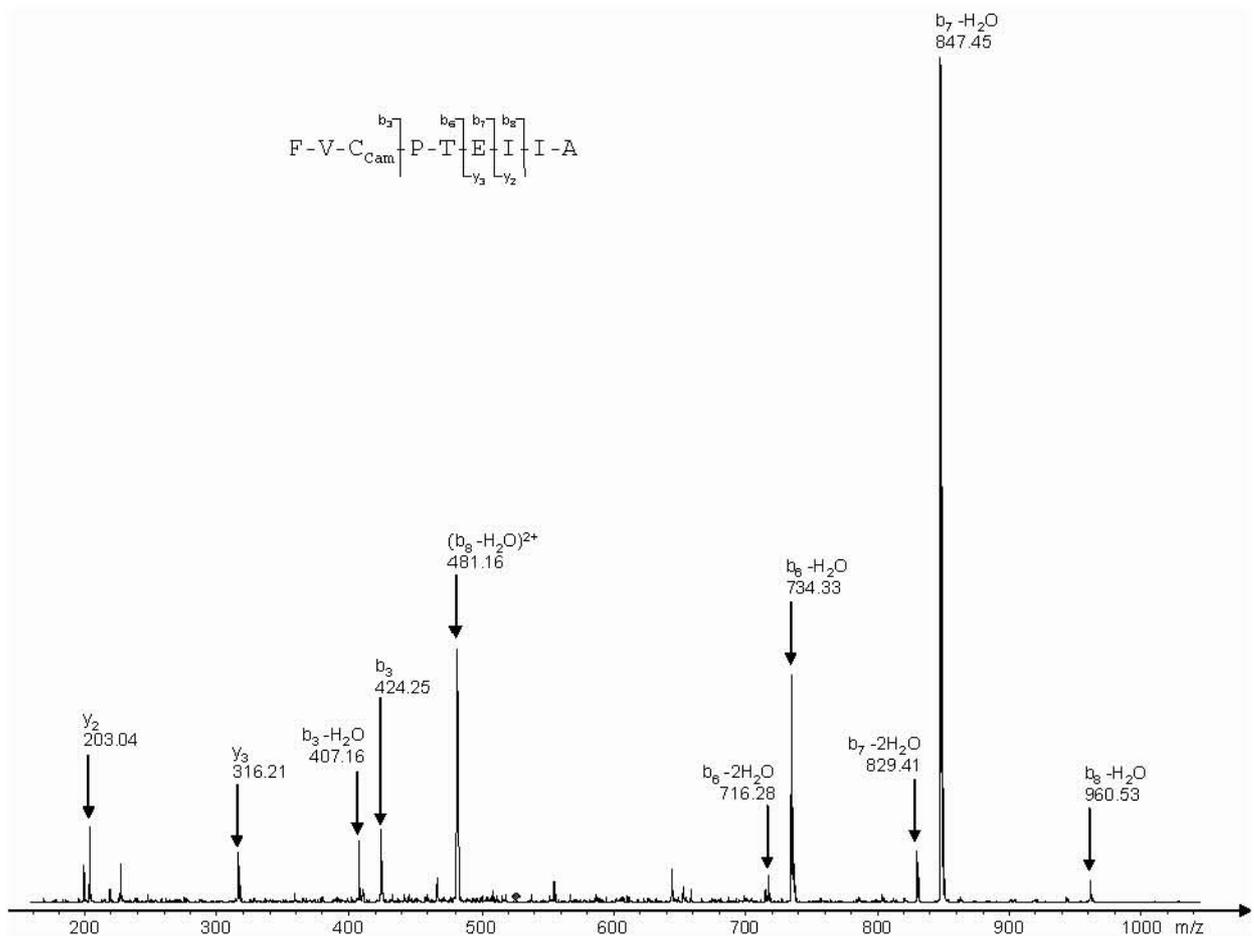
C48A-C106A Srx										
<u>SLQS</u>	<u>NSVKP</u>	<u>TEIPL</u>	<u>SEIRR</u>	<u>PLAPV</u>	<u>LDPOK</u>	<u>IDAMV</u>	<u>ATMKG</u>	<u>IPTAS</u>	<u>KTASL</u>	<u>EQAEA</u>
AASAG	<u>ELPPV</u>	<u>DVLGV</u>	<u>RVKGQ</u>	TLYYA	FGG [*] CH	RLQAY	DRRAR	ETQNA	AFPVR	ARVLP
ATPRQ	IRMYL	GSSLD	IE							

C171A Prx										
GSSH	HHHHH	SSGLV	PRGSH	<u>MVAQV</u>	<u>QKQAP</u>	<u>TFKKT</u>	AVVDG	VFDEV	<u>SLDKY</u>	<u>KGKYV</u>
<u>VLAFI</u>	PLAFT	FVCPT	EIIAF	<u>SEAAK</u>	<u>KFEEQ</u>	<u>GAQVL</u>	FASTD	SEYSL	<u>LAWTN</u>	<u>IPRKE</u>
<u>GGLGP</u>	<u>INIPL</u>	<u>LADTN</u>	<u>HLSLR</u>	<u>DYGLV</u>	<u>IEEEG</u>	<u>VALRG</u>	LFIID	PKGVI	RHITI	NDLPV
GRNVD	<u>EALRL</u>	<u>VEAFQ</u>	WTDKN	<u>GTVLP</u>	<u>ANWTP</u>	<u>GAATI</u>	KPTVE	DSKEY	<u>FEAAN</u>	<u>K</u>

Suppl. Figure 3: Sequence coverage obtained by nanoLC-MS/MS analyses after trypsin and pepsin digestions without prior reduction/alkylation treatment. Bold and underlined tags correspond to peptides recovered in trypsin and pepsin digested samples, respectively. A fraction of 88% of the total Prx-Srx complex sequence has been recovered. Peptides including cysteins of interest (labelled with *) have not been detected in any case, inferring a link between these two Cys.



Suppl. Figure 4: Tandem mass spectrum (nanoLC-Chip-IT) of the $[M+2H]^{2+}$ precursor ion at m/z 765.92 of the carbamidomethylated peptide Srx 74-87 obtained after trypsin digestion with reduction-alkylation treatment. Major fragment ions correspond to y_n ($n=2-11$) sequence tag.



Suppl. Figure 5: Tandem mass spectrum (nanoLC-Chip-IT) of the $[M+2H]^{2+}$ precursor ion at m/z 525.58 of the carbamidomethylated peptide Prx 66-74 obtained after pepsin digestion with prior reduction-alkylation treatment. Major fragment ions correspond to $b_n - H_2O$ ($n=3-8$) sequence tag.

Résultats I : activité réductase de Srx

Résultats II : Etude du recyclage de Srx lors du cycle catalytique.

Nous avons montré dans la première partie des Résultats que Srx possède une activité réductase et forme un intermédiaire covalent de type thiosulfinate avec la Prx ; ce qui pose la question du mécanisme de recyclage de l'activité Srx, en particulier de la nature du réducteur impliqué.

A. Recyclage de Srx de *S. cerevisiae*.

Lors de la caractérisation de l'intermédiaire thiosulfinate entre Srx et Prx, nous avons mis en évidence par spectrométrie de masse et SDS-PAGE, en absence de réducteur, une espèce monomérique oxydée de scSrx (scSrx_{ox}) formée uniquement lorsque les Cys non-catalytiques de scSrx, sont présentes (voir Résultats I). Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse que cette espèce scSrx_{ox} pouvait jouer le rôle d'intermédiaire réactionnel dans le cycle catalytique de scSrx. Cette espèce serait la cible d'un réducteur comme la Trx avec formation d'un complexe Srx/Trx efficace conduisant au processus de transfert à 2 électrons.

La partie qui suit est un résumé de la publication 2 en cours de soumission, montrant que la forme scSrx_{ox} entre la Cys catalytique et la Cys48 est un intermédiaire catalytiquement compétent reconnu et réduit efficacement par la Trx.

A.1 La Cys48 est impliquée dans le mécanisme de recyclage de l'activité scSrx.

La caractérisation des paramètres cinétiques de la réaction catalysée par scSrx a montré que la constante de vitesse de formation de l'intermédiaire thiosulfinate, d'environ 2 min⁻¹, était égale à la constante de vitesse à l'état stationnaire k_{ss} mesurée en présence de réducteur Trx (cf Résultats I). L'étape limitante de la réaction n'est donc pas associée à l'étape de recyclage de Srx, mais à une étape concomitante ou antérieure à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate. Dans l'hypothèse d'une forme scSrx_{ox} catalytiquement compétente, reconnue et réduite efficacement par la Trx, la substitution de la Cys de recyclage par une Ser ou une Ala devait donc conduire à une étape de recyclage cinétiquement limitante. En présence d'un thiol type DTT, il n'était pas attendu de changement d'étape limitante aux concentrations utilisées de DTT, la réactivité du DTT vis-à-vis d'un thiosulfinate ne devant pas être moindre que celle vis-à-vis d'un pont disulfure.

Résultats II : Recyclage de Srx

Les constantes de vitesse en présence de réducteur ecTrx et DTT pour les formes sauvages et mutées de scSrx au niveau des Cys48 et/ou 106 ont été déterminées en utilisant le système couplé PNP/^{m7}Guo qui permet de suivre la vitesse de libération du Pi. Les concentrations en Trx ou en DTT sont les mêmes dans chacun des tests (235 μ M de Trx ou 50 mM de DTT). Les résultats montrent que la substitution de la Cys48 par une Ser ou une Ala entraîne une diminution d'un facteur 10 environ du k_{ss} en présence de Trx, la vitesse en présence de DTT n'étant affectée que d'un facteur 2 (publication 2, Table 1 page 102). Ceci suggère qu'une étape du mécanisme postérieure à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate devient cinétiquement limitante pour les variants dépourvus de Cys48, en présence de Trx. C'est en effet ce que montre la cinétique de C48A-C106A scSrx avec la Trx (publication 2, Figure 2 page 104) qui révèle un profil biphasique, avec une phase exponentielle rapide correspondant à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate, caractérisée par un k_{obs} de $\sim 2 \text{ min}^{-1}$, suivi d'une phase linéaire de constante de vitesse de $0,25 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ qui correspond à la réduction de l'intermédiaire par la Trx. En présence de DTT, la cinétique présente un profil similaire à celui de l'enzyme sauvage, qui ne peut être interprété que par une phase initiale linéaire correspondant à la constante de vitesse k_{ss} de $1,2 \text{ min}^{-1}$, suivie d'un ralentissement de la réaction dû à la consommation des substrats.

Parallèlement, l'analyse des produits de la réaction en absence de réducteur, sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE a été utilisée pour montrer la formation d'une espèce scSrx_{ox}, selon l'approche validée dans la partie Résultats I (publication 2, Figure 3 page 105). Pour le variant C106A scSrx, nous observons sur gel un dédoublement de la bande Srx, comme pour l'enzyme sauvage, qui correspond à l'espèce scSrx_{ox}. Par contre pour le variant C48S scSrx, nous n'observons pas de formation de l'espèce scSrx_{ox}. Ces résultats confortent la Cys48 comme étant la cystéine impliquée dans la formation du pont disulfure intramoléculaire dans scSrx_{ox}.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la Cys48 de scSrx est nécessaire pour que la réaction de scSrx en présence de Trx soit non limitante. La Cys48 réagit donc sur l'intermédiaire thiosulfinate Prx-SO-S-Srx en attaquant le soufre sulfénique de la liaison thiosulfinate formant l'espèce scSrx_{ox} et libérant la Prx sous forme d'acide sulfénique (Figure 50 page 87). L'espèce scSrx_{ox} sera ensuite réduite par la Trx. En absence de Cys48, la PrxSOH est libérée après la réduction directe du thiosulfinate Prx-SO-S-Srx par la Trx de façon non efficace, étape qui devient alors l'étape cinétiquement limitante de la réaction.

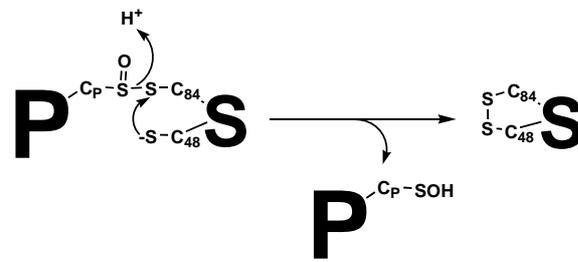


Figure 50 : Représentation schématique de la libération de la PrxSOH, produit de la réaction.
S = Srx, P = Prx.

Ce schéma implique que l'espèce $scSrx_{ox}$ est un intermédiaire de la réaction catalytiquement compétent, dont les constantes de vitesse de formation et de réduction (voir chapitre suivant) par la Trx sont au moins égales à la constante de vitesse mesurée à l'état stationnaire. Afin de mesurer la constante de vitesse de formation de l'espèce $scSrx_{ox}$, nous avons mis au point au préalable une méthode de séparation des espèces $scSrx$ réduites et oxydées par chromatographie en phase inverse sur C8 après arrêt de la réaction par acidification. La forme oxydée est éluée en premier par un gradient d'acétonitrile (publication 2, Figure 4 A page 106). La cinétique d'évolution de l'aire du pic correspondant à $scSrx_{ox}$ formée dans des conditions de «single turn-over», c'est-à-dire en absence de réducteur et en présence d'excès de $PrxSO_2$ par rapport à $scSrx$, est ajustée à une fonction exponentielle correspondant à une cinétique de premier ordre, et permet de déterminer une constante de vitesse de formation de $scSrx_{ox}$ de $1,2 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ (publication 2, Figure 4 B page 106), comparable à celle mesurée à l'état stationnaire en présence de réducteur. En conséquence, l'espèce $scSrx_{ox}$ avec un pont disulfure entre les Cys48 et 84 peut constituer un intermédiaire catalytique de la réaction.

A.2 Réduction de $scSrx_{ox}$ par la Trx.

L'étape de réduction de l'intermédiaire $scSrx_{ox}$ a été étudiée sur une espèce $scSrx_{ox}$, produite en grande quantité par oxydation avec H_2O_2 puis purifiée par filtration sur gel. Nous avons déterminé les paramètres cinétiques de la réduction de l'espèce $scSrx_{ox}$ par la Trx, en utilisant une technique mise au point au laboratoire par Mathias Antoine (Antoine *et al.*, 2003). Cette technique tire avantage de la variation des propriétés d'émission de fluorescence de la Trx en fonction de son état redox. La formation du pont disulfure entre les Cys du site actif de la Trx entraîne l'extinction de l'émission de fluorescence d'un Trp voisin. La variation de l'émission de fluorescence du Trp de la Trx est donc une sonde spectroscopique indirecte de l'état redox du site actif de l'enzyme, qui permet de suivre

Résultats II : Recyclage de Srx

spécifiquement la vitesse de formation de la Trx oxydée (Trx_{ox}) lors de la réduction de $scSrx_{ox}$. En effet, la Srx de *S. cerevisiae* ne possédant pas de résidu Trp, ne génère pas de variation de message de fluorescence après passage sous la forme réduite.

La vitesse de l'étape de réduction de $scSrx_{ox}$ par la Trx réduite (Trx_{red}) a été mesurée en suivant, sur un appareil de cinétique rapide, la vitesse d'oxydation de la Trx_{red} et ce en conditions de «single turn-over». Le profil de variation des constantes de vitesse mesurées en fonction de la concentration en Trx_{red} présente une allure hyperbolique, caractéristique d'une reconnaissance entre les partenaires $scSrx_{ox}$ et Trx_{red} . En considérant que l'étape d'association et de dissociation du complexe Srx_{ox}/Trx_{red} est en équilibre rapide par rapport aux étapes chimiques d'échange de pont disulfure, les paramètres cinétiques déterminés à partir d'un modèle de type michaelien simple pour la réduction de $scSrx_{ox}$ par ecTrx (publication 2, Figure 5 page 107) ou par scTrx (Figure 51 page 88), sont respectivement de $210 \pm 30 \mu M$ et $56 \pm 15 \mu M$ pour K_{Trx} et de $105 \pm 7 s^{-1}$ et $27 \pm 2 s^{-1}$ pour k_{Trx} . En conditions de steady-state, c'est-à-dire en présence de ecTrx réductase, nous constatons que la vitesse de réduction de $scSrx_{ox}$ par ecTrx, dans la gamme de concentrations utilisées (de 25 à $125 \mu M$) est 20 fois plus faible que la vitesse de formation de la ecTrx_{ox}. Ceci démontre que l'étape limitante de réduction de $scSrx_{ox}$ par ecTrx est associée au relargage de ecTrx_{ox}, mais reste cependant largement supérieure à la vitesse mesurée pour la Srx à l'état stationnaire. La valeur de $56 \mu M$ pour le K_M de la scTrx, mesurée en conditions de «single turn-over», montre qu'il existe une bonne reconnaissance structurale entre les deux partenaires ce qui est un fort argument en faveur du rôle de la Trx en tant que réducteur physiologique de Srx chez *S. cerevisiae*.

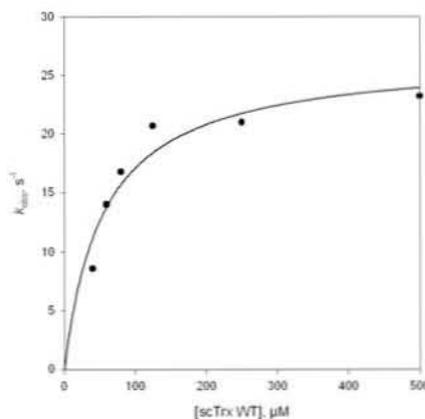


Figure 51 : Détermination des paramètres cinétiques de l'étape de réduction de $scSrx_{ox}$ par la scTrx.

La diminution du message de fluorescence associé à la formation du pont disulfure Cys30-Cys33 de la scTrx lors de la réduction de $scSrx_{ox}$ est mesurée à 30°C dans du tampon TK à pH 7. La concentration finale en $scSrx_{ox}$ est de $10 \mu M$ et celle de scTrx sauvage varie de 20 à $500 \mu M$. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 310 nm et l'intensité de fluorescence émise est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 320 nm. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation suivante : $k_{obs} = k_{Trx}S/(K_{Trx} + S)$.

Enfin, nous avons essayé de déterminer quelle Cys de scSrx constituait la cible de l'attaque de la Cys catalytique de la Trx. Cette information peut être utile en vue d'une caractérisation, ultérieure, des facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance Srx/Trx, par une approche structurale par RMN. Cette étude peut être envisagée à la condition de disposer d'un complexe covalent stable entre les deux partenaires *via* un pont disulfure intermoléculaire, d'où la nécessité de caractériser le pont disulfure transitoire formé entre les deux partenaires.

Pour caractériser la cystéine de Srx impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire avec la Trx, nous avons utilisé une approche reposant sur un critère cinétique indirect. Celle-ci consiste à mesurer la réactivité de la Trx, dont la cystéine de recyclage est substituée par une Ser, vis-à-vis de la Srx activée chimiquement sur séparément chacune de ses cystéines *via* un pont disulfure mixte avec un réactif spécifique des thiols. Pour ce faire, on utilise des variants de scSrx, ne contenant plus qu'une seule Cys, activés par du 2,2'-dithiodipyridine (2PDS) (Figure 52 page 89). La vitesse de formation des complexes covalents entre la scSrx activée et la scTrx est mesurée en suivant spectrophotométriquement la vitesse de libération du chromophore 2-thiopyridine à 343 nm.

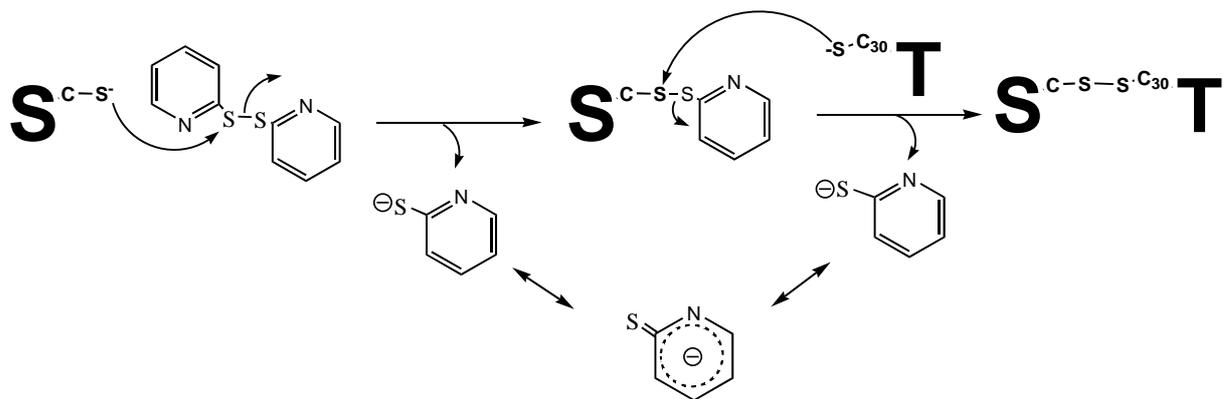


Figure 52 : Représentation schématique de l'activation chimique des variants de scSrx et de la formation d'un complexe covalent artificiel scSrx/C33S scTrx.

L'ajout de 2PDS permet l'activation chimique de l'unique Cys de C48A-C106A scSrx ou de C84S/C106A scSrx (S) *via* la formation de l'adduit Cys-(2-thiopyridine). Après purification de l'adduit, la vitesse de formation du complexe artificiel scSrx/C33S scTrx est suivie par la libération concomitante du 2-thiopyridine, après ajout de Trx (T).

Les résultats obtenus montrent que la constante de vitesse de second ordre de formation du complexe C84S-C106A scSrx/C33S scTrx est 6 fois plus élevée que celle de formation du complexe C48A-C106A scSrx/C33S scTrx (publication 2, Figure 6 page 108). Ceci suggère que la Cys de recyclage (Cys48) est la Cys formant le pont disulfure transitoire avec la Trx lors de la réduction de scSrx_{ox}. De plus, les courbes mesurant la réactivité des Cys de la Srx libre vis-à-vis du 2PDS en fonction du pH (Figure 53 page 90) montrent des

Résultats II : Recyclage de Srx

pK_{app} de 7,39 +/- 0,05 pour la Cys84 et de 8,49 +/- 0,06 pour la Cys48. Si on considère que lors de la formation du complexe Srx/Trx, les pK_{app} sont inchangés, vu le pK_{app} de la Cys84 qui est plus bas que celui de la Cys48, la Cys84 serait un meilleur groupement partant que la Cys48. Ceci conforte l'idée que la réduction de $scSrx_{ox}$ par la Trx se fait *via* une attaque sur la Cys48 du pont disulfure C48/C84.

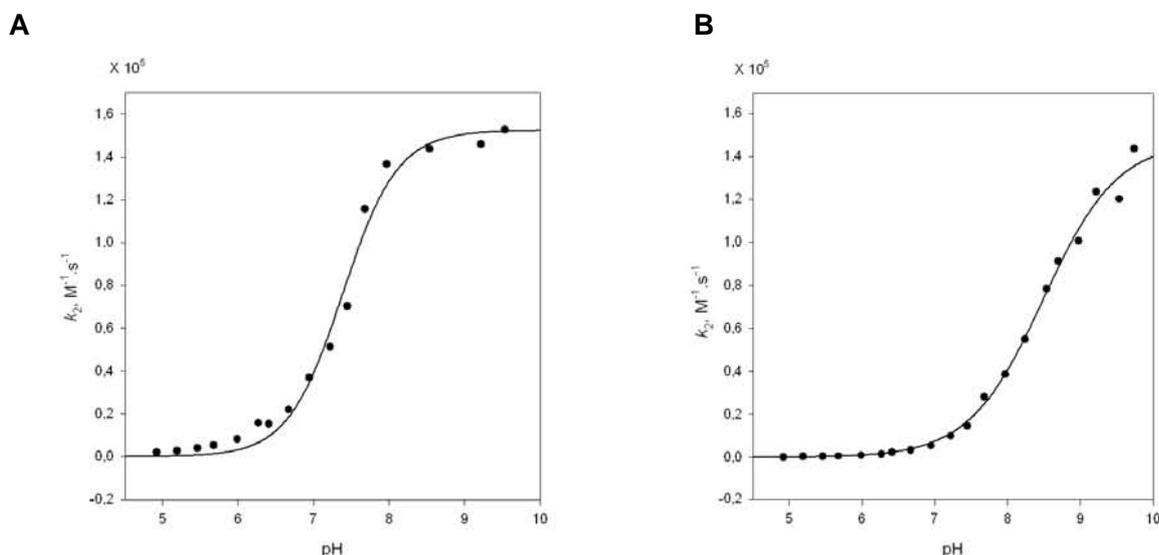


Figure 53 : Variation de la constante de second-ordre k_2 de la réaction des groupements thiols des variants C48A (A) et C84A (B) de scSrx avec le 2PDS, en fonction du pH.

Les expériences ont été réalisées à 25°C avec un polytampon Tricine 120 mM, Imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM de pH 5 à 9,75. Pour chaque expérience, la concentration en scSrx est de 6,2 μM et celle de 2PDS est de 250 μM . Les valeurs de k_2 mesurées sont ajustées à l'équation d'une monosigmoïde $k_2 = k' / (1 + 10^{pK_{app}-pH})$ et les paramètres obtenus sont :

(A) $pK_{app} = 7,39 \pm 0,05$ et $k' = (1,52 \pm 0,05) \cdot 10^5 M^{-1}.s^{-1}$; (B) $pK_{app} = 8,49 \pm 0,06$ et $k' = (1,47 \pm 0,06) \cdot 10^5 M^{-1}.s^{-1}$.

B. Publication 2.

Xavier Roussel, Alexandre Kriznik, Christelle Richard, Sophie Rahuel-Clermont et Guy Branlant. Trx-dependent recycling of the *Saccharomyces cerevisiae* Sulfiredoxin activity. (en soumission)

Pages 91 à 109.

THE CATALYTIC MECHANISM OF SULFIREDOXIN FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PASSES THROUGH AN OXIDIZED DISULFIDE SRX INTERMEDIATE THAT IS REDUCED BY THIOREDOXIN

Xavier Roussel, Alexandre Kriznik, Christelle Richard, Sophie Rahuel-Clermont* and Guy Branlant

From the Unité Mixte de Recherche CNRS-UHP 7214 AREMS, ARN-RNP structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. Address correspondence to: S. Rahuel-Clermont, Tel. (33)3 83 68 43 12, Fax (33)3 83 68 43 07, E-mail sophie.rahuel@maem.uhp-nancy.fr

Running Head: Recycling of the *S. cerevisiae* Srx activity

Sulfiredoxin catalyzes the ATP-dependent reduction of overoxidized eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin PrxSO₂, into sulfenic PrxSOH. Recent mechanistic studies on sulfiredoxins have validated a catalytic mechanism which includes formation of a phosphoryl intermediate on the sulfinyl moiety of PrxSO₂, followed by an attack of the catalytic cysteine of sulfiredoxin on the phosphoryl intermediate that leads to formation of a thiosulfinate intermediate PrxSO-S-Sulfiredoxin. Formation of this intermediate implies the recycling of sulfiredoxin into the reduced form. In the present study, we have investigated how the reductase activity of the *Saccharomyces cerevisiae* sulfiredoxin is regenerated. The results show that an oxidized sulfiredoxin under disulfide state is formed between the catalytic Cys84 and Cys48. This oxidized sulfiredoxin species is shown to be 1) catalytically competent along the sulfiredoxin-recycling process and 2) reduced selectively by thioredoxin. The lack of Cys48 in the mammalian sulfiredoxins and the low efficiency of reduction of the thiosulfinate intermediate by thioredoxin suggest a recycling mechanism in mammals different from that of sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae*.

A growing number of studies have shown the importance of the versatility of Cys redox biochemistry in the regulation of

various cellular processes such as catalysis, metal binding or signal transduction (1). The typical eukaryotic 2-Cys-peroxiredoxins (Prx) represent a family of proteins that exemplifies these mechanisms, as these thiol peroxidases have been described under six redox states of the essential Cys residue, from -II to +IV. For example, the Cys under reduced, disulfide, and sulfenic forms (oxidation states -II, -I and 0, respectively) are involved in the catalytic mechanism of Prx as peroxidase enzymes (2-5), the disulfide and sulfenic states in their function as redox sensor (6, 7), and the sulfinic (+II) and sulfonic (+IV) states in possible chaperon-like function (8, 9). Cysteine under the sulfinic state +II (PrxSO₂) is formed by a mechanism of escape of the reactive sulfenic acid intermediate during the catalytic peroxidase cycle (5, 10). This overoxidation constitutes a post-translational modification which is thought to afford a regulation mechanism between these different functions depending on the oxidative stress conditions. In addition, Prxs are also subject to other post-translational modifications by phosphorylation and N-acetylation (11, 12).

In contrast to Cys under -I and 0 oxidation states, the Cys under sulfinate state is not reducible by cellular thiols such as glutathione and thioredoxin (Trx). Therefore, regulation of Prx functions is dependent on a sulfinyl reductase referred to as Sulfiredoxin (Srx), which catalyzes the ATP-dependent reduction of PrxSO₂ into sulfenic Prx (PrxSOH) (13-15). Although the sestrin family of human proteins were initially proposed to possess this activity, the Srxs appear to be

Résultats II : Recyclage de Srx

the only enzymes with sulfinyl reductase activity (16). Recent mechanistic studies on Srx from *Saccharomyces cerevisiae* and human origin support a mechanism in which the sulfinic moiety of the PrxSO₂ substrate is first activated by formation of an anhydride bond with the γ -phosphate of ATP, leading to a phosphoryl sulfinic intermediate, followed by attack of Srx catalytic Cys which results in a thiosulfinate intermediate PrxSO-SSrx (oxidation state of Prx Cys +1)(Figure 1) (17-19). Such a mechanism implies the recycling of Srx into the reduced form.

In the case of *S. cerevisiae* Srx, one product of the reaction with PrxSO₂ and ATP in the absence of added reductant was a monomeric form of Srx oxidized under a disulfide state (17). In addition, Trx was shown to act as a reductant in the catalytic cycle at a rate that is not limiting compared to the rate of the first steps of the reaction (17). Thus, several questions have to be addressed regarding the mechanism of the recycling process of Srx. First, what is the mechanism of the recycling of Srx from *S. cerevisiae*? In particular, what is the intermediate species targeted by Trx? Is it the thiosulfinate species or a disulfide species? Second, if a disulfide species is involved, which of Cys48 or Cys106 forms a disulfide bond with the catalytic Cys84? Third, what is the nature of the recycling reductant for mouse and human Srxs, in which cysteine residues equivalent to Cys48 and Cys106 are not present?

To address these questions, we have 1) determine the steady state rate of the reaction catalyzed by *S. cerevisiae* wild-type Srx and C48A, C106A and C48A-C106A Srxs in the presence of dithiothreitol (DTT) and Trx, 2) show that a disulfide bond between Cys84 and Cys48 is efficiently formed; and 3) determine the kinetic parameters of reduction of oxidized Cys48/Cys84 Srx by Trx and characterized the cysteine in oxidized Srx that is attacked by the catalytic cysteine of Trx. Together, the data, combined with previous kinetic studies, show that 1) oxidized Cys48/Cys84 Srx is a catalytically competent species along the Srx recycling

process and, 2) Trx forms an efficient binary complex with oxidized Cys48/Cys84 Srx and reduces the oxidized Srx, likely *via* formation of a transient interdisulfide bond with the recycling Cys48. This cysteine is located in an extra sequence of 18 amino-acids that is not present in mammalian Srxs. The data also show that Trx does not reduce efficiently oxidized Srx under the thiosulfinate state. This is consistent with the hypothesis that another reductant is involved in the recycling of the mammalian Srx activity *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials- Tris was from VWR (West Chester, PA, USA). KCl and MgCl₂ were from Merck (Darmstadt, Germany), NADPH was obtained from Roche (Basel, Switzerland), DTT from Euromedex (Souffelweyersheim, France). ATP, MES, iodoacetamide (IAM), 2-pyridyl disulfide (2PDS), and 5,5'-dithiobis(2 nitro) benzoate were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Trifluoroacetic acid and ^{m7}guanosine (^{m7}Guo) were from Fluka.

Trxs 1 from *Escherichia coli*, NADPH Trx reductase (NTR) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *E. coli*, the Tsa1 Prx, its overoxidized form PrxSO₂ and Srx from *S. cerevisiae* were prepared following experimental procedures described previously (17, 20, 21). The Trx 1 from *S. cerevisiae* was obtained by cloning the *trx1* open reading frame amplified by PCR (GC-rich system, Roche, Basel, Switzerland) using *S. cerevisiae* W303 genomic DNA as template, into the pET20b(+) plasmid between the *NdeI* and *SacI* sites. The forward primer contained an *NdeI* restriction site and the reverse primer contained a *SacI* restriction site (sequences of oligonucleotides not shown). The C33S variant of *S. cerevisiae* Trx was generated by standard PCR-mediated site-directed mutagenesis. Both wild-type and mutant *S. cerevisiae* Trxs were expressed and purified using the same procedure as *E. coli* Trx 1.

The Srx variants C48S and C106A were obtained by standard PCR-mediated site-directed mutagenesis, expressed and purified as the wild type Srx. The C106S variant was not used because it was produced in a non-soluble form.

Steady state kinetics- The reaction was followed in the steady state as described previously using Trx as reductant and the Trx recycling system as a coupled assay, or by following the kinetics of Pi release using the PNP coupled assay (17). Briefly, the decrease of the emission fluorescence intensity associated with the phosphorolysis of ^{m7}Guo catalyzed by PNP was recorded at 30°C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics, Leatherhead, UK) fitted for fluorescence measurements, with the excitation wavelength set at 305 nm, and the emitted light collected above 455 nm using a cutoff filter. The steady state rate constant was obtained by measurement of initial rate in the presence of reductant, after calibration of the fluorescence signal against Pi concentration.

Kinetics of formation of the oxidized Srx species followed by reversed phase chromatography- Reaction mixtures containing 20 μM wild type Srx, 100 μM C171A PrxSO₂, 1 mM ATP and 1 mM MgCl₂ were incubated for increasing times in Tris 50 mM, KCl 100 mM buffer pH 7 (TK buffer) at 30°C. Aliquots were quenched by trifluoroacetic acid 0,1% and analyzed by reverse phase liquid chromatography on an Aquapore RP-300 (C8) column, 4.6x100 mm, 7 μm (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), coupled to the ÄKTA explorer system monitored by UV spectrophotometry (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), as previously described (17).

Kinetics of reduction of the Cys48/Cys84 Srx disulfide bond by Trx- Oxidation of C106A Srx was carried out in TK buffer at 30°C, by incubation of 250 μM C106A Srx with 5 mM H₂O₂ followed by two additions of 5 mM H₂O₂ at 10 min intervals. The oxidized protein was then purified by gel filtration chromatography on a HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) connected to a fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare) equilibrated with buffer TK. Complete formation of the Cys48/Cys84 Srx disulfide bond was checked by titration

of the protein with 5,5'-dithiobis(2 nitro) benzoate under denaturing conditions (1% SDS).

Kinetics of reduction of the Cys48/Cys84 disulfide bond by Trx were followed on a stopped-flow apparatus by monitoring the quenching of fluorescence intensity of Trx upon going from the reduced to oxidized forms (22). The excitation wavelength was set at 295 nm, and the emitted light was collected using a 320 nm cut-off filter. One syringe contained oxidized Cys48/Cys84 Srx in buffer TK (10 μM, final concentration after mixing), and the other one contained the reduced Trx at various concentration in buffer TK (20 to 500 μM, final concentrations). An average of at least three runs was recorded for each concentration of Trx. Rate constants k_{obs} , were obtained by fitting fluorescence traces against Equation 1 by non-linear regression analysis, in which c represents the endpoint, a , the amplitude of the signal and k_{obs} the rate constant.

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

Data were then fitted by non-linear regression analysis to Equation 2, where S represents the Trx concentration, K_S the apparent affinity constant and k_{obsmax} the maximum rate constant at saturation.

Kinetics of Trx reaction on Srx activated as 2-thiopyridine mixed disulfide- C48A-C106A and C84A-C106A Srxs were activated on Cys84 and Cys48, respectively, as 2-thiopyridine mixed disulfide by mixing 100 μM Srx with 500 μM 2PDS in buffer TK. Formation of the mixed disulfide on Cys48 or Cys84 was monitored by following the increase of the absorbance at 343 nm. After 5 min of incubation at room temperature, Srx-(2-thiopyridine) was purified by gel filtration chromatography on a HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) connected to a fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare) equilibrated with buffer TK, in order to remove 2-thiopyridine released and excess 2PDS. Fractions containing Srx activated either on Cys48 or Cys84 by a mixed disulfide with 2-thiopyridine were checked by following the

Résultats II : Recyclage de Srx

amount of pyridine 2-thiolate released at 343 nm after addition of excess of DTT.

The rate of formation of the intermolecular disulfide bond between Srx-(2-thiopyridine) and C33S Trx was measured spectrophotometrically by monitoring the release of pyridine 2-thiolate at 343 nm. Experiments were carried out at 30°C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for absorbance measurements. Kinetics were measured by mixing 10 μ M Srx-(2-thiopyridine)(final concentration) and variable concentration of C33S Trx (from 50 to 500 μ M, final concentrations) in buffer TK. Rate constants k_{obs} , were obtained by fitting absorbance traces to Equation 1. Data were then fitted by non-linear regression analysis to Equation 2.

$$k_{obs} = k_{obsmax} \cdot S / (K_S + S) \quad (2)$$

RESULTS

Steady state rate of the reaction catalyzed by wild-type and mutated Srxs in the presence of various thiol reductants- The kinetics of the reaction in the presence of various reductants were determined for the wild-type and mutated Srxs. Comparison of the traces obtained by following the release of Pi using the PNP coupled assay, in the presence of Trx or DTT as reductant, is shown for wild-type and C48A-C106A Srxs on Figure 2. The traces observed in the absence of reductant are also shown as a control. Because only the *E. coli* NTR was available and is not capable of recycling efficiently Trx1 from *S. cerevisiae* (data not shown), *E. coli* Trx1 was used. Therefore, unless otherwise stated, the Trx used corresponds to *E. coli* Trx1. As described in a previous study by our group (17), the trace is best described by a monoexponential process with a rate constant corresponding to the formation of the thiosulfinate intermediate, of 2.2 ± 0.4 and $1.5 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ for wild-type and C48A-C106A Srxs using C171A PrxSO₂ as substrate, respectively. Similar results were obtained using the wild-type

substrate. For wild-type Srx, in the presence of reductant, i.e. under turnover conditions, the progress curves show an initial linear phase followed by a slowing down of the process (Figure 2A). The total amplitude of Pi production largely exceeds the Srx concentration, indicating that the process observed corresponds to several enzymatic cycles. Therefore, the steady state rate of the reaction could be measured from the initial slope. Very similar rates were determined for wild-type Srx using Trx or DTT, i.e. 1.7 ± 0.1 and $2.2 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$, and corresponded to the rate measured using the Trx/NTR assay ($1.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$). For the C48A-C106A Srx, similar trace as for the wild type was observed in the presence of DTT, with an initial rate constant of $1.2 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$. In contrast, using Trx as reductant, the kinetics were best described by an exponential process with rate and amplitude similar to the control, followed by a slower steady state linear phase with rate constant of $0.25 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$ (Figure 2B). The steady state rates obtained with Trx by the Trx/NTR assay and with DTT by the PNP assay are summarized in Table 1 for wild-type, C48S, C106A and C48A-C106A Srxs. In contrast to the reaction using DTT as reductant, reduction by Trx is about 10-times slower for the C48S and C48A-C106A Srxs, unlike for the wild-type and the C106S Srxs.

SDS-PAGE analysis of the species formed during the reaction of wild-type and mutated Srxs- Using mass spectrometry, we have shown previously that in the absence of added thiol reductant, the Srx-catalyzed reaction released a monomeric oxidized form of Srx with an intramolecular disulfide bond between the catalytic Cys84 and another Cys. Formation of oxidized Srx is revealed by an additional band migrating slightly faster than the Srx band on SDS-PAGE gels (17). To identify this residue, the products of the reaction of the single Srx variants C48S and C106A and of PrxSO₂ in the presence of ATP/Mg were analyzed by SDS-PAGE, in the absence of reductant (Figure 3). In these conditions, a disulfide Prx-Srx species, which was shown to be a byproduct due the reactivity of the thiosulfinate intermediate, migrates with an apparent molecular weight of

~45 kDa (17). The additional band corresponding to oxidized Srx is observed for the wild-type and C106A Srxs, but is absent from the products of the reaction of C48S Srx (Figure 3). Therefore, the monomeric oxidized form of Srx is due to a disulfide bond formed specifically between Cys84 and Cys48.

Kinetics of formation of the oxidized Cys48/Cys84 Srx species- The formation of the monomeric oxidized Cys48/Cys84 Srx during the catalytic reaction suggested that the former might act as a catalytic intermediate and thus as the target of Trx. Therefore, we addressed the question of the kinetic competency of the oxidized Cys48/Cys84 Srx species, by following the kinetics of formation of this reaction product. As shown on Figure 4A, the oxidized disulfide Srx could be resolved from the reduced form by reverse-phase chromatography. Thus, the kinetics of evolution of the area of the chromatographic peak corresponding to oxidized Srx were recorded after reaction of wild-type Srx with PrxSO₂ in the presence of ATP, quenched by acidification. Single turnover conditions were used, *i.e.* absence of reductant and excess PrxSO₂ relative to Srx, to allow the determination of the rate constant of formation of the species. As shown in Fig. 4B, in these conditions, the reaction follows pseudo first-order kinetics, characterized by a rate constant of $1.8 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$.

Kinetics of the reaction of oxidized Cys48/Cys84 Srx with Trx- In order to study the reaction of oxidized Cys48/Cys84 Srx with Trx, preparation of oxidized Srx was set up using the C106A Srx to avoid any side reaction due to Cys106 reactivity. Oxidized Srx was prepared artificially by chemical activation of one Cys residue to promote formation of the disulfide bond. Three successive 10 min-incubations of 5 mM H₂O₂ at 30°C resulted in complete oxidation of Srx, mainly in a monomeric form as judged by the shift of the monomeric Srx band on SDS-PAGE, with a fraction of dimeric Srx-

Srx complex. After separation by gel filtration, the monomeric fraction did not contain any free reactive thiol group, as measured by titration using 5,5'-dithiobis(2 nitro) benzoate.

In order to test the potential role of Trx as reductant, the rate of reduction of oxidized Cys48/Cys84 Srx with Trx was measured by following the decrease of Trx fluorescence associated with the formation of the intramolecular disulfide bond (21). The reaction of oxidized Cys48/Cys84 Srx with an excess of Trx was followed by rapid kinetics, and corresponded to a pseudo first order process best described by a monoexponential equation with a rate constant k_{obs} comprised between 8 and 76 s⁻¹ depending on Trx concentration (Figure 5). The variation of k_{obs} vs. Trx concentration shows a hyperbolic saturation profile. Assuming binding of reduced Trx to oxidized Cys48/Cys84 is rapid equilibrium, this profile could be interpreted by non linear regression against equation (2), giving a K_S value of $210 \pm 30 \mu\text{M}$ and a k_{obsmax} value of $105 \pm 7 \text{ s}^{-1}$, corresponding to a second order rate constant of $5.10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Similar results were obtained with the Trx1 from *S. cerevisiae* which gave a K_S of $56 \pm 15 \mu\text{M}$ and a k_{obsmax} value of $27 \pm 3 \text{ s}^{-1}$. The fact that the curve passes through the origin suggested that the process up to the disulfide exchange, monitored by Trx fluorescence, can be considered as irreversible (22). This is in accord with the fact that the redox potential of oxidized/reduced Srx is -0.16 V (Roussel, unpublished data), largely higher than the redox potential of Trx.

The kinetics of reduction of oxidized Cys48/Cys84 Srx were also determined under steady-state conditions in the presence of NTR from *E. coli*. However, due to the concentration of NADPH used in the enzymatic coupled assay, which was limited by the absorbance at 340 nm, the concentrations of Trx used were not sufficiently high to be completely saturating. At the highest possible concentration of 125 μM of Trx tested, the k_{obs} value measured was of 2.0 s⁻¹ that is 20-fold lower than the rate measured under single turnover conditions. Accordingly, the second-order rate constant k_2 , that is the slope of the k_{obs} rate constant plotted against the Trx concentration, is 30-fold lower than the corresponding k_2 value

Résultats II : Recyclage de Srx

determined under single turn-over conditions (curves not shown). Together, this supports an overall rate-limiting step of the Trx reduction occurring after the two-electron chemical process and likely associated with the release of oxidized Trx from the binary complex with reduced Srx. Anyway, the overall rate of reduction of Cys48/Cys84 Srx by Trx under steady-state conditions remains largely higher than 1) the overall rate measured for the Srx-catalyzed PrxSO₂ reduction under steady-state conditions in the presence of Trx, by at least a factor of 60 (2 s⁻¹ vs. 2 min⁻¹) and; 2) the rate of reduction of the thiosulfinate intermediate by Trx, measured using C48S and C48A-C106A Srxs, by at least a factor of 600 (2 s⁻¹ vs. 0.2 min⁻¹).

Kinetic identification of the Cys residue of oxidized Srx targeted by Trx- To identify which Cys in oxidized Cys48/Cys84 Srx is targeted by *S. cerevisiae* Trx, we prepared two forms of Srxs activated as mixed disulfide either on Cys48 or Cys84 with 2-thiopyridine (referred to as SrxC48(2-thiopyridine) and SrxC84(2-thiopyridine)), by reacting C48A-C106A Srx or C84A-C106A Srx with excess of 2-PDS. Released pyridine 2-thiolate, excess of 2-PDS and a minor fraction of Srx dimer formed were then removed by gel filtration. Trx C33S was used to avoid any non specific reaction of the regeneration Cys of Trx. As shown in Figure 6B, the rate of the reaction between the activated Srxs and C33S Trx depended linearly on C33S Trx concentration up to 500 μM for the SrxC48(2-thiopyridine) while a saturation effect was observed for SrxC84(2-thiopyridine). Second order rate constants of 1.16.10⁵ and 2.2.10⁴ M⁻¹.s⁻¹ were deduced from the slope or from the k_{obsmax}/Ks ratio, respectively for Srx activated on Cys48 and Cys84.

DISCUSSION

In a previous study on the Srx catalytic mechanism (17), we addressed the question of the catalysis of the first steps of the reaction and established the

formation of the thiosulfinate PrxSO-SSrx species involving the catalytic Cys residues of each partner, as a catalytically competent intermediate. Due to the reactivity of this species towards thiol groups resulting in several by-products, accumulation and observation of the thiosulfinate species were possible using variants of both Prx and Srx retaining only the catalytic Cys residues, and under experimental conditions devoid of any external reductant. When wild-type Srx was used, one product of the reaction with PrxSO₂ and ATP was a monomeric form of Srx with an intramolecular disulfide bond, as shown by high resolution mass spectrometry analysis coupled to reverse phase liquid chromatography and by SDS-PAGE (17). Indeed, this species can be resolved by SDS-PAGE as a band migrating slightly faster than reduced Srx, and by reverse phase chromatography (Figures 3 and 4A). To address the question of the relevance of this species in catalysis, further characterization was carried out by SDS-PAGE using the mutated C48A and C106S Srxs. As shown in Figure 3, in the absence of external reductant, a band migrating slightly faster than the reduced Srx was also observed but only with C106S Srx. This shows that a disulfide bond between Cys48 and Cys84 is specifically formed in Srx after reaction with PrxSO₂ and ATP.

The question now arises regarding which of the two species, *i.e.* the oxidized Cys48/Cys84 Srx or the thiosulfinate species, is the catalytically competent intermediate along the Trx-recycling process. In a first approach, the catalytic competency of oxidized Cys48/Cys84 Srx was investigated by comparing the rate constant of formation of this species, to the steady state rate constant. A value of 1.8 ± 0.3 min⁻¹ was measured for the production of this species during the reaction catalyzed by Srx in the absence of added reductant, equal to the rate of formation of the thiosulfinate intermediate. Therefore, it can be concluded that in the absence of thiol reductant, the Cys48 of Srx attacks the Cys84 within the thiosulfinate intermediate at a rate which is limited by the rate of formation of the thiosulfinate intermediate. In other words, the thiosulfinate species does not accumulate and as soon as it is formed, it is transformed into

PrxSOH and oxidized Cys48/Cys84 Srx. The oxidized Cys48/Cys84 Srx could thus potentially behave as a catalytic intermediate in the *S. cerevisiae* Srx reaction.

Furthermore, comparison of the steady-state rate constants of the Srx-catalyzed reaction in the presence of DTT or Trx shows that, in contrast to the reaction using DTT as a reductant, reduction by Trx appears to be rate-limiting for the C48S and C48A-C106A Srxs, unlike for the wild-type and the C106S Srxs. Indeed, in the presence of Trx, the k_{cat} value for the C48S and C48A-C106A Srxs is $\sim 0.2 \text{ min}^{-1}$, that is 10-fold lower compared to the wild type. These results show that the target of Trx in the catalytic cycle of the wild-type Srx is the oxidized Cys48/Cys84 Srx and not the thiosulfinate intermediate. Indeed, assuming the latter hypothesis, the value of the overall rate for the wild-type Srx should have been 0.2 min^{-1} and not 2 min^{-1} .

The fact that the rate of the recycling of the wild-type Srx activity in the presence of Trx was not limiting, suggested formation of an efficient binary complex between the oxidized Cys48/Cys84 Srx and Trx. To prove that, and because the rate-limiting step in the wild type precedes the Trx-recycling process and thus prevents access to the kinetic parameters of the Trx-recycling steps, the oxidized Srx species was prepared by oxidation of the C106S Srx by H_2O_2 . The kinetic parameters of its reduction by Trx were determined. The apparent affinity constants for *S. cerevisiae* and *E. coli* Trx1 determined under single turn-over conditions are $56 \mu\text{M}$ and $210 \mu\text{M}$, respectively, that is indicative of specific recognition interactions between oxidized Cys48/Cys84 Srx and Trx. Consequently, the reduction of oxidized Srx by Trx is highly efficient, with second order rate constant of $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Moreover, the overall steady state rate of reduction of oxidized Cys48/Cys84 Srx by *E. coli* Trx is largely higher than the overall rate of wild-type Srx-catalyzed reaction measured under steady-state conditions in the presence of Trx. A possible role of the

glutathione/glutaredoxin1 from *E. coli* (GSH/Grx) was considered by comparing the rate of reduction of the oxidized Srx species by Trx and GSH/Grx measured in steady state conditions (i.e. in the presence of excess NADPH and Trx or glutathione reductase, respectively). A 20-fold higher value was obtained for Trx ($100 \mu\text{M}$) than for GSH/Grx ($5 \text{ mM}/100 \mu\text{M}$). Altogether, these results support Trx as being the preferred cellular reductant of Srx in *S. cerevisiae*. This conclusion is supported by results obtained *in vivo* using *S. cerevisiae* strains impaired in the Trx system, which show significantly modified oxidation profiles of Srx compared to the wild-type strain while similar profiles are observed using a strain producing 100-fold less GSH than the wild type (23).

This interpretation is also fully consistent with the rate of reduction of the thiosulfinate intermediate by Trx measured using C48S and C48A-C106A Srxs, which are largely lower than the corresponding value for oxidized Cys48/Cys84 Srx by a factor of 600, and definitely exclude the thiosulfinate species as a target of Trx in *S. cerevisiae*. In addition, the fact that Trx attacks SrxC48(2-thiopyridine) more efficiently than SrxC84(2-thiopyridine) supports an attack of Trx on Cys48 within the Srx Cys48/Cys84 disulfide bond. This is another piece of evidence, although indirect, that the thiosulfinate species, which is formed between Prx catalytic Cys and Srx Cys84, is not the specific target of Trx in Srx mechanism.

Sequence alignments of Srx from various origins show that Cys48 is only present in some yeasts related to *S. cerevisiae*, and is included within an extra sequence of 18 amino-acids. The fact that the formation of the disulfide bond between Cys48 and Cys84 is rate-limited by the rate of formation of the thiosulfinate species supports an efficient formation of the Cys48/Cys84 disulfide bond. As the Cys84 is located at the N-terminus of an α helix, this suggests a great flexibility of the extra sequence containing Cys48. In this regard, the determination of the 3D structure of Srx from *S. cerevisiae* which is currently in progress will be informative.

The lack of residue corresponding to Cys48 in the mammalian enzymes implies that Srxs from mammalian sources operate

Résultats II : Recyclage de Srx

via a catalytic recycling mechanism distinct from that of Srx from *S. cerevisiae*. Since an intramolecular disulfide bond cannot be formed, the recycling process of the mammalian Srxs should occur by a direct attack of the thiol reductant on the Srx Cys84 of the thiosulfinate intermediate. Consequently, this raises the question of the nature of the physiological reductant of Srx in mammalian cells. The fact that 1) the rate of reduction by Trx of the thiosulfinate species in C48S Srx from *S. cerevisiae* is very low i.e. 0.2 min^{-1} and becomes rate-limiting compared to the wild type and; 2) the rate of reduction by Trx of the thiosulfinate species in human/mouse Srx is also very low and in the same range (24, 25, Roussel, unpublished data) and is rate-limiting while that of formation of the thiosulfinate species is close to 2 min^{-1} (19; Roussel, unpublished data), argues against a role of Trx in recycling the Srx activity in mammals. This is in accord with the data reported by Bondareva *et al.*, (26) who observed that the cellular response to thioredoxin reductase gene disruption differs between yeast and mice cells, which induce Prx vs. Srx mRNA, respectively. As mentioned above, inactivation of the Trx-recycling system in yeast probably impairs Srx function, which in return would be compensated by induction of Prx expression. This is also in agreement with the fact that Trx likely recycles the activity of the Srx from *S. cerevisiae* via an attack on Cys48, which is not present in mammalian Srxs, and not on Cys84. Therefore, other reductants like e.g. glutathione have to be involved. With this type of reductant, the recycling of Srx activity will also occur through release of PrxOH and Srx, as a covalent SrxC84-reductant mixed disulfide species that has then to be reduced to release Srx under reduced form. Preliminary experiments using the *S. cerevisiae* C48S Srx as a

model for mammalian Srx showed that in the presence of GSH, Grx1 and its recycling system glutathione reductase/NADPH, the steady state rate constant of the C48S Srx-catalyzed reaction was 0.5 min^{-1} . Therefore, the GSH/Grx system might reduce the thiosulfinate intermediate more efficiently than Trx, although at rate limiting for the overall reaction. This could also explain why expression of C48S Srx in ΔSrx *S. cerevisiae* cells only results in a minor effect on the growth phenotype after cell treatment with H_2O_2 (23).

CONCLUSION

Based on the present and previous studies, we propose the following scenario for the *S. cerevisiae* Srx catalytic mechanism (Figure 7): the first two steps of the reaction, which consist of phosphate transfer on PrxSO₂ and of formation of the PrxSO-SSrx thiosulfinate intermediate, proceed at a limiting rate of 1.8 min^{-1} . Then, an efficient recycling process, at a rate that is limited by the rate leading to formation of the thiosulfinate species, occurs with 1) release of Prx under the sulfenic acid state and of oxidized Cys48/Cys84 Srx followed by, 2) formation of a complex between Trx and oxidized Cys48/Cys84 Srx and reduction of Srx by Trx via an attack of the catalytic Cys30 of Trx on the Cys48 of the disulfide bond Cys48/Cys84. Such a mechanism implies the interplay of at least two protein partners with Srx in *S. cerevisiae* and raises the question of the dynamics that must take place within Srx upon interaction with its substrate PrxSO₂ and its reductant Trx. The fact that Trx is not capable to reduce efficiently the thiosulfinate intermediate from *S. cerevisiae* and mammalian sources argues in favor of the involvement of a distinct reductant in the recycling process of mammalian Srxs.

REFERENCES

1. Reddie, K. G., and Carroll, K. S. (2008) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 746-54
2. Kang, S. W., Baines, I.C., and Rhee, S. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6303-6311
3. Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H., and Nakayama, K. (2000) *Biochem. J.*

- 351**, 107-114
4. Baker, L. M., and Poole, L. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9203-9211
 5. Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) *Trends Biochem. Sci.* **28** 32-40
 6. Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) *Cell* **111**, 471-481
 7. Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004) *Trends Biochem. Sci.* **29** 351-357
 8. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) *Cell* **117**, 625-635
 9. Lim, J. C., Choi, H. I., Park, Y. S., Nam, H. W., Woo, H. A., Kwon, K. S., Kim, Y. S., Rhee, S. G., Kim, K., and Chae, H. Z. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 28873-28880
 10. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) *Science* **300**, 650-653
 11. Aran, M., Caporaletti, D., Senn, A. M., Tellez de Iñon, M. T., Girotti, M. R., Llera, A. S., and Wolosiuk, R. A. (2008) *FEBS J.* **275**, 1450-1463
 12. Seo, J. H., Lim, J.C., Lee, D. Y., Kim, K. S., Piszczek, G., Nam, H. W., Kim, Y. S., Ahn, T., Yun, C. H., Kim, K., Chock, P. B., and Chae, H. Z. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 13455-65
 13. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) *Nature* **425**, 980-984
 14. Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B., and Hidalgo, E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8875-8880
 15. Bozonet, S. M., Findlay, V. J., Day, A. M., Cameron, J., Veal, E. A., and Morgan, B. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 23319-23327
 16. Woo H. A., Bae S. H., Park S., and Rhee, S. G. (2009) *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 738-745
 17. Roussel, X., Bechade, G., Kriznik, A., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., Branlant, G., and Rahuel-Clermont, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 22371-82
 18. Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 23846-23851
 19. Jonsson, T. J., Tsang, A. W., Lowther, W. T., and Furdui, C. M. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 22890-22894
 20. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1233-1244
 21. Mulrooney, S. B., and Williams, C. H., Jr. (1997) *Protein Sci.* **6**, 2188-9
 22. Olry, A., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2004) *Biochemistry* **43**, 11616-11622
 23. Biteau, B. (2005) PhD thesis 2005PA112146, University of Paris-Sud, " la sulfirédoxine, une nouvelle enzyme illustrant les deux facettes biologiques de H₂O₂ : toxicité et signalisation ".
 24. Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50994-51001
 25. Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y., and Rhee, S. G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 14400-14407
 26. Bondareva, A. A., Capecchi, M. R., Iverson, S. V., Li, Y., Lopez, N. I., Lucas, O., Merrill, G. F., Prigge, J. R., Siders, A. M., Wakamiya, M., Wallin, S. L., and Schmidt, E. E. (2007) *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 911-23

FOOTNOTES

*We gratefully thank S. Boukhenouna for excellent assistance and Pr S. Boschi-Muller, Dr A. Guez, and Dr H. Mazon, for helpful discussions. This work was supported in part by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, and

Résultats II : Recyclage de Srx

by the French Agence Nationale de la Recherche (program ANR-06-BLAN-0369). X. Roussel was supported by the French Research Ministry.

The following abbreviations were used: 2-Cys-Prx: typical two-cysteine peroxiredoxin; Cys48/Cys84 Srx: oxidized Srx with Cys48-Cys84 intramolecular disulfide bond; DTT: 1,4-dithiothreitol; IAM: iodoacetamide; ^{me7}Guo: methyl-7 guanosine; NTR: *E.coli* NADPH thioredoxin reductase; 2PDS: 2-pyridyl disulfide; PNP: His-tagged purine nucleoside phosphorylase from *E. coli*; PrxSO₂: overoxidized *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1; Srx: sulfiredoxin; Trx: thioredoxin.

¹The rate-limiting step could be associated with formation of the sulfinylphosphoryl anhydride intermediate or to that of the thiosulfinate intermediate or to any conformational change of the Srx associated with these steps.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Srx catalytic mechanism. Srx catalyzes the reduction of the sulfinate function of PrxSO₂ via a phosphotransferase and a reductase step leading to a covalent thiosulfinate intermediate with Srx. The subsequent recycling of the Srx activity involves an external reductant R. P: Prx; S: Srx; C_P: peroxidatic Cys; C_R: regeneration Cys; C₈₄: Srx catalytic Cys; R: thiol reductant.

Figure 2 Kinetics of the reaction catalyzed by Srx monitored by Pi release. (A) The reaction of 10 μM wild-type Srx with 100 μM C171A PrxSO₂ in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ without added reductant (black) or in the presence of 50 mM DTT (light grey) or 235 μM Trx (dark grey) was monitored by the PNP coupled assay (see text). Reactions were carried out in buffer TK à 30°C. The progress curves are corrected from blank traces collected in the absence of Srx. Kinetics without reductant are described by an exponential process with a rate constant of 2.2 ± 0.4 min⁻¹ and an amplitude corresponding to 9 μM Pi released. In the presence of Trx or DTT as reductant, initial rate constants of 1.7 ± 0.1 and 2.2 ± 0.4 min⁻¹ are measured, respectively. (B) Comparison of the kinetics of Pi release for the reaction of C48A-C106A Srx (10 μM) with 100 μM C171A PrxSO₂ in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ without reductant (black) or in the presence 50 mM DTT (light grey) or 235 μM Trx (dark grey). Kinetics without reductant are described by an exponential process with a rate constant of 1.5 ± 0.3 min⁻¹ and an amplitude corresponding to 11 μM Pi released. The kinetics with Trx are described by an exponential process with a rate constant of 1.5 ± 0.7 min⁻¹ and an amplitude corresponding 13 μM Pi released, followed by a slower steady state linear phase with rate constants of 0.25 ± 0.07 min⁻¹. In the presence of DTT as reductant, an initial rate constant of 1.2 ± 0.2 min⁻¹ is measured.

Figure 3 Non reducing SDS-PAGE analysis of the species formed during the Srx-catalyzed reaction in the absence or presence of ATP. Equimolar concentrations of C171A PrxSO₂ and wild type (lanes 1,2), C106A (lanes 3,4) and C48S (lanes 5,6) Srxs (30 μM) were mixed in the absence (lane 1,3,5) or presence of 1 mM ATP-MgCl₂ for 10 min (lane 2,4,6), immediately followed by addition of 25 mM IAM and non-reducing SDS-PAGE fractionation. Reactions were carried out in buffer TK at 30 °C. The additional band migrating between the Prx monomer and Prx-Srx complex in lane 4 corresponds to a dimer of unspecifically oxidized Srx C106A.

Figure 4 Kinetics of formation of Cys48/Cys84 oxidized Srx species. The reaction of 100 μM wild-type PrxSO₂ with 10 μM wild-type Srx in the presence of 1 mM ATP and MgCl₂ was followed at 30°C by analysis of aliquots of the reaction mixture quenched by acidification in

trifluoroacetic acid 0.1%, by reverse phase chromatography, monitored by absorption spectrophotometry at 215 nm. (A) Chromatogram of the reaction mixture for the retention times corresponding to the Srx species after 15 s incubation (solid line) and 1 min incubation (dashed line). (B) Kinetics of the evolution of the area of the peak corresponding to the Cys48/Cys84 *S. cerevisiae* Srx species at 14.58 min () analyzed as a monoexponential process (solid line) with a rate constant of $1.8 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$.

Figure 5 Kinetics of reduction of the Cys48/Cys84 Srx disulfide bond by *E. coli* Trx. The Trx fluorescence quenching associated with disulfide bond formation was recorded on a stopped-flow apparatus at 30°C in buffer TK by mixing reduced Trx and Cys48/Cys84 oxidized C106A Srx (10 μM). Excitation wavelength was set at 295 nm, and emitted light was collected using a 320 nm cut-off filter. Data collected at various concentrations of reduced Trx were fitted to Equation 1. The deduced k_{obs} values plotted vs. Trx concentration () were then fitted against equation (2) which gave k_{obsmax} and K_S values of $105 \pm 7 \text{ s}^{-1}$ and $210 \pm 30 \mu\text{M}$ (solid line). Inset, typical time course obtained for 250 μM Trx.

Figure 6 Kinetics of reaction of Trx C33S with Srx activated by 2-thiopyridine. The reaction of 10 μM SrxC84(2-thiopyridine) (A) and SrxC48(2-thiopyridine) (B) with variable concentrations of *S. cerevisiae* Trx C33S was monitored on a rapid kinetics spectrophotometer by the release of pyridine 2-thiolate at 343 nm. Reactions were carried out in buffer TK at 30°C. Kinetic data (not shown) were fitted against Equation (1). The deduced k_{obs} values were plotted vs. Trx concentration (●). (A) The data were fitted against equation (2) which gave k_{obsmax} and K_S constants of 3.3 s^{-1} and 151 μM (solid line). (B) The data were fitted to a linear relationship (solid line) with a slope corresponding to a k_2 value of $1.16 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Figure 7 Proposed catalytic mechanism of Srx from *S. cerevisiae*. The recycling mechanism involves the attack of the Cys48 of Srx on the sulfur atom of Cys84 of the thiosulfinate intermediate, leading to the release of the oxidized Cys48/Cys84 Srx with intra-molecular disulfide bond and of the sulfenic acid PrxSOH product. The Cys48/Cys84 Srx is then reduced by attack of the Trx catalytic Cys on Cys48 to form a Trx-Srx mixed disulfide, followed by regeneration of reduced Srx by attack of the recycling Cys of Trx. P: Prx; S: Srx; C_P: peroxidatic Cys; C_R: regeneration Cys; C₈₄: Srx catalytic Cys; C₄₈: Srx regeneration Cys; T: thioredoxin.

Table 1: Steady state rate of the Srx-catalyzed reaction with wild-type, C48S, C106A, and C48A-C106A Srx. Reactions were carried out in buffer TK at 30°C with 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 100 μM C171A Prx and 5-10 μM Srx. The reactions were followed with Trx (50 μM) by the Trx/NTR assay, and with DTT (50 mM) by the PNP assay.

Table 1

Reducer	Wild type	C106A	C48S	C48A-C106A
Trx	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.18 ± 0.2	0.25 ± 0.7
DTT	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2

Figure 1

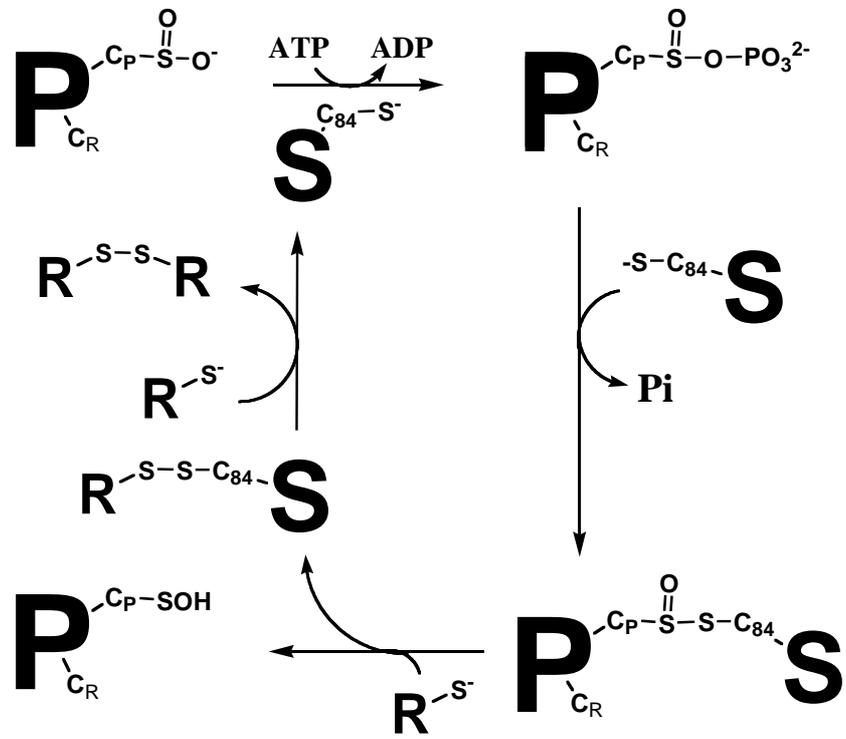


Figure 2

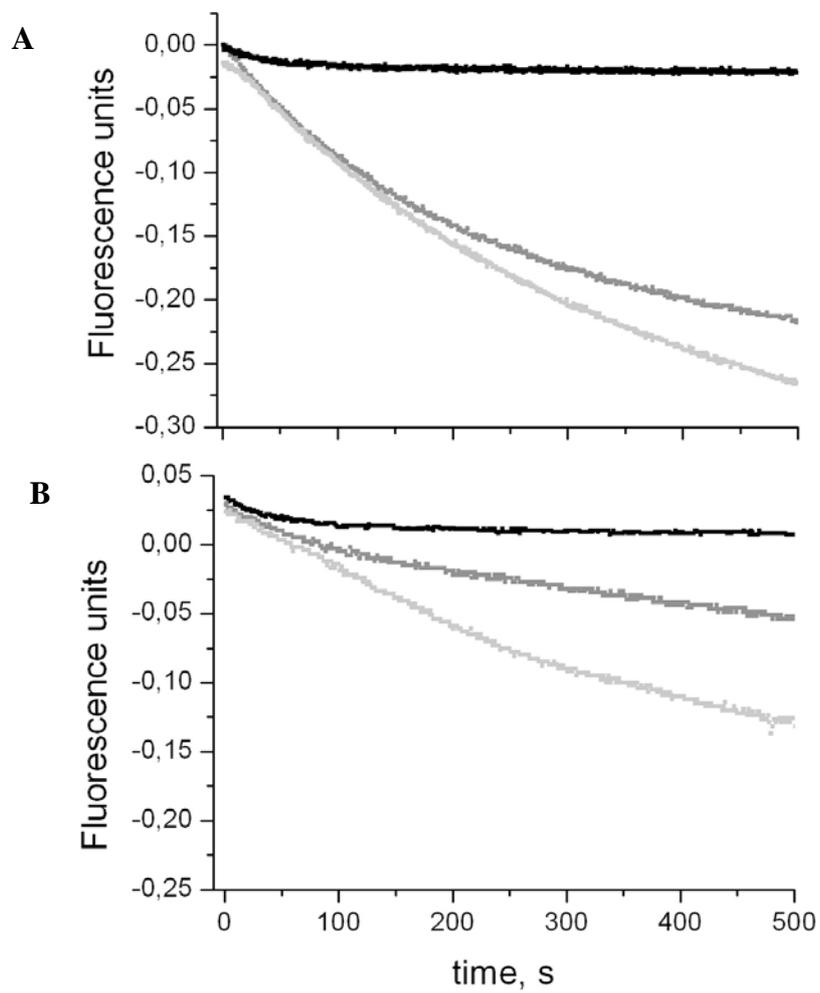


Figure 3

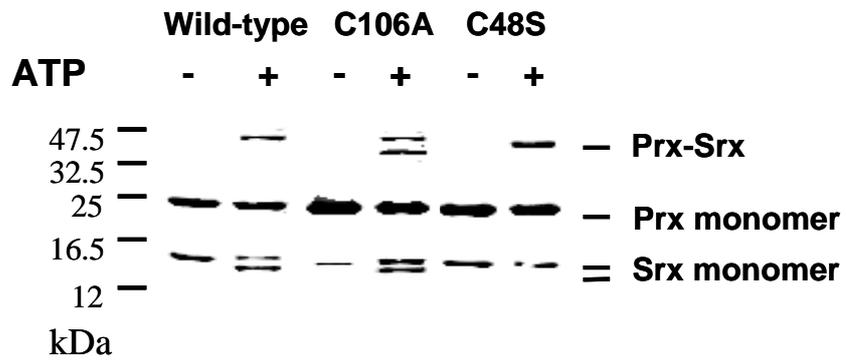
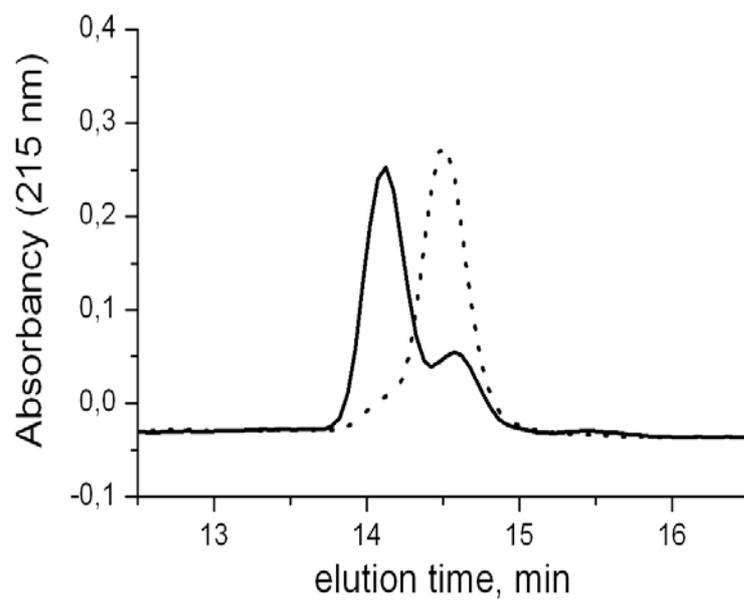


Figure 4

A



B

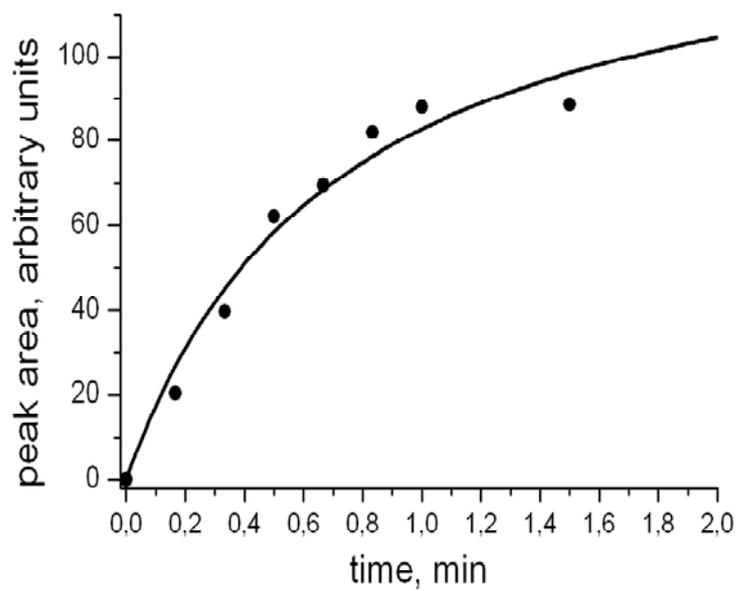


Figure 5

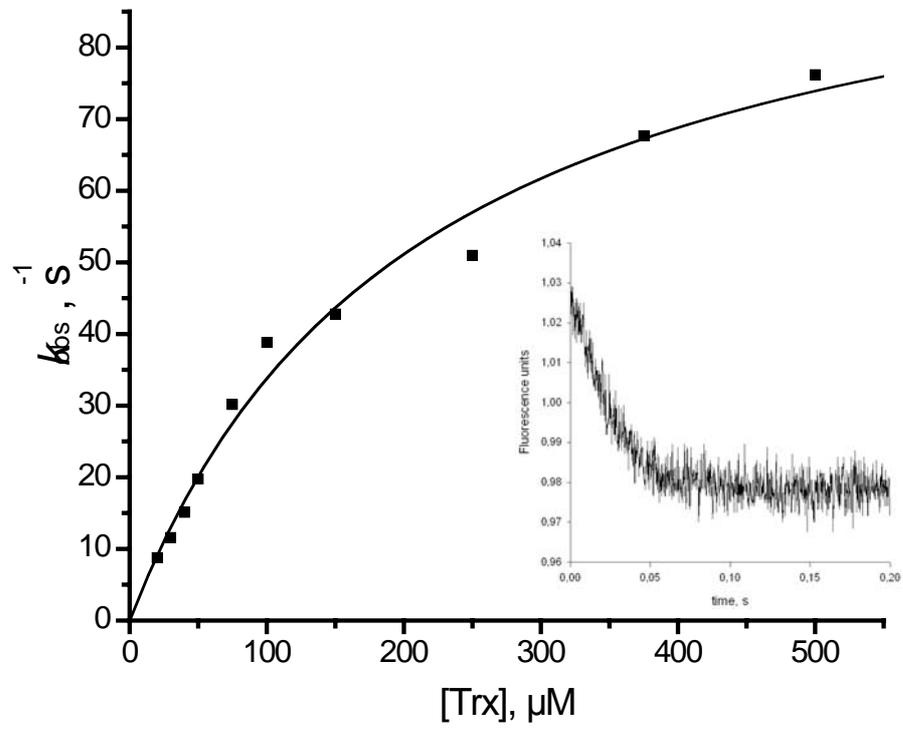
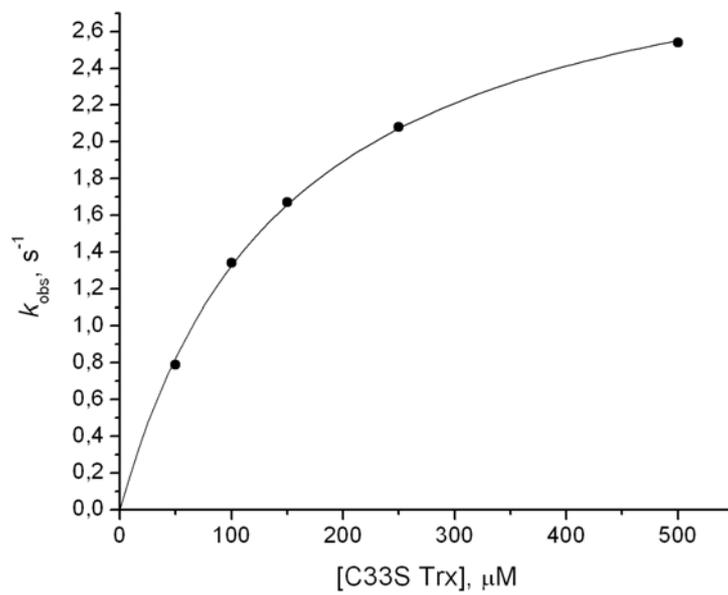


Figure 6

A



B

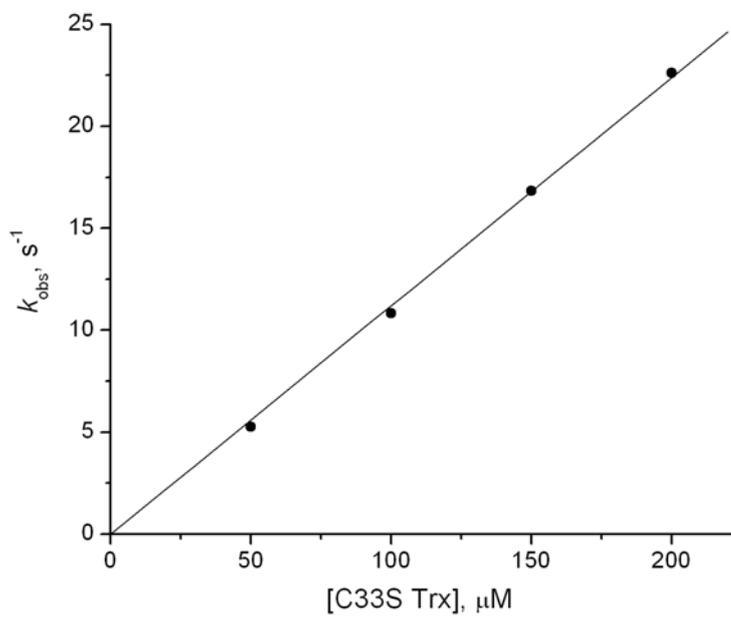
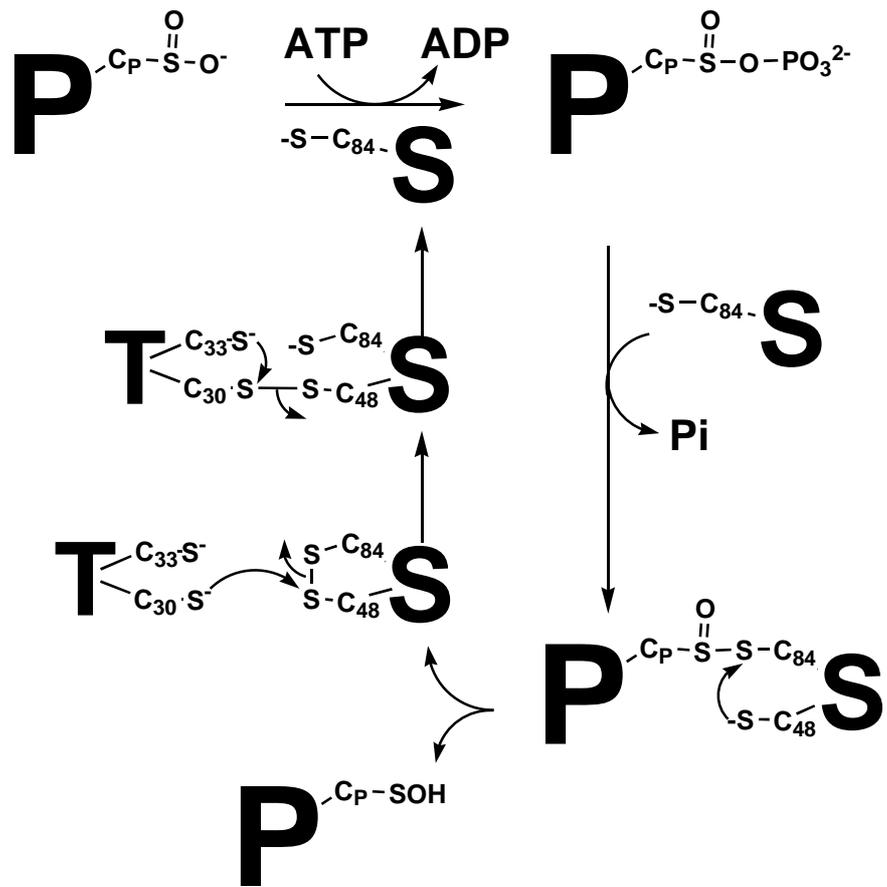


Figure 7



C. Mécanisme de recyclage de Srx chez les mammifères.

La formation d'un intermédiaire thiosulfinate entre Srx et Prx a été montrée par Jönsson (Jönsson *et al.*, 2008c) sur la Srx humaine. La constante de vitesse de l'étape réductase a été simulée, à $1,4 \text{ min}^{-1}$. Nous avons confirmé ce résultat expérimentalement sur la Srx de souris (mSrx), à l'aide du système couplé PNP/ m7 Guo. En effet, la constante de vitesse de libération du Pi est de $\sim 2 \text{ min}^{-1}$ en absence de réducteur, avec une stœchiométrie de 1 Pi libéré pour 1 mSrx (Figure 54 page 110). Ce résultat est identique à ce qui a été montré pour scSrx.

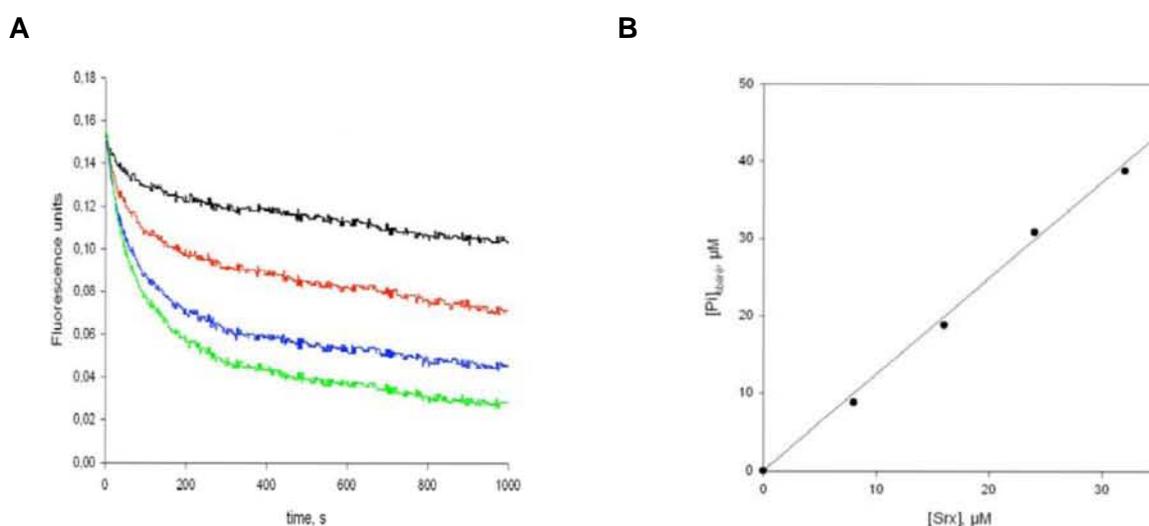


Figure 54 : Cinétique de libération de phosphate inorganique catalysée par mSrx WT avec mPrxSO₂ C173A.

L'activité est mesurée à 37°C dans du tampon TK, en suivant la libération de phosphate grâce au système couplé PNP/ m7 Guo, à l'aide d'un spectrofluorimètre. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 305 nm et l'émission de fluorescence est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 455 nm. Les concentrations sont fixes en ATP (1 mM), en MgCl₂ (1 mM), en m7 Guo (300 μM), en PNP (12,5 μM) et en C173A mPrxSO₂ (100 μM). A : la concentration en mSrx sauvage est de 5 (noir), 10 (rouge), 15 (bleu) ou 19 (vert) μM, en absence de réducteur. B : représentation de la concentration de phosphate inorganique libérée en fonction de la concentration de mSrx sauvage dans le mélange réactionnel.

La particularité des Srx de mammifères est qu'elles ne possèdent pas de Cys additionnelle comme la Cys48 qui est présente chez scSrx. Le mécanisme de recyclage de Srx doit donc être différent entre les Srx de mammifères et scSrx. Ceci est confirmé par des études cinétiques sur la mSrx. En effet, à l'aide du système couplé PNP/ m7 Guo, nous avons observé que la cinétique de réduction de la PrxSO₂ de souris par la mSrx en présence de ecTrx est identique à celle observée pour le double variant C48A-C106A de scSrx, pour la même concentration en Trx. Cette cinétique peut être ajustée à une équation de type monoexponentiel suivi d'une phase linéaire (Figure 55 page 111), la phase exponentielle

correspondant à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate, avec un k_{obs} de 2 min^{-1} et une amplitude correspondant à la concentration de mSrx et la phase linéaire correspondant à la réduction de l'intermédiaire avec libération du produit de la réaction et recyclage de mSrx. Cette droite est caractérisée par une pente de $\sim 0,2 \text{ min}^{-1}$. Dans ces conditions, le recyclage de mSrx par la Trx devient l'étape limitante de la réaction, et la constante de vitesse mesurée est en accord avec les constantes de vitesses de la réaction décrites dans la littérature pour les Srx de mammifères de $0,2-0,5 \text{ min}^{-1}$ (Chang *et al.*, 2004 ; Jeong *et al.*, 2006).

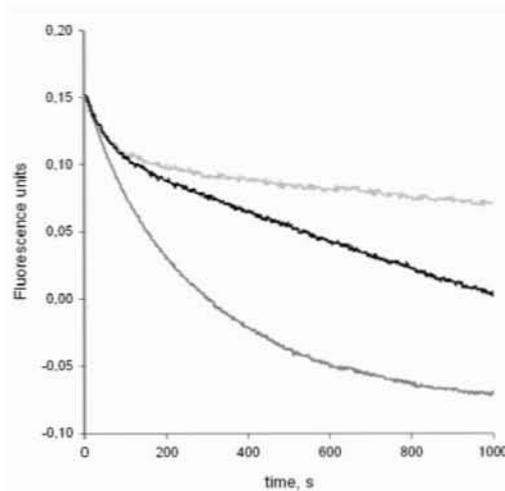


Figure 55 : Cinétique de libération de phosphate inorganique catalysée par mSrx en absence ou en présence de réducteur.

L'activité est mesurée à 37°C dans du tampon TK, en suivant la libération de phosphate grâce au système couplé PNP/ ^{m7}Guo , à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les concentrations sont fixes en ATP (1 mM), en MgCl_2 (1 mM), en ^{m7}Guo ($300 \mu\text{M}$), en PNP ($12,5 \mu\text{M}$), en C171A PrxSO₂ ($100 \mu\text{M}$) et en mSrx WT $10 \mu\text{M}$, en absence de réducteur (gris), ou en présence de ecTrx WT $300 \mu\text{M}$ (noir) ou de DTT 50 mM (gris foncé).

Dans le travail publié en 2006, Rhee *et coll.* ont décrit qu'en présence de GSH (10 mM), de Trx ($30 \mu\text{M}$) ou de DTT (10 mM), la constante de vitesse k_{ss} de la réaction restait inchangée, à environ $0,2 \text{ min}^{-1}$ (Jeong *et al.*, 2006). Avec le système couplé PNP/ ^{m7}Guo , nous avons suivi la réaction de mSrx en présence de DTT (50 mM) (Figure 55 page 111) ou de GSH (10-50 mM). Dans ces conditions, nous mesurons un k_{ss} de $\sim 2 \text{ min}^{-1}$ avec libération de $\sim 100 \mu\text{M}$ de Pi soit la concentration initiale de PrxSO₂ dans la réaction, alors qu'en présence de Trx ($300 \mu\text{M}$) le k_{ss} est de $0,2 \text{ min}^{-1}$. En présence de DTT ou de GSH, et ce à des concentrations suffisantes, l'étape limitante n'est plus associée à l'étape de recyclage de Srx et de libération du produit de la réaction, contrairement à ce qui est observé en présence de Trx. Le recyclage de la Srx de souris par la Trx n'est donc pas efficace à l'inverse de celui de *S. cerevisiae*.

D. Conclusion.

Les données obtenues sur scSrx ont permis de montrer que PrxSOH est libérée après l'attaque de la Cys48 sur la Cys84 de Srx au niveau de l'intermédiaire thiosulfinate. Cette réaction aboutit à la formation d'un intermédiaire catalytique scSrx oxydé sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire. Cet intermédiaire est ensuite réduit de manière efficace par la Trx, après reconnaissance entre les deux partenaires, par attaque de la Cys catalytique de la Trx probablement sur la Cys48 de Srx (Figure 56 page 112).

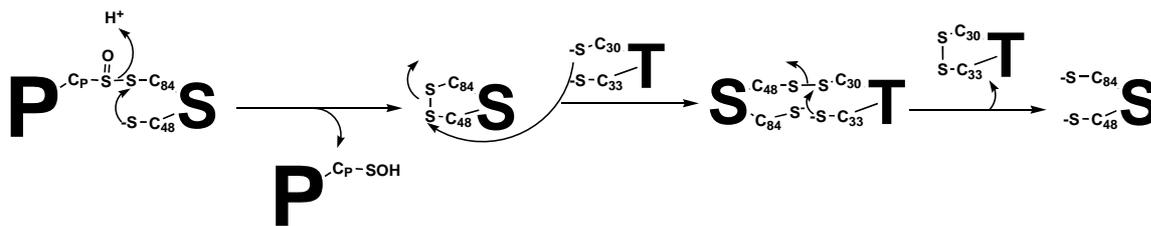


Figure 56 : Représentation schématique de la libération de la PrxSOH, produit de la réaction et du recyclage de scSrx par la Trx.

S = Srx, P = Prx, T = Trx

Par contre, dans le cas des Srx dépourvues de Cys de recyclage, comme les Srx de mammifères, le recyclage de Srx par la Trx n'est pas efficace et cette étape devient limitante. La Trx n'attaque donc pas efficacement l'intermédiaire thiosulfinate. La Trx serait donc le réducteur physiologique de scSrx mais pas des Srx de mammifères. Ces observations sont cohérentes avec l'étude *in vivo* de Bondareva (Bondareva *et al.*, 2007) qui montre qu'en absence de Trx réductase, *S. cerevisiae* induit la synthèse de Prx alors que les cellules de mammifères induisent la synthèse de Srx. Chez *S. cerevisiae*, les mécanismes catalytiques de Prx et Srx sont dépendants du système Trx/Trx réductase. En absence de Trx réductase, ni Prx, ni Srx ne sont recyclées ; ceci serait compensé par la synthèse *de novo* de Prx par la levure. Chez la souris, le mécanisme de Srx ne serait pas dépendant du système Trx/Trx réductase. La réduction des 2-Cys PrxSO₂, en absence de Trx réductase, serait alors permise par la synthèse de Srx. Ceci pose donc la question de la nature du réducteur physiologique des Srx dépourvues de Cys de recyclage.

Du point de vue cinétique, l'étape globale limitante de la réaction est associée soit à l'étape de formation de l'intermédiaire thiosulfinate, soit à une étape antérieure, comme l'étape de transfert de phosphate sur la PrxSO₂. L'étude de cette première étape de la réaction fait l'objet de la troisième partie des résultats.

Résultats III : La Cys catalytique de Srx joue-t-elle un rôle dans la première étape de transfert de phosphate ?

A. Travaux de Jeong *et al.* et de Jönsson *et al.*

Au cours de ma thèse, deux études contradictoires ont été publiées concernant le mécanisme de l'étape de transfert de phosphate (Figure 57 page 113).

Dans son étude du mécanisme des Srx de mammifères publié en 2006, l'équipe de Rhee a proposé que le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'acide sulfinique ne serait pas direct, mais passerait par une étape de phosphorylation de la Cys catalytique de Srx conduisant à un intermédiaire phosphocystéine de Srx. Le groupement phosphate serait ensuite seulement transféré de l'intermédiaire phosphocystéine de Srx vers l'acide sulfinique conduisant à un intermédiaire anhydride phosphoryle sulfinique (Figure 57 B page 113) (Jeong *et al.*, 2006). Dans cette étude, qui repose sur l'observation d'un marquage de la Ser99 (substituant la Cys catalytique) de la C99S hSrx au cours de la réaction conduite en présence de γ - ^{32}P ATP, aucun des deux intermédiaires n'a pu être observé directement.

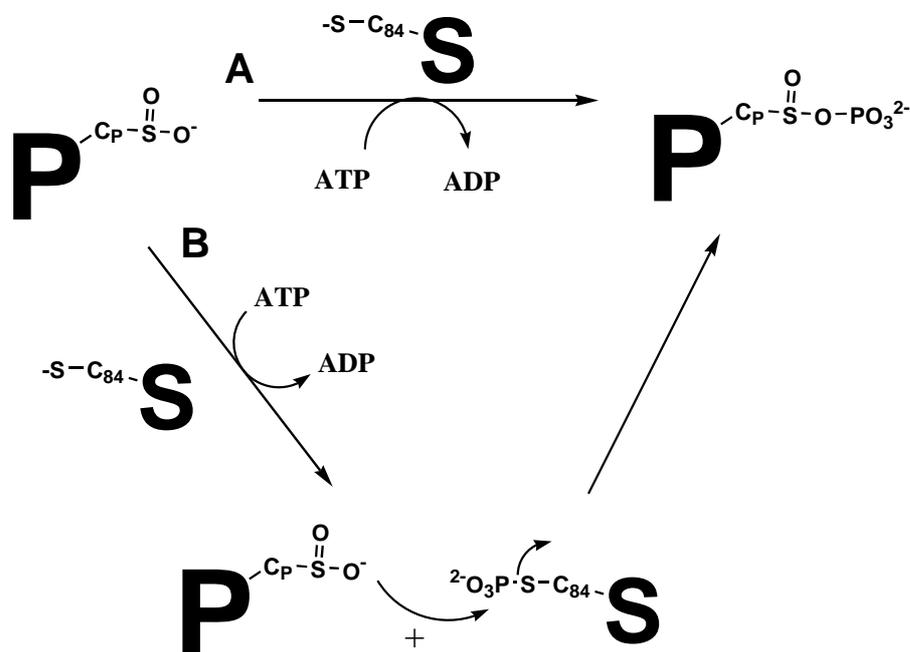


Figure 57 : Hypothèses sur le mécanisme de l'activité phosphotransférase de Srx.

A : Transfert direct du phosphate γ sur l'acide sulfinique. B : Transfert du phosphate γ sur l'acide sulfinique avec passage par un intermédiaire thiophosphate sur Srx.

P: Prx; S: Srx

Dans ses études publiées en 2008, Jönsson *et al.* a apporté au contraire des arguments en faveur d'un transfert direct du phosphate γ de l'ATP sur le groupement

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

sulfinate de la PrxSO₂ (Figure 57 A page 113). En premier lieu, la superposition des structures des complexes hSrx-ATP et hPrxS-ShSrx suggère que le groupement sulfinate serait positionné idéalement pour attaquer le phosphate, à la différence de la Cys de Srx qui serait orientée parallèlement au phosphate (cf Résultats I, Figure 49 page 66) (Jönsson *et al.*, 2008a et b). Un second type d'approche a consisté en l'utilisation d'un variant C51D de Prx, analogue de substrat où le groupement carboxylate du résidu Asp introduit mimerait, par sa charge, l'acide sulfinique. Sur la base de l'observation d'un marquage radioactif de la C51D Prx au cours de la réaction conduite en présence de γ -[³²P]ATP, les auteurs concluent que l'analogue C51D Prx serait phosphorylé de façon analogue au substrat PrxSO₂. De plus, les mêmes résultats étant obtenus avec les C99A/S hSrx, ceci suggère que cette étape serait indépendante de la présence de la Cys catalytique de Srx. Enfin, cette même équipe a obtenu des résultats contradictoires concernant le rôle de la Cys catalytique dans cette étape. En effet, un échange isotopique entre ¹⁸O et ¹⁶O a pu être suivi par spectrométrie de masse au cours de la réaction de Srx sur le substrat PrxS[¹⁸O]₂. Cet échange ¹⁸O/¹⁶O a été attribué à l'hydrolyse de l'acide sulfinique activé. Par contre, aucun échange entre ¹⁸O et ¹⁶O n'a été observé avec le variant C99A Srx (Jönsson *et al.*, 2008c), ce qui a conduit les auteurs à conclure en faveur d'un rôle déterminant de la Cys catalytique de Srx dans le mécanisme de transfert de phosphate sur l'acide sulfinique.

B. Caractérisation cinétique de l'étape de transfert de phosphate.

Compte-tenu des résultats contradictoires décrits sur la Srx humaine, nous avons entrepris l'étude de cette étape sur la Srx de *S. cerevisiae*, avec pour objectif d'identifier le rôle de la Cys catalytique dans cette étape. En outre, nous avons montré précédemment que l'étape cinétiquement limitante de la réaction est associée ou antérieure à l'étape de formation de l'intermédiaire thiosulfinate. Il était donc important, au sein de ce mécanisme, d'attribuer l'étape limitante à l'étape de transfert de phosphate, de formation du thiosulfinate ou à une autre étape associée.

Pour cela, nous avons adopté une stratégie analogue à celle utilisée pour la caractérisation de l'étape de formation de l'intermédiaire thiosulfinate. En effet, la vitesse de l'étape de transfert du phosphate pouvait se révéler beaucoup plus rapide que celle mesurée à l'état stationnaire. En conséquence, l'analyse de la réaction sur une échelle de temps de l'ordre de l'heure, par des méthodes discontinues impliquant des prélèvements manuels suivis d'une analyse des produits de réaction comme celles utilisées pour le suivi de marquage radioactif dans les deux études présentées ci-dessus, ne permettait pas d'accéder à une constante de vitesse de la réaction de l'ordre de la min⁻¹ ou plus rapide. Nous avons

donc utilisé une méthode cinétique permettant de suivre le transfert de phosphate en temps réel *via* la production d'ADP. En outre, cette méthode présente l'avantage supplémentaire de pouvoir distinguer cinétiquement la réaction spécifique du bruit de fond plus lent dû aux réactions secondaires.

Cette méthode repose sur le suivi de la libération d'ADP produit par la réaction grâce à un système couplé lactate déshydrogénase (LDH)/pyruvate kinase (PK)/NADH (Figure 58 page 115). L'ADP formé est utilisé par la PK pour former en présence de phosphoénolpyruvate (PEP) de l'ATP et du pyruvate qui est transformé en lactate par la LDH en consommant du NADH. La consommation du NADH observée spectrophotométriquement à 340 nm permet donc de suivre cinétiquement la première étape de la réaction catalysée par Srx. Cette méthode a été validée sur la réaction à l'état stationnaire en présence de réducteur Trx. La constante de vitesse mesurée par cette méthode avec le substrat C171A PrxSO₂, est de 1.5 min⁻¹, similaire à celle mesurée par le système Trx/Trx réductase dans les mêmes conditions. De plus, cette méthode permet de titrer la totalité du substrat puisque nous mesurons autant d'ADP que de PrxSO₂ initialement présente dans le mélange réactionnel (Figure 59 C page 116), de façon analogue au système couplé ^{m7}Guo/PNP.

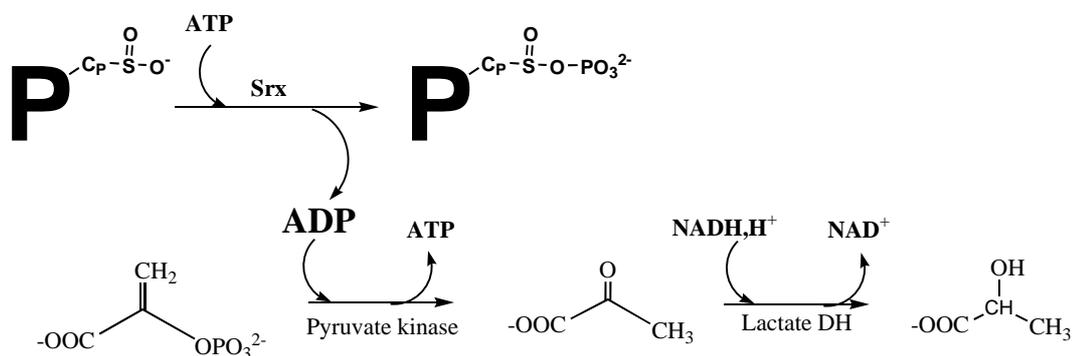


Figure 58 : Schéma du suivi de la libération d'ADP au cours de la réaction par le système couplé LDH/PK/NADH.

L'étude de la libération d'ADP en absence de réducteur permet de mesurer une constante de vitesse k_{ADP} de $\sim 2 \text{ min}^{-1}$ (Figure 59 A page 116), similaire à la constante de vitesse à l'état stationnaire (Figure 59 C page 116). Par conséquent, l'étape cinétiquement déterminante pour la réaction globale est associée ou précède l'étape de transfert de phosphate et la formation de l'intermédiaire anhydride phosphoryl sulfonique. Cependant, là où la stœchiométrie de libération de phosphate par rapport à la quantité de Srx dans la réaction était de 1 (cf Résultats I, publication 1, Figure 6B page 76), nous mesurons une stœchiométrie proche de 0,5 ADP libéré pour une Srx (Figure 59 B page 116), en absence de réducteur.

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

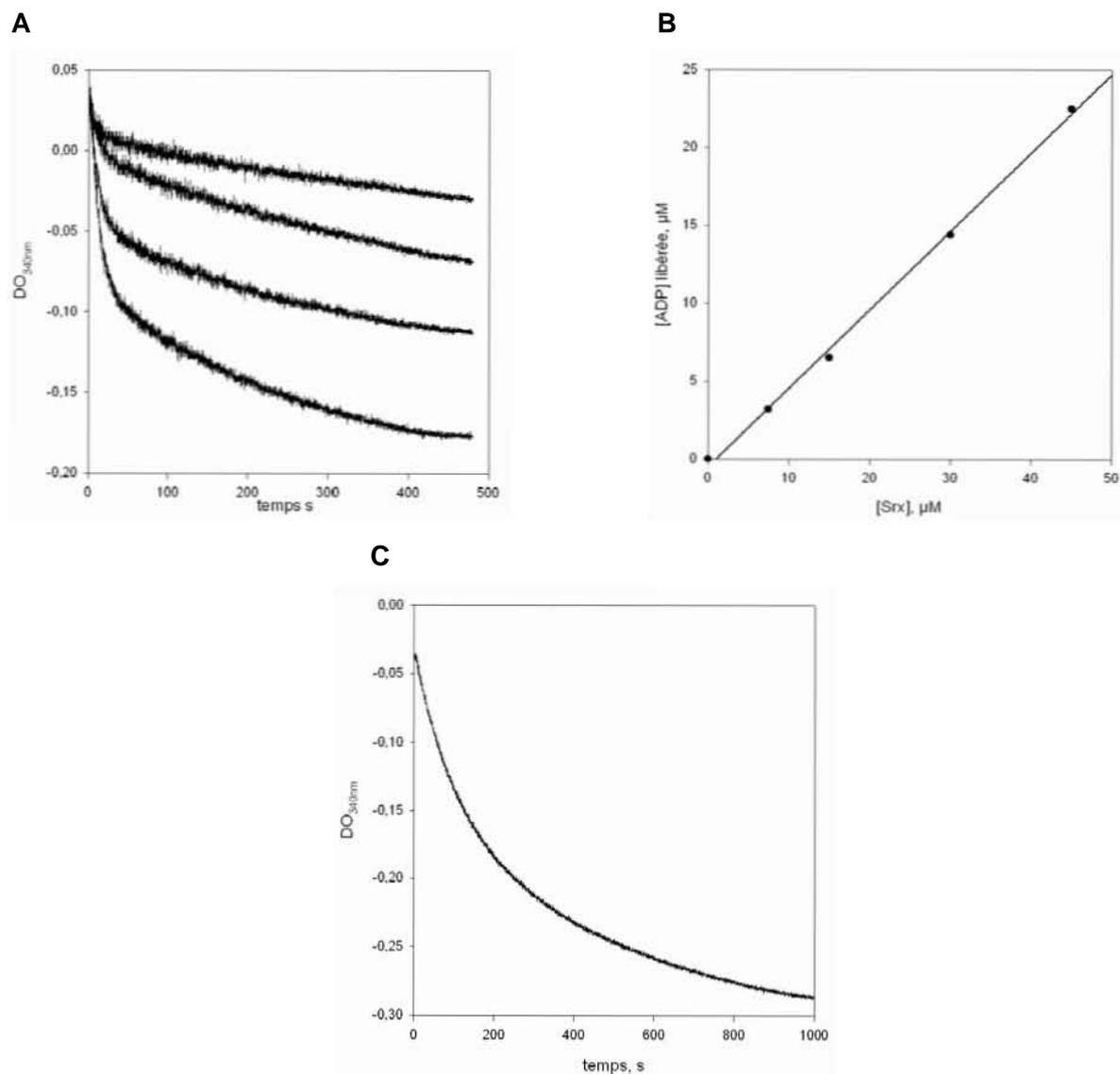


Figure 59 : Cinétique de libération de d'ADP catalysée par Srx sauvage.

L'activité est mesurée à 30°C dans du tampon TK pH 7.

A : l'activité est mesurée en suivant la libération d'ADP grâce au système couplé LDH/PK/NADH. Les concentrations en PEP (1 mM), en ATP (1 mM), en MgCl₂ (3 mM), en NADH (400 μM), en LDH (60 U/ml), en PK (10 U/ml), en PrxSO₂ C171A (80 μM) sont fixes et variables en Srx sauvage (7,5-15-30-45 μM). B : représentation de la concentration d'ADP libérée en fonction de la concentration de Srx sauvage dans le mélange réactionnel. C : la réaction est réalisée dans les mêmes conditions qu'en A, en présence PrxSO₂ (50 μM) et Trx (300 μM).

Pour expliquer ce résultat, nous avons émis l'hypothèse qu'une partie de l'ADP produit en «single turn-over» pouvait être piégée au sein d'un complexe entre le substrat et l'enzyme formés au cours du mécanisme de l'étape réductase. Cette hypothèse a été testée par une approche visant à doser l'ADP potentiellement piégé sous forme de complexe. Pour cela, après réaction et précipitation des protéines par l'acétonitrile ou en conditions acides, l'ADP libéré a été dosé soit par chromatographie échangeuse d'anions, soit par dosage de la radioactivité portée par le groupement phosphate α de l'ADP, respectivement. Le problème

rencontré dans ces deux expériences est le fort bruit de fond observé dans ces conditions expérimentales en absence de Srx. Avec ces méthodes indirectes, le bruit de fond ne peut pas être retranché comme avec la méthode de suivi en temps réel par le système couplé LDH/PK/NADH, ce qui a exclu de pouvoir conclure sur la validité de cette hypothèse.

C. Transfert du phosphate γ de l'ATP sur PrxSO₂.

La méthode cinétique de suivi en temps réel a été utilisée pour analyser le mécanisme de l'étape de transfert de phosphate, et en particulier le rôle de la Cys catalytique de scSrx. La partie qui suit est un résumé des résultats principaux de la publication 3 à soumettre, qui a permis d'exclure un rôle de la Cys84 dans le mécanisme de formation de l'intermédiaire anhydride phosphoryl sulfinique, donc dans la formation d'une espèce phosphoryl-Cys84.

Pour répondre à la question du mode de transfert du phosphate γ de l'ATP sur le sulfinate de la PrxSO₂, nous avons comparé les résultats obtenus pour les cinétiques de libération d'ADP et de phosphate en absence de réducteur, avec la Srx sauvage et le variant C84A. Dans l'hypothèse d'un transfert de phosphate *via* la Cys84 de Srx (Figure 57 B page 113), le résultat attendu est qu'en absence de cette Cys il n'y ait plus de transfert de phosphate et donc plus de libération d'ADP. Par contre, dans le cas d'un transfert direct du phosphate sur l'acide sulfinique (Figure 57 A page 113), il doit y avoir libération d'ADP avec la Srx sauvage et le variant C84A.

Nos résultats montrent que pour la Srx sauvage et C84A il y a libération d'ADP à des constantes de vitesse de 2,8 min⁻¹ pour Srx sauvage et 0,6 min⁻¹ pour C84A Srx (publication 3, Figure 2 page 127). Bien qu'étant plus faible pour le variant C84A, ces valeurs sont significativement supérieures au bruit de fond mesuré dans une expérience contrôle en présence de C84A Srx et de Prx réduite, d'une valeur de 0,05 min⁻¹. De plus, la constante de vitesse de libération du phosphate mesurée en parallèle pour le variant C84A est similaire à celle de l'ADP, impliquant que le phosphate libéré ne peut provenir que de l'hydrolyse d'une espèce phosphorylée de PrxSO₂. Comme attendu dans ce cas, le substrat étant régénéré à chaque tour de réaction, la stœchiométrie d'ADP et de phosphate libérés est supérieure à la concentration en Srx. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que le transfert de phosphate γ de l'ATP sur PrxSO₂ se fait de manière directe (Figure 57 A page 113).

Par contre, en présence de C48D Prx comme analogue de substrat, nous mesurons une faible libération d'ADP, avec une constante de vitesse proche du bruit de fond ($k_{ADP} = 0,1$ min⁻¹), et aucune libération de phosphate (publication 3, Figure 3 page 128). Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a été publié précédemment, et montrent l'intérêt des méthodes cinétiques directes que nous avons mises au point par rapport aux méthodes

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

discontinues, en particulier dans le cas de réactions lentes, difficiles à distinguer du bruit de fond.

Finalement, ces résultats permettent de réinterpréter les expériences d'échanges isotopiques $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ réalisées par Lowther *et coll.* (Jönsson et al., 2008c). En effet, en présence de PrxSO₂ et de Srx sauvage, nous avons montré que la réaction ne s'arrête pas à la formation de l'intermédiaire phosphorylé qui ne s'accumule pas, mais à celle de l'intermédiaire thiosulfinate, espèce elle-même sensible à l'hydrolyse. C'est donc cet intermédiaire thiosulfinate qui sera hydrolysé par attaque d'une molécule d'eau H₂[¹⁶O] au niveau du soufre sulfinique du thiosulfinate (cf Résultats I), d'où l'échange isotopique observé (Figure 60 A page 118). Par contre en présence de C84A Srx, puisqu'après transfert de phosphate il n'y a pas formation de l'intermédiaire thiosulfinate, l'intermédiaire phosphorylé serait hydrolysé par l'attaque préférentielle de la molécule d'eau sur le phosphore du groupement phosphate, ce qui n'entraîne pas d'échange isotopique (Figure 60 B page 118). En effet, la molécule d'eau qui est un centre dur, attaquera préférentiellement un centre comme le phosphore qui est plus dur que le soufre, alors qu'un thiol comme la Cys catalytique de Srx, qui est un centre mou, attaquera préférentiellement le soufre sulfinique de l'intermédiaire phosphorylé qui est un centre mou, plutôt que le phosphore.

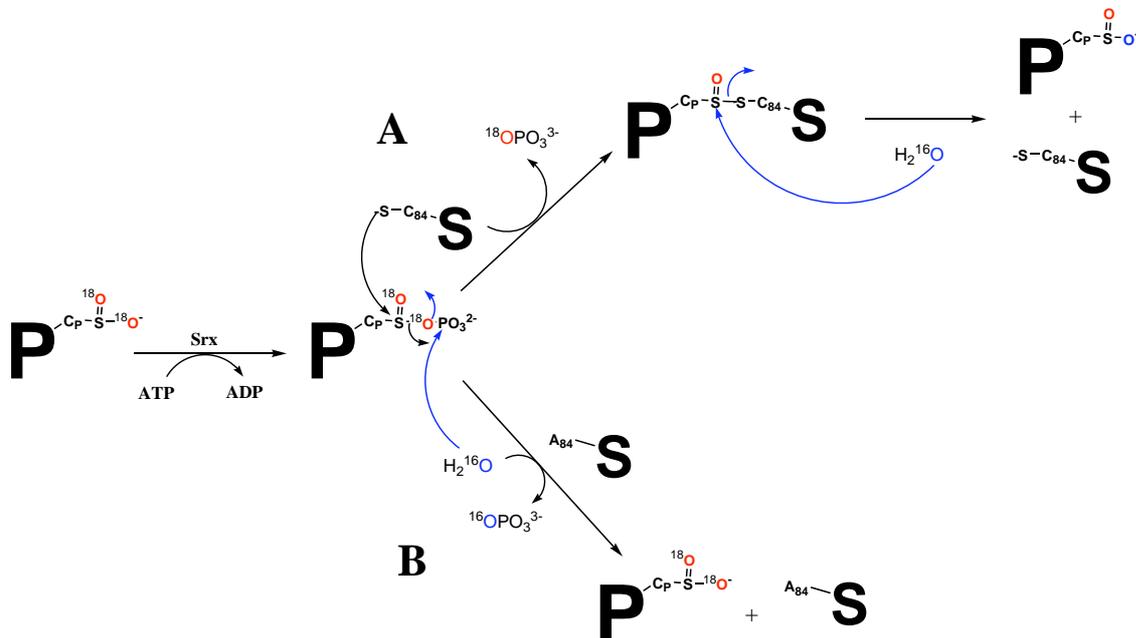


Figure 60 : Schéma explicatif des résultats d'échanges isotopiques obtenus par Lowther *et coll.*

A : Formation de l'intermédiaire thiosulfinate puis hydrolyse au niveau du soufre sulfinique. B : Formation de l'intermédiaire phosphorylé puis hydrolyse au niveau du phosphore du groupement phosphate. P: Prx ; S: Srx ; en rouge sont représentés les atomes ^{18}O et en bleus les atomes ^{16}O .

D. Publication 3.

X. Roussel, S. Rahuel-Clermont et G. Branlant

Probing the catalytic mechanism of phosphotransferase activity of sulfiredoxin by kinetic approaches. (à soumettre)

Page 120 à 128.

Probing the catalytic mechanism of phosphotransferase activity of sulfiredoxin by kinetic approaches

Xavier Roussel, Sophie Rahuel-Clermont and Guy Branlant

From the Unité Mixte de Recherche CNRS-UHP 7214, ARN-RNP maturation-structure-fonction, Enzymologie Moléculaire et Structurale, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
Address correspondence to: Guy Branlant, Tel. (33)3 83 68 43 04, Fax (33)3 83 68 43 07, Email guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr, and Sophie Rahuel-Clermont, Tel. (33)3 83 68 43 12, Fax (33)3 83 68 43 07, Email sophie.rahuel@maem.uhp-nancy.fr

Running Head: mechanism of phosphotransferase activity of Srx

The sulfinyl reductase activity of Srx is involved in the regulation of H₂O₂-mediated signalization, by controlling the function born by the different oxidized forms of 2-Cys-Prx. The eukaryotic enzyme Sulfiredoxin (Srx) specifically catalyzes the reduction of overoxidized typical 2-Cys peroxidases. Srx catalysis involves first the ATP-dependent activation of the sulfinic acid function by transfer of the γ -phosphate of ATP. Two distinct mechanisms have been proposed for the formation of this phosphorylated intermediary: a direct transfer of the γ -phosphate or an indirect transfer *via* the phosphorylation of Srx catalytic Cys. In these previous studies, conflicting arguments regarding the role of the Srx catalytic Cys were put forward. In the present study, we have investigated the mechanism of formation of the phosphorylated intermediary by real time kinetic methods. The kinetics of ADP and phosphate release for wild-type and C84A Srx show that i) the phosphate transfer step occurs *via* a direct mechanism, ii) the catalytic Cys of Srx is not essential for this step and iii) the rate-determining process of the reaction is associated with the formation of the phosphorylated substrate intermediate.

Three subclasses of eukaryotic peroxiredoxins exist. Members of the two-Cys subfamily contain two essential cysteines, the peroxidatic cysteine (C_P) which reduces hydrogen peroxide (H₂O₂) and alkyl peroxide to water and alcohol and in return is oxidized into sulfenic acid, and the resolving cysteine (C_R) that attacks the sulfenic acid intermediary to form a disulfide (1-4). The peroxidatic cysteine is sensitive to hyperoxidation by H₂O₂ into sulfinic acid (4). This hyperoxidation is reversed by sulfiredoxin (Srx) which reduces the sulfinic acid back to the sulfenic acid state (5). The reductive activity of Srx requires ATP and Mg²⁺ (5,6). Recently, it was clearly shown that the catalytic mechanism passes through formation of a thiosulfinate bond between the essential cysteine of Srx (referred to as the catalytic cysteine and numbered 84 in the *Saccharomyces cerevisiae* Srx and 99 in the human enzyme) and the C_P of Prx (7, 8). However, the role of the catalytic Cys of Srx in the catalysis of the first step remains a matter of debate. In the original proposal by Biteau *et al.*, (5) the sulfinic acid extracts directly the γ -phosphate of ATP (Figure 1A). Alternatively, Jeong *et al.*, (9) suggested an indirect transfer of the γ -phosphate to the sulfinic acid *via* the catalytic cysteine of Srx, thus acting as a phosphorylated intermediary (Figure 1 B). Their conclusion was based, in particular, on the behavior of the C99S Srx which was shown to be phosphorylated on Ser99 (Figure 1 B). Recently, the hypothesis made by Biteau *et al.*, (5) was supported by the work of Jönsson *et al.*, (8,10) based on 1)

the crystal structure of Srx in complex with ATP and Mg^{2+} which shows a non favorable positioning of Cys99 of human Srx relative to the γ -phosphate of ATP thus making an in-line attack by the catalytic Cys99 unlikely; 2) the behavior of the Prx-Asp mimic of the Prx-SO₂, PrxC_P→Asp (PrxCO₂) which is phosphorylated in the presence of wild-type and C99A/S Srx and; 3) the ¹⁸O→¹⁶O exchange which is observed using the Prx-S¹⁸O₂ with the wild-type Srx but not with C99A Srx. This latter behavior was interpreted as an evidence for i) the formation of the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediary in the wild-type Srx that would be reversed by hydrolysis and; ii) the absence of formation of the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediary in the C99A Srx. This consequently supported an essential role of Cys99 in the formation of the anhydride intermediary that is in contradiction with the conclusion made from the inspection of the 3D structure and the results obtained with the PrxCO₂ analog of the substrate and the C99A/S Srx.

To rationalize the data obtained by Jeong *et al.*, and Jönsson *et al.*, which both lead to apparent contradictory conclusions, kinetic recycling systems that titrate phosphate and ADP were used to determine the rate of ADP and phosphate releases, respectively, for wild-type, C84S, C84A and C48A-C106A Srxs from *S. cerevisiae*, using Prx-SO₂ and PrxCO₂ as substrates. Data are presented that support a rate-limiting step for the wild type associated with formation of the phosphorylated intermediary, which is shown to be chemically unstable. Moreover, based on results obtained with C84A Srx, formation of a phosphoryl cysteine intermediary on Cys84 can be excluded. Finally, the fact that the rate of formation of the phosphorylated intermediary is low, i.e. $\sim 2 \text{ min}^{-1}$, is discussed in relation to the 3D structure of Srx and the chemistry of the sulfinic acid.

Experimental procedures

Materials

Tris was from VWR (West Chester, PA, USA). KCl and MgCl₂ were from Merck (Darmstadt, Germany), NADH was obtained from Roche (Basel, Switzerland), dithiothreitol (DTT) from Euromedex (Souffelweyersheim, France). ATP, phosphoenolpyruvate (PEP), Lactate Dehydrogenase (LDH) and Pyruvate Kinase (PK) were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and ^{m7}Guanosine (^{m7}Guo) was from Fluka.

Recombinant Purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* (PNP), N-terminal His tag fusion protein of *S. cerevisiae* 2-Cys-Prx Tsa1 (referred to as Prx) and *S. cerevisiae* Srx were prepared following the experimental procedures described previously (7). Oxidation of Cys C_P into the sulfinic acid state of both wild-type and C171A Prxs to form PrxSO₂ was achieved as described in (7).

LDH/PK/NADH coupled assay

The kinetics of ADP release were followed by the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH by the PK/LDH/NADH system in the presence of PEP, measured at 30°C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) fitted for absorbance measurements. One syringe contained 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 1 mM PEP, 400 μ M NADH in buffer TK, and the other one contained 80 μ M HT-Prx, 20 U/ml PK, 60 U/ml LDH, 10 μ M Srx (final concentrations after mixing). For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and deduced from the corresponding experience in the presence of Srx. An average of 3 runs was recorded for each set of conditions. For wild-type Srx, the rate constant k_{obs} was obtained by fitting absorbance traces after blank deduction against equation 1, in which c represents the end point and a , the amplitude of the signal. For C84A and C84S Srx, the rate constant k_{obs} was deduced by linear regression.

Equation 1

$$y = ae^{-k_{\text{obs}}t} + c$$

PNP coupled assay

The kinetics of Pi release were followed as described in (7). Briefly, the decrease of

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

the emission fluorescence intensity associated with the phosphorolysis of m7 Guanosine (m7 Guo) catalyzed by PNP were recorded at 30°C on an SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics, Leatherhead, UK) fitted for fluorescence measurements, with the excitation wavelength set at 305 nm, and the emitted light collected above 455 nm using a cutoff filter. One syringe contained 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 300 μM m7 Guo, 5 μM PNP in buffer TK, and the other contained 80 μM Prx, 20 μM PNP, 10 μM Srx (final concentrations after mixing). For each condition, a blank time course was recorded in the absence of Srx and deduced from the corresponding experience in the presence of Srx. For wild-type Srx, the rate constant k_{obs} was obtained by fitting fluorescence traces after blank deduction against Equation 1. For C84A Srx, the rate constant k_{obs} corresponded to the initial rate constant. The fluorescence signal was calibrated independently against Pi concentration.

Results

Rate of ADP release with wild-type Srx

To identify which step(s) in the reaction catalyzed by the Srx from *S. cerevisiae* contributes to the rate of thiosulfinate intermediate formation, the LDH/PK/NADH coupled assay was used to monitor ADP released in the first step. This assay involves the phosphorylation of ADP by PK in the presence of PEP, leading to production of pyruvate, which is followed by the decrease of NADH absorbance upon reduction by LDH. The assay was validated under steady-state conditions in the presence of Trx as the reducing agent. A rate constant of $1.5 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ for C171A PrxSO₂, close to that of 1.7 min^{-1} determined by the Trx/NTR assay, was obtained using saturating/optimal concentrations of C171A PrxSO₂, ATP, MgCl₂ and Trx. Furthermore, as expected under these conditions, the amount of NADH consumed deduced from the amplitude of the time course corresponded to 80-100% of the initial concentration of the PrxSO₂ substrate (data not shown).

The rate of ADP release was also determined under single turn-over conditions, i.e. in the absence of reducer and excess C171A PrxSO₂ relative to wild-type Srx. In the absence of wild-type Srx, a non-specific linear signal was measured. After subtraction from the traces collected under the same conditions in the presence of wild-type Srx, the resulting progress curves were best described by a monoexponential process corresponding to a first order process, followed by a slow non specific linear phase. The first order process was characterized by a rate constant of $2.8 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$, independent of wild-type Srx concentration (Figure 2A). This rate constant is close to the steady-state rate constant of the reaction measured by different methods in the presence of a thiol reducer ($1.7 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$) (7). The amplitude of the exponential process was proportional to the wild-type Srx concentration (data non shown).

Rates of release of ADP and phosphate with C84A and C84S Srxs on PrxSO₂ and PrxCO₂

The rates of formation of ADP and phosphate were determined with C84A and C84S Srxs on PrxSO₂ in the absence of reducer. As described before, the release of ADP was monitored by the LDH/PK/NADH coupled assay while that of phosphate was followed by the PNP coupled assay. For C84S Srx, the time course of ADP release was best described by a linear curve, with a rate constant of 0.1 min^{-1} (Figure 2A), but no phosphate release was observed (Figure 2B). For C84A Srx, the time course of ADP release was linear, with a rate constant of 0.6 min^{-1} (Figure 2A). For phosphate release with C84A Srx, the initial rate constant of the curve was 0.7 min^{-1} , similar as that of ADP release. The rate constant for phosphate release in this case was deduced from the initial rate due to the decrease of the rate with time (Figure 2B). This can be explained by slow nonspecific phosphorylation of amino acids of Prx and of Srx (10) which leads to the decrease of the rate of phosphate release and to a non linear time course, which was expected by comparison to the time course of ADP release. A control experiment was carried out in the same conditions using the reduced Prx instead of the PrxSO₂ substrate

and C84A Srx to evaluate the rate of the background processes. A rate constant of 0.05 min^{-1} was measured for ADP release while no phosphate release was observed (not shown).

When the substrate analog PrxCO₂ was used, rate constants of 0.1, 0.05 and 0.1 min^{-1} for ADP release were determined for the wild-type, C84A and C84S Srxs, respectively (Figure 3A), that are similar to that of the control experiment. No release of phosphate was detected with either Srx variants (Figure 3B). These results suggest that in contrast to the results published (10), PrxCO₂ does not efficiently mimic PrxSO₂. The planar sp² geometry of the carboxylate group, distinct of the tetrahedral sp³ geometry of the sulfinate, likely explains such result.

Discussion

In the present study, the rates of release of phosphate and ADP with wild-type, C84S and C84A Srxs from *S. cerevisiae* on PrxSO₂ and PrxCO₂ substrates have been determined in single turnover conditions. For wild-type Srx with PrxSO₂ as substrate, ADP is formed at a rate similar to that of phosphate i.e. 2.8 min^{-1} vs. 1.8 min^{-1} . The fact that a competent thiosulfinate intermediate between Prx and wild-type Srx was previously shown to be formed at a rate of 1.7 min^{-1} under steady-state conditions (7) therefore supports an overall rate-limiting step for the wild type associated with ADP release.

As deduced from Figure 2, the rates of release of ADP and phosphate with the C84A Srx are similar, i.e. 0.6 min^{-1} . The phosphate which is released with C84A Srx can only come from the hydrolysis of the sulfinyl phosphoryl anhydride species formed on PrxSO₂. Indeed, the alternative that hypothesizes an ATPase activity for C84A Srx is unlikely, given that the background rate of release of ADP is only 0.05 min^{-1} and the background release of phosphate is not detectable for this mutant using reduced Prx as substrate analog. Therefore, formation of a phosphoryl

cysteine intermediate on the Cys84 of wild-type Srx can be excluded. In addition, higher rates would have been observed for the reaction of the analog PrxCO₂ with wild-type Srx if this intermediate was operative. Finally, using PrxSO₂ as substrate, the decrease of the rates of ADP and phosphate release for C84A Srx compared to the wild type could be explained as the consequence of a change of the environment near the γ -phosphate of ATP due to the substitution of Cys by Ala.

The fact that the rate of release of phosphate with the C84A Srx is the same as the rate of release of ADP shows that the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediary does not accumulate, and due to its chemical instability is easily hydrolyzed. A stoichiometry of one phosphate per mole of wild-type Srx was observed (7). Such a result demonstrates that hydrolysis of the sulfinyl phosphate does not occur, at the least is not detectable under the experimental conditions used. This implies that every single sulfinyl phosphate anhydride intermediary formed proceeds to the thiosulfinate product. This is favored not only because of the instability of the intermediary but also of an entropic effect due to the positioning of the anhydride intermediary relative to Cys84 and of an activation of the Cys84 within the complex with Srx. Therefore, the rate of formation of the thiosulfinate is "intrinsically" largely higher, at least by a factor of 20, compared to the rate of hydrolysis. Otherwise, as shown from kinetic simulation, the rate of phosphate release measured could not be equal to the rate of ADP release.

For C84S Srx, the rate of release of ADP is 0.1 min^{-1} that is only two-fold higher than the rate of the background and 28 and 6-fold lower than for the wild-type and C84A Srxs, respectively. This low value remains to be explained. A possibility is that the ternary complex PrxSO₂/ATP/C84S Srx is not competent for catalysis. The fact that no phosphate release is observed, is however an indication that an attack of Ser84 on the γ phosphate of ATP can occur even at a low rate in accord with the work of Rhee and *coll* (9). The stability of the phosphoryl serine species would prevent its hydrolysis and thus the release of the phosphate.

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

How is-it possible to reconcile our results and interpretations with those of Jönsson *et al.*, (8) based on the $^{18}\text{O} \rightarrow ^{16}\text{O}$ exchange experiments ? In fact, the latter data can be interpreted differently. Indeed, when working with the wild-type Srx, the sulfinyl phosphoryl anhydride intermediary does not accumulate but is transformed into the thiosulfinate intermediary which we have shown to be easily hydrolyzed in the absence of reducer (7). Thus, the observed $^{18}\text{O} \rightarrow ^{16}\text{O}$ exchange would be due to the attack of H_2^{16}O on the sulfinyl of the thiosulfinate intermediary. With C99A human Srx, the sulfinyl phosphoryl anhydride would be also formed but hydrolyzed without $^{18}\text{O} \rightarrow ^{16}\text{O}$ exchange because H_2^{16}O , preferably attacks the phosphorus of the phosphate. Indeed, hydrolysis of this species implies a nucleophilic attack of H_2O on the phosphorus atom, whereas formation of the thiosulfinate implies an attack of the thiolate of the catalytic Cys on the sulfur atom of the sulfinyl group, both being soft reactive species.

Another point that deserves discussion concerns the rate of formation of the sulfinyl phosphoryl anhydride, of 2 min^{-1} . Such low rate could be due to a ternary complex Prx/ATP/Srx not efficient in terms of catalysis because the γ phosphate of ATP is not optimally positioned relative to the sulfinate group. An alternative would be a rate-limiting step associated with a conformational rearrangement of the ternary complex that precedes the chemical step. From a chemical point of view, a sulfinate can act as a nucleophile either *via* the oxygens or the sulfur of the sulfinic function (12,13). If this latter mechanism is operative, the phosphate sulfone intermediary formed should rearrange to form the thiosulfinate intermediary. This possibility remains to be explored. Anyway, whatever the mechanism that leads to the thiosulfinate species, its rate of formation is however largely sufficient to repair the overoxidized Prx *in vivo*. This could explain why no additional evolutionary pressure has occurred for forcing the sulfinic acid to reveal its chemical reactivity.

References

- 1.
2. Kang, S. W., Baines, I.C., and Rhee, S. G. (1998) *J Biol Chem* **273**, 6303-6311
3. Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H., and Nakayama, K. (2000) *Biochem J* **351**, 107-114
4. Baker, L. M., and Poole, L. M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 9203-9211
5. Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) *Trends Biochem Sci*, **28** 32-40
6. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) *Nature* **425**, 980-984
7. Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (2004) *J Biol Chem* **279**, 50994-51001
8. Roussel, X., Bechade, G., Kriznik, A., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., Branlant, G., and Rahuel-Clermont, S. (2008) *J Biol Chem* **283**, 22371-82
9. Jonsson, T. J., Tsang, A. W., Lowther, W. T., and Furdui, C. M. (2008) *J Biol Chem* **283**, 22890-22894
10. Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y., and Rhee, S. G. (2006) *J Biol Chem* **281**, 14400-14407
11. Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) *J Biol Chem* **283**, 23846-23851
12. Nagy, P., and Ashby, M. T. (2007) *Chem Res Toxicol* **20**, 1364-1372
13. Naguchi, Y., Kurogi, K., Sekioka, M., and Furukawa, M. (1983) *Bull Chem Soc Jpn* **56**, 349-350
14. Reddie, K. G., and Carroll, K. S. (2008) *Curr Opin Chem Biol* **12**, 746-754.

Footnotes

We thank Pr S. Boschi-Muller, Dr A. Gruez, and Dr H. Mazon, for helpful discussions. This work was supported in part by the CNRS, the University of Nancy I, the Institut Fédératif de Recherche 111 Bioingénierie, and by the French Agence Nationale de la Recherche (program ANR-06-BLAN-0369). X. Roussel was supported by the French Research Ministry.

The following abbreviations were used: 2-Cys-Prx: two-cysteine peroxiredoxin; C_p: 2-Cys-Prx catalytic Cys; C_R: 2-Cys-Prx resolving Cys; DTT: 1,4-dithiothreitol; ^{me7}Guo: methyl-7 guanosine; NTR: *E.coli* NADPH thioredoxin reductase; PNP: His-tagged purine nucleoside phosphorylase from *E. coli*; PrxSO₂: overoxidized *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1; PrxCO₂: C_p→Asp mutant of *S. cerevisiae* His-tagged peroxiredoxin Tsa1; Srx: sulfiredoxin; Trx: *E. coli* thioredoxin 1; LDH: lactate dehydrogenase; PK: pyruvate kinase

Figure legends

Figure 1: Hypothetic mechanisms for the phosphotransferase activity of Srx.

A : direct transfer the γ -phosphate of ATP on the sulfinic acid; B : transfer of the γ -phosphate of ATP to the sulfinic acid via a phosphorylated intermediary of Srx; P: Prx; S: Srx

Figure 2: Single turnover kinetics of the reaction catalyzed by Srx with PrxSO₂.

The reaction of 80 μ M C171A PrxSO₂ with 10 μ M wild-type (black), C84S (grey) and C84A (light grey) Srx in the presence of 1 mM ATP/MgCl₂ were carried out in buffer TK at 30 °C. A, the reaction was monitored by ADP release by the LDH/PK/NADH coupled assay (see text). B, the reaction was monitored by the PNP coupled assay (see text). The progress curves are corrected from blank traces collected in the absence of Srx.

Figure 3: Single turnover kinetics of the reaction catalyzed by Srx with PrxCO₂.

The reactions were carried out in the same conditions as in Figure 2 using the PrxCO₂ substrate analog. A, the reaction was monitored by ADP release by the LDH/PK/NADH coupled assay (see text). B, the reaction was monitored by the PNP coupled assay (see text).

Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

Figure 1

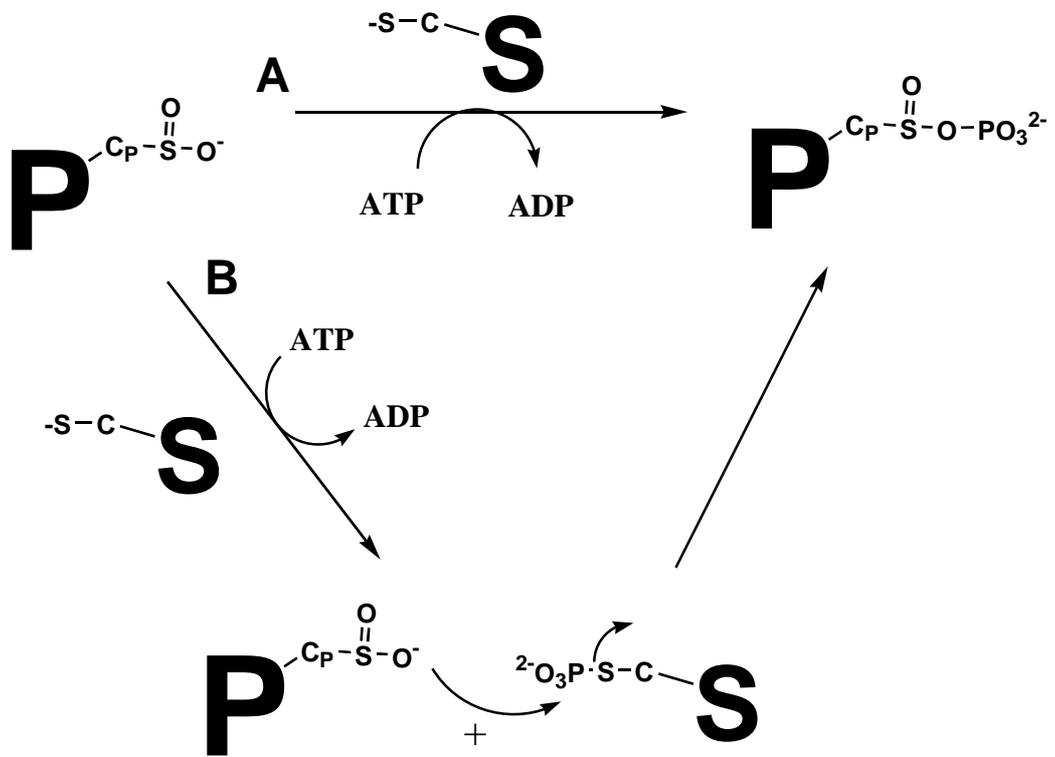
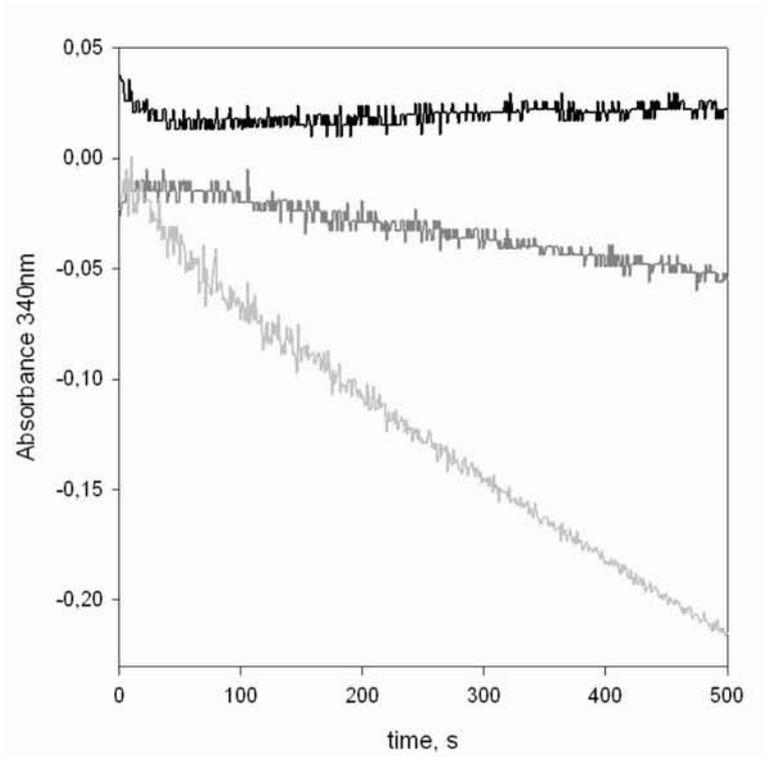
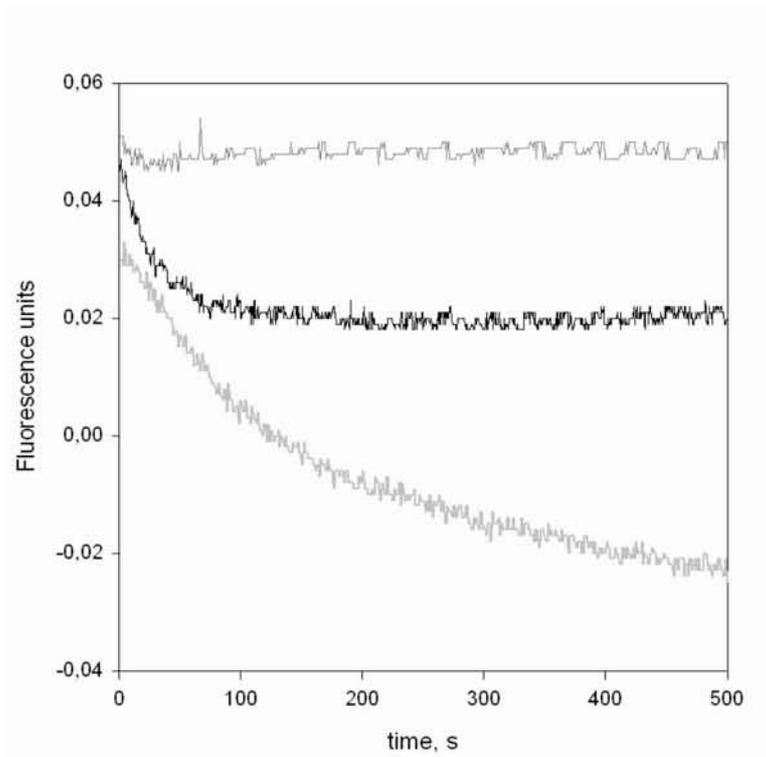


Figure 2

A



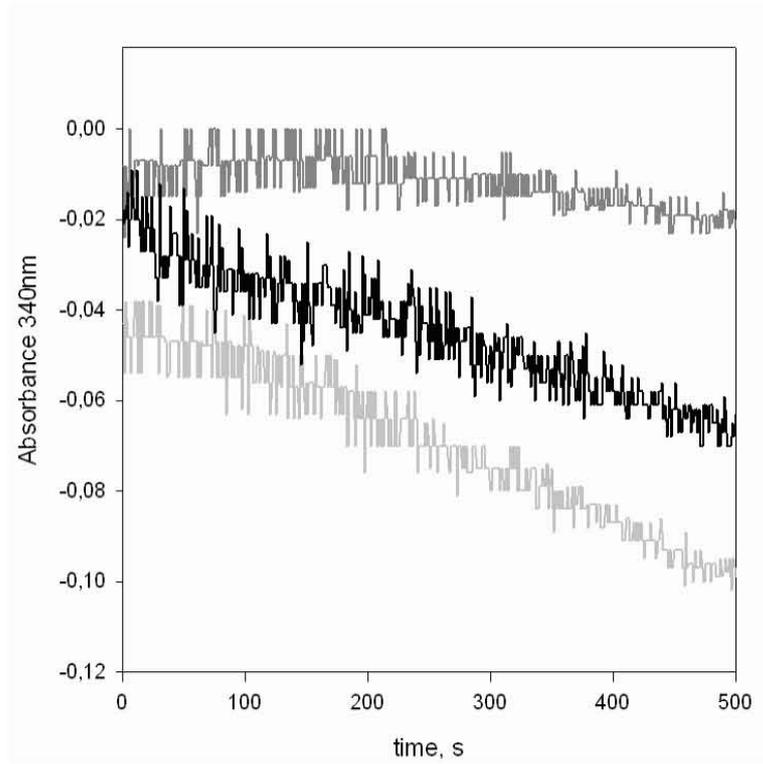
B



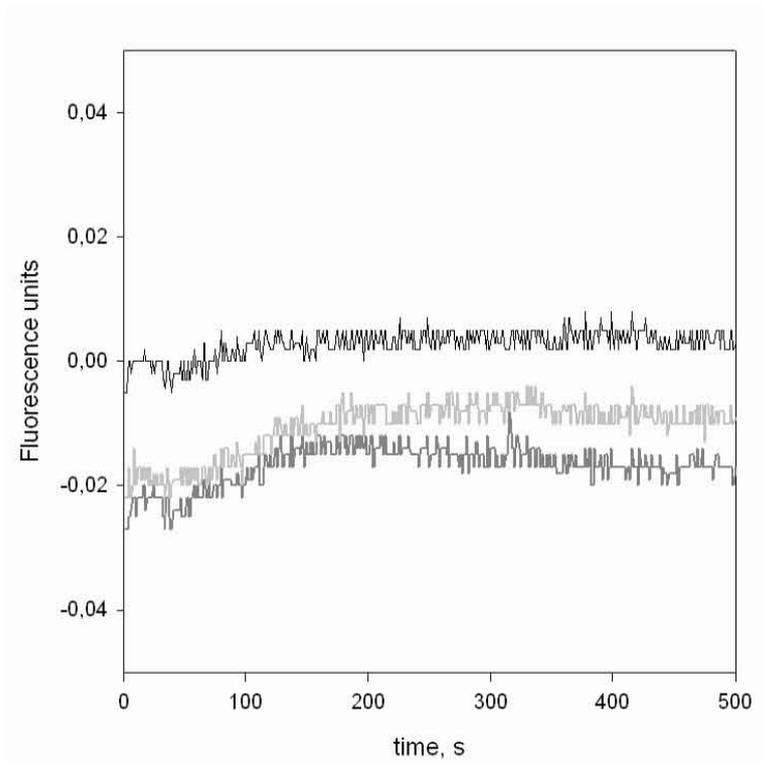
Résultats III : Srx et transfert de phosphate ?

Figure 3

A



B



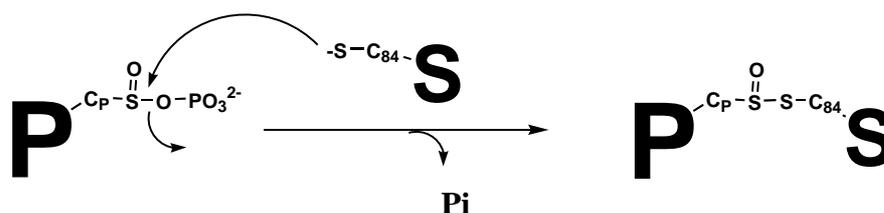
Discussion

Perspectives

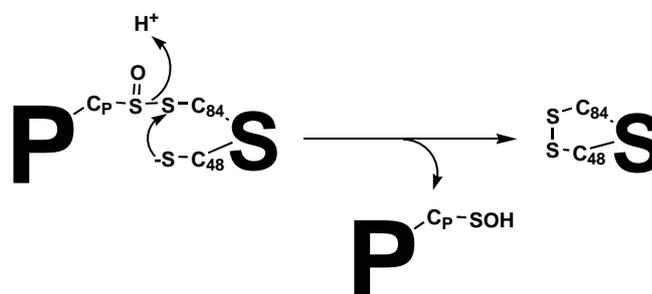
Au début de mon projet de thèse, aucune étude du mécanisme catalytique de réduction des 2-Cys Prx oxydées sous forme d'acide sulfinique par Srx n'avait été abordée. Le mécanisme catalytique proposé par Biteau *et al.* (Biteau *et al.*, 2003) l'avait été sur la base d'observations faites *in vivo* à savoir 1) la dépendance de la réaction pour l'ATP, le Mg^{2+} et la Cys84 de Srx et, 2) la formation d'espèces covalentes Prx-Srx réductibles en présence de thiols.

Les résultats présentés dans le cadre de mon mémoire ont permis de montrer :

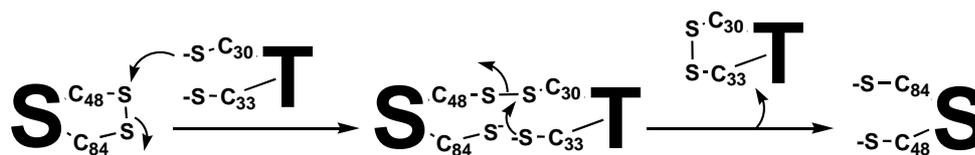
1) l'existence d'une activité réductase de Srx avec la formation d'un intermédiaire de type thiosulfinate entre Srx et Prx, la Cys C_P passant d'un état d'oxydation de +II à +I ;



2) l'implication d'une Cys48 de recyclage dans la Srx de *S. cerevisiae* avec la formation d'une espèce de Srx oxydée pont disulfure (scSrx_{ox}) et de Prx sous forme acide sulfénique, la Cys C_P passant d'un état d'oxydation de +I à 0 ;



3) que scSrx_{ox} est un intermédiaire catalytiquement compétent qui est réduit par la scTrx *via* l'attaque de la Cys30 probablement sur la Cys48 du pont disulfure de la scSrx ;



et ; 4) que le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'acide sulfinique est direct, n'implique pas la Cys84 de Srx et que l'étape cinétiquement limitante de la réaction est associée à cette étape ou à une étape antérieure du mécanisme.

Discussion et Perspectives

Ces résultats nous ont conduits à proposer un mécanisme réactionnel de la Srx de *S. cerevisiae* schématisé dans la figure 61 page 130 basé d'une part sur la caractérisation des espèces thiosulfinate Prx-SO-S-Srx et Srx oxydée scSrx_{ox} formées et d'autre part sur le fait que ces espèces étaient catalytiquement compétentes.

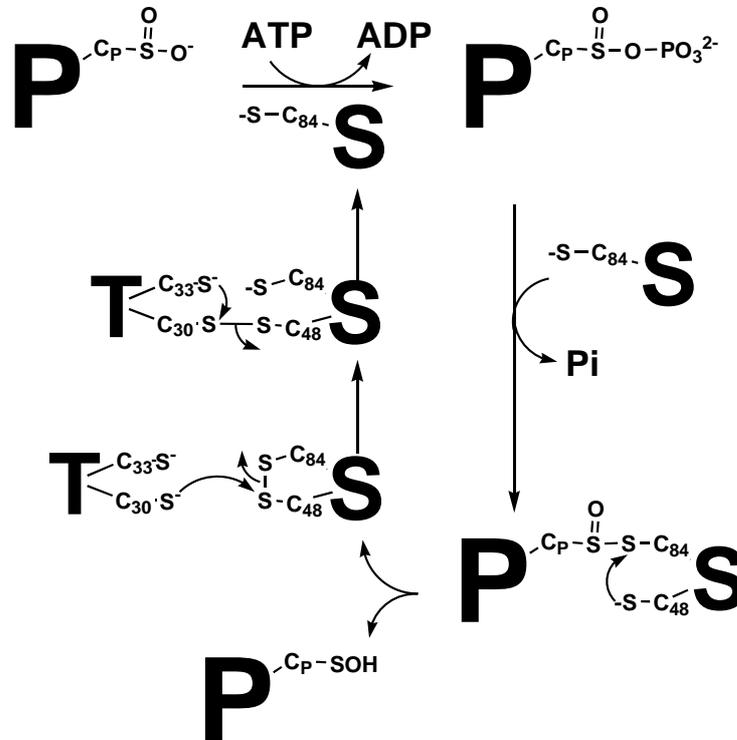


Figure 61 : Mécanisme catalytique de Srx de *S. cerevisiae*.

S = Srx, P = Prx, T = Trx

La caractérisation des espèces impliquées a été faite à partir de techniques telles que l'électrophorèse, l'immunodétection et la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie. Un prérequis à ce type de caractérisation, était de travailler dans des conditions permettant de piéger chacune des espèces donc en absence de réducteur externe à thiol, et dans le cas du piégeage du thiosulfinate de travailler avec une Srx sans Cys de recyclage. En effet, les partenaires et les intermédiaires réactionnels étant des espèces particulièrement réactives vis-à-vis des thiols, les cystéines Cys106 de Srx et Cys171 de Prx, qui ne sont pas impliquées dans le mécanisme catalytique, ont été substituées par une alanine afin de limiter les réactions secondaires et ainsi permettre l'accumulation d'un (des) intermédiaire(s) catalytiquement compétent(s). Cependant, même dans ces conditions, la formation d'espèces dérivées de réactions secondaires a été observée (cf Résultats I). En particulier, la formation d'une espèce PrxS-SSrx à partir de l'intermédiaire thiosulfinate et ayant des propriétés physicochimiques et une masse moléculaire similaires à l'espèce thiosulfinate a compliqué la caractérisation de cette dernière

espèce. Ceci a impliqué la mise au point de conditions de résolution suffisantes en spectrométrie de masse pour pouvoir différencier ces deux espèces de masses moléculaires ~ 37 kDa, distinctes de seulement 16 Da.

La démonstration du statut d'intermédiaire catalytiquement compétent a requis l'application de méthodes cinétiques adaptées, d'autant plus nécessaires que la vitesse de la réaction est lente et donc n'est pas drastiquement supérieure aux vitesses des réactions secondaires. C'est pourquoi nous avons mis au point des tests cinétiques permettant le suivi de chaque étape de la réaction en temps réel. Ce type d'approche permet de distinguer cinétiquement le message spécifique correspondant à la réaction enzymatique, du signal non spécifique plus lent. Dans le cas par exemple de l'espèce thiosulfinate, nous avons ainsi mesuré des constantes de vitesses spécifiques de formation de 2 min^{-1} , compatibles avec la vitesse de la réaction à l'état stationnaire, et ainsi démontré que cette espèce était catalytiquement compétente.

De ces résultats, découlent et restent posées de nombreuses questions sur 1) la chimie de la catalyse et plus particulièrement sur la nature de l'intermédiaire acide sulfinique activé, 2) la nature des facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre Srx et Prx et, 3) l'étape de recyclage des Srx, ne possédant pas de Cys de recyclage, à partir de l'intermédiaire thiosulfinate Prx-SO-S-Srx.

Partie I : Chimie de la catalyse.

A. Nature de l'intermédiaire acide sulfinique activé.

L'activation par phosphorylation de la fonction acide sulfinique portée par les 2-Cys Prx typiques est une étape indispensable à la réduction de cette forme oxydée dans des conditions physiologiques. Nous avons montré que le transfert de phosphate de l'ATP sur l'acide sulfinique était direct, et que l'espèce phosphorylée réagit avec la Cys catalytique de Srx pour aboutir à un intermédiaire de type thiosulfinate. Cependant, la nature de l'espèce phosphorylée qui réagit avec la cystéine catalytique reste à définir.

En effet, un acide sulfinique qui a un $pK_{\text{app}} \sim 2$, doit être sous forme sulfinate dans le site actif de la Srx. Or, le sulfinate peut être représenté sous deux formes de résonance d'égale contribution (Figure 62 page 132) (Reddie et Carrol, 2008).



Figure 62 : Représentation schématique des formes de résonance du groupement sulfinate (d'après Reddie et Carrol, 2008).

Sous la forme (1), le caractère nucléophile s'exprime *via* le soufre. Sous la forme 2, le caractère nucléophile de la fonction sulfinate s'exprime *via* les oxygènes. A noter dans ce cas, le caractère électrophile du soufre, caractère qui est mis à profit dans le mécanisme de désulfuration de l'acide phényl sulfinique par les désulfinases (Lee *et al.*, 2006) (Figure 63 page 132).

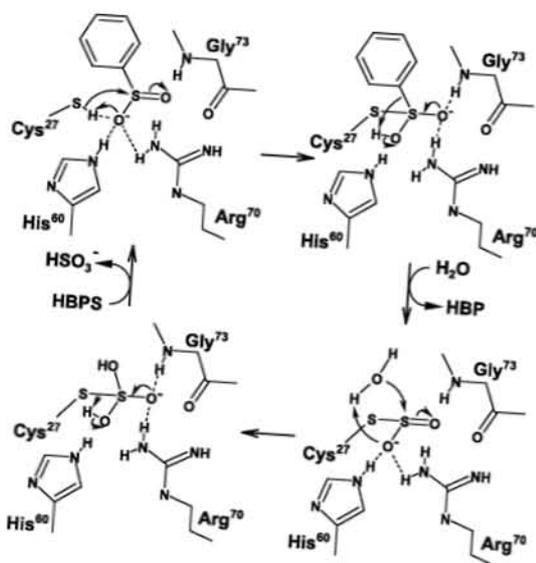
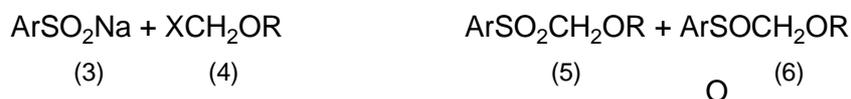


Figure 63 : Mécanisme de désulfuration de l'acide phényl sulfinique par la désulfinase de *Rhodococcus erythropolis* (Lee *et al.*, 2006).

L'activation de l'acide sulfinique se fait par le site oxyanion composé de l'His60 et de l'Arg70. La Cys27 de la désulfinase réagit avec le soufre de l'acide sulfinique pour former un intermédiaire de type thiosulfonate. Cet intermédiaire est hydrolysé et permet la libération du phényl, produit de la réaction, et de l'enzyme sous forme thiosulfite. Cet intermédiaire est ensuite hydrolysé, permettant le recyclage de l'enzyme et la libération du sulfite.

Le caractère nucléophile du sulfinate qui peut s'exprimer *via* le soufre ou les oxygènes a été démontré, et est dépendant de la nature de l'électrophile et des conditions de la réaction. C'est ainsi que la réaction suivante entre l'arènesulfinate de sodium (3) et un halogénoéther (4 avec X = halogène) conduit à la formation d'une sulfone (5) et d'un sulfinate ester (6) (Drabowicz *et al.*, 1990).

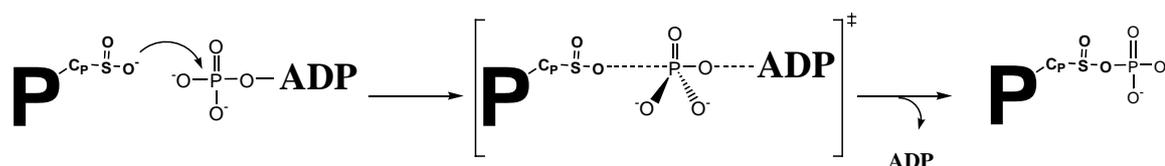


Lorsque l'halogène est un brome, l'espèce sulfinate ester (6) est produite préférentiellement, alors que lorsque l'halogène est un chlore c'est l'espèce sulfone (5) qui est préférentiellement produite, son rendement étant augmenté dans un solvant apolaire (~ 70 %).

Lors de la réduction des PrxSO_2 , si le caractère nucléophile de la fonction sulfinate s'exprime *via* l'un des deux oxygènes, l'attaque axiale sur l'atome de phosphore du groupement phosphate γ de l'ATP, conduira au départ de l'ADP en axial *via* un état de transition de type bipyramide trigonal (Figure 64 A page 133) avec formation de l'intermédiaire anhydride phosphoryl sulfinique. La Cys catalytique de Srx réagira ensuite sur cet intermédiaire avec une attaque axiale sur l'atome de soufre de l'acide sulfinique activé. Ceci aboutira à un état de transition/intermédiaire de type sulfurane de géométrie bipyramide trigonale dans lequel l'atome de soufre sulfinique est dit hypervalent (Okuyama, 1990). Le départ en axial du phosphate conduira à l'intermédiaire thiosulfinate (Figure 64 B page 133).

Si le caractère nucléophile de la fonction sulfinate s'exprime *via* le soufre, l'attaque axiale sur l'atome de phosphore du groupement phosphate γ de l'ATP, conduira au départ en axial de l'ADP *via* un état de transition de type bipyramide trigonal avec formation de l'intermédiaire sulfonyl phosphate (Figure 65 A page 134). Après attaque de la cystéine catalytique de Srx sur l'atome de soufre de l'intermédiaire sulfonyl phosphate, l'intermédiaire thiosulfinate se formerait après réarrangement. A nouveau, on passerait par une géométrie de type bipyramide trigonal (Figure 65 B page 134).

A



B

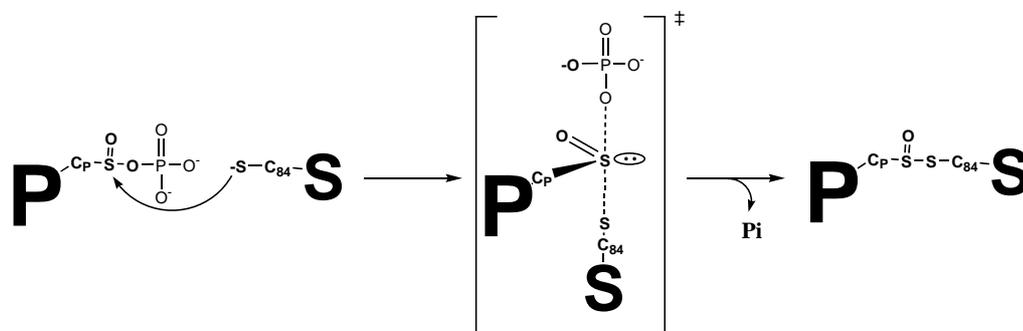
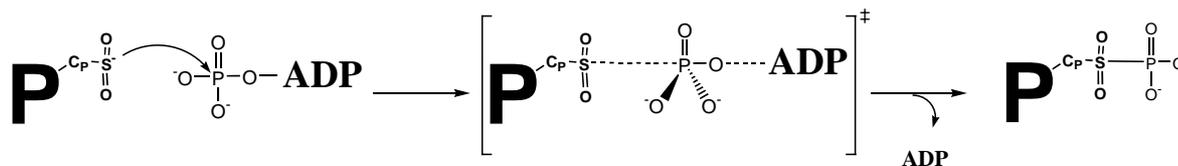


Figure 64 : Schéma de phosphorylation de l'acide sulfinique par l'attaque d'un atome d'oxygène (A) et formation de l'intermédiaire thiosulfinate (B).

S = Srx, P = Prx

Discussion et Perspectives

A



B

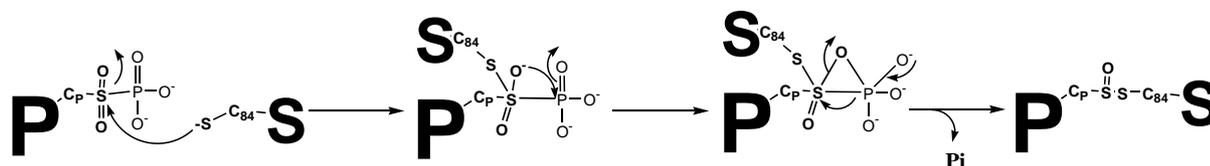


Figure 65 : Schéma de phosphorylation de l'acide sulfinique par l'attaque de l'atome de soufre (A) et formation de l'intermédiaire thiosulfinate (B).

S = Srx, P = Prx

Quelle approche peut être envisagée en vue de démontrer quel mécanisme est opérationnel dans le site actif des Srx sachant que dans les deux hypothèses de mécanisme, l'intermédiaire thiosulfinate se forme ? Dans un premier temps, il serait nécessaire de montrer que l'espèce phosphoryl sulfonate peut conduire effectivement à la formation d'un thiosulfinate (Figure 65 page 134). Pour ce faire, il faudrait utiliser des modèles chimiques de type sulfonyl phosphate, en étudier la réactivité vis-à-vis d'un thiol et démontrer la formation d'un thiosulfinate évoluant, en présence de thiol, en entités oxydées dithiol facilement caractérisables. De façon complémentaire, une étude par chimie théorique en vue de modéliser le chemin réactionnel conduisant à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate par une méthode mixte mécanique quantique/mécanique moléculaire, à partir de modèles chimiques tel que l'éthane sulfinaté et le thiométhane pourrait permettre de privilégier l'un ou l'autre chemin réactionnel.

Ceci étant, un autre facteur doit être intégré, à savoir que les réactions se font dans un site actif d'une enzyme. Ceci peut amener suivant la disposition spatiale des différents partenaires à privilégier un chemin réactionnel plutôt qu'un autre. Dans le modèle de complexe ternaire proposé par Lowther *et coll.* (Figure 48 page 64, résultat I) (Jönsson *et al.*, 2008b), l'un des oxygènes du sulfinate de géométrie tétraédrique semble mieux positionné pour réagir avec le phosphate γ de l'ATP (distance de 1,7 Å) que le soufre (distance de 3,1 Å), ce qui privilégie plutôt le premier mécanisme (Figure 64 page 133).

B. Nature des acides aminés qui seraient impliqués dans la catalyse chimique.

Le mécanisme de réduction de la PrxSO₂ par Srx conduisant à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate puis à la PrxSOH et à la Srx oxydée sous forme de pont disulfure nécessite putativement plusieurs catalyses assistées : i) au niveau de l'étape de transfert du phosphate, la fonction acide sulfonique doit être sous forme sulfinate et accessible. Le transfert du phosphate doit se faire, quelque soit le mécanisme considéré, *via* la formation d'un état de transition de géométrie bipyramide trigonale qui doit être stabilisé, le départ de l'ADP pouvant aussi être assisté par une catalyse acide ; ii) l'attaque de la cystéine catalytique 84 sur la Prx activée implique sa stabilisation *via* le site actif et donc un abaissement de son pK_{app}. A nouveau, l'état de transition bipyramide trigonal formé est sans doute aussi stabilisé et le départ du groupement phosphate est probablement dépendant d'une catalyse acide assistée ; iii) la libération de la PrxSOH est entropiquement favorisée par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans la Srx. Ceci étant, le départ de Prx sous forme acide sulfénique doit aussi être favorisé par une catalyse acide assistée. En effet, le pK_{app} d'un acide sulfénique non activé est d'environ 10 - 11.

Cependant, les constantes catalytiques d'enzymes, comme la D-Ala-D-Ala ligase, l'aspartate kinase ou encore la glutathione synthétase, qui catalysent une étape de phosphorylation d'un groupement carboxylate, sont de l'ordre de la dizaine de s⁻¹ (Daub *et al.*, 1998 ; Kobashi *et al.*, 1999 ; Herrera *et al.*, 2007) alors que l'étape de phosphorylation de PrxSO₂ a une constante de vitesse de 2 min⁻¹. Pour expliquer la faible vitesse observée lors de la formation de l'intermédiaire Prx activée, nous ne pouvons exclure que des éléments de nature structurale soient déterminants. Une hypothèse est que dans le complexe ternaire Prx-Srx-ATP initial formé, la disposition spatiale des différents acteurs impliqués dans la catalyse ne soit pas optimale.

Dans le cas de la réaction catalysée par Srx, l'identification et l'impact de l'ensemble des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse jusqu'à la formation de l'intermédiaire thiosulfinate se heurte à deux limitations importantes : d'une part, l'étude cinétique de la réaction a montré qu'à pH 7 l'étape limitante de la réaction était associée ou se situait avant l'étape de transfert du phosphate. Ceci a comme conséquence, si nous admettons que quelque soit le pH considéré l'étape limitante est inchangée, que nous ne pouvons pas atteindre les constantes cinétiques des autres étapes situées en aval. Si nous voulons déterminer les vitesses de ces étapes, il faut donc pouvoir accéder et préparer en grandes quantités les intermédiaires formés correspondant à ces étapes. Ceci a été possible pour l'intermédiaire scSrx_{ox}. D'autre part, la vitesse de la première étape est faible. Substituer des acides aminés essentiels à la catalyse de la première étape conduira inévitablement à

Discussion et Perspectives

des vitesses trop faibles proches du «bruit de fond» et ne permettra donc pas de définir le rôle de ces acides aminés dans la formation de l'intermédiaire acide sulfinique activé.

Une approche en vue d'identifier les acides aminés ionisables impliqués dans la catalyse enzymatique ou la fixation des substrats consiste à étudier la variation du k_{cat} ou du k_{obs} en fonction du pH et à partir du profil de la courbe d'en déterminer les pK_{app} . Ceci ne permet cependant que d'approcher les pK_{app} de résidus ou de groupements ionisables intervenant jusqu'à l'étape limitante. Récemment, nous avons entrepris d'étudier la variation du k_{obs} de la réaction en fonction du pH en absence de réducteur, en suivant la différence de l'intensité du message de fluorescence entre la PrxSO₂ et la Prx oxydée sous forme pont disulfure (Figure 66 page 137). Le profil obtenu est une courbe en cloche, caractérisée par l'ionisation de deux fonctions, l'une qui doit être déprotonée (pK_{app1} de $6,4 \pm 0,1$) et l'autre qui doit être protonée (pK_{app2} de $7,6 \pm 0,1$) avec une vitesse optimale à pH 6,9. Dans les conditions utilisées, la concentration en substrat PrxSO₂ étant non saturante vis-à-vis de la Srx, nous mesurons potentiellement les états d'ionisations du substrat libre et de l'enzyme libre et/ou de l'enzyme sous forme complexée incluant l'ATP. Les courbes (non montrées) mesurant la variation de la vitesse de la réaction à l'état stationnaire (en présence du système Trx/Trx réductase/NADPH) en fonction du pH, et en concentrations saturantes en substrats, sont similaires à celles obtenues précédemment. Plusieurs interprétations peuvent être avancées pour expliquer cette courbe : 1) si quelque soit le pH, la vitesse de la réaction reste limitée par l'étape de transfert du phosphate, le pK_{app1} de 6,4 pourrait être celui de la fonction acide sulfinique porté par la C_p de Prx. Dans ce cas, il serait fortement augmenté par l'environnement protéique qui doit être soit hydrophobe soit chargé négativement. Le pK_{app2} de 7,6 pourrait être celui de l'His85 dont le rôle, en tant que catalyseur acide, serait de favoriser le relargage de l'ADP ; 2) si l'étape limitante est associée à la formation du thiosulfinate à des pH compris entre 5 et 7, le pK_{app1} pourrait être celui de la Cys84 de Srx. Il est à noter que la Cys84 étant déjà partiellement activée dans l'enzyme libre (pK_{app} de 7,3) (Figure 53 A page 90 ; Chang *et al.*, 2004), cela implique qu'elle serait activée au sein du complexe ternaire avec abaissement de son pK_{app} de 1,2 unités. Le résidu de pK_{app2} 7,6 serait toujours l'His85 et serait toujours impliqué dans le relargage de l'ADP. A noter que l'hypothèse d'un changement d'étape limitante pourra être facilement testée en comparant les vitesses de formation de l'ADP et du phosphate. Elle devrait dans le cas de notre hypothèse être plus rapide pour l'ADP que pour le phosphate.

Comme indiqué dans la page précédente, vu la faible vitesse du processus enzymatique, le rôle de l'His85 ne pourra pas être validé par mutagenèse dirigée. Il en est de même pour l'Arg86 dont le rôle doit vraisemblablement être, comme pour la plupart des réactions enzymatiques impliquant la chimie du phosphate, de stabiliser la structure de l'état de transition de type bipyramide trigonale.

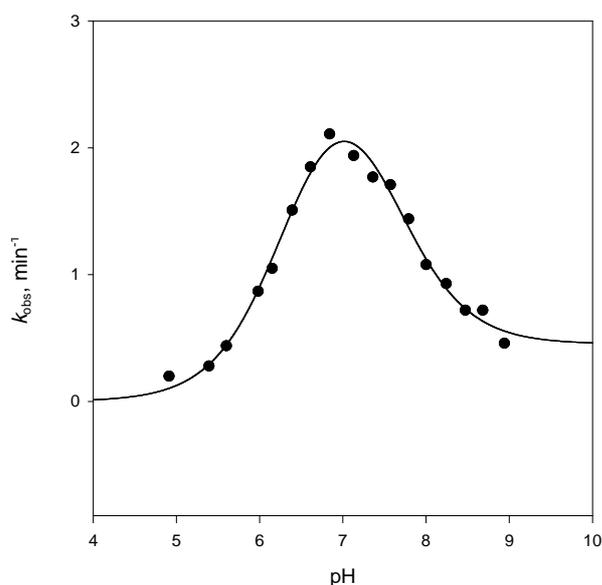


Figure 66 : Cinétique de l'évolution du message de fluorescence de Prx sauvage en fonction du pH.

L'activité est mesurée à 30°C dans du tampon Tricine 120 mM, Imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM, de pH 5 à 9, à l'aide d'un spectrofluorimètre. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm, et l'émission de fluorescence est collectée au travers d'un filtre de seuil égal à 320 nm. Le mélange réactionnel est composé de PrxSO₂ (10 μM), scSrx (5 μM) et ATP/MgCl₂ (1 mM).

Les pK_{app} obtenus sont : $pK_{app1} = 6,4 \pm 0,1$ et $pK_{app2} = 7,6 \pm 0,1$.

Partie II : Reconnaissance structurale et moléculaire entre Srx et Prx.

A. Mécanisme de reconnaissance Prx/Srx.

En solution, la 2-Cys Prx s'associe pour former un homodécamère qui pourrait être en équilibre avec la forme dimérique au cours du cycle catalytique peroxydase (Wood *et al.*, 2003). Ceci pose la question du mode de reconnaissance de la Prx par la Srx en solution et *in vivo*. Nous avons montré que la Prx, réduite et oxydée sous forme d'acide sulfinique, existe sous forme décamerique en solution (Figure 22 page 28 de l'introduction). De plus, au sein de ces deux formes, le thiol et l'acide sulfinique, porté par la C_P, sont stabilisés par l'Arg dans la poche du site actif de la Prx (Figure 23 page 29 de l'introduction). De manière formelle, pendant le cycle catalytique, un équivalent de Srx réduit un équivalent de PrxSO₂. La C_P doit être accessible comme lors de la formation du pont disulfure intermonomère de Prx avec C_R lors de l'activité peroxydase, donc l'interaction avec l'Arg doit être rompue. Ce système moléculaire complexe soulève de nombreuses questions à savoir : 1) quels sont les facteurs structuraux/moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre PrxSO₂ et Srx ; 2) comment est organisé le site actif du complexe PrxSO₂/Srx ; 3) Srx agit-elle sur le décamère

Discussion et Perspectives

de PrxSO₂ et si oui avec quelle stoechiométrie et ; 4) quel serait l'avantage biologique d'une réaction de Srx se faisant au niveau du décimère ?

L'approche structurale utilisée par l'équipe de Lowther qui a résolu la structure d'un complexe covalent artificiel stabilisé par un pont disulfure formé entre la Cys catalytique de hSrx et la Cys C_p de Prx1 (Jönsson *et al.*, 2008a) à l'aide d'un variant de Prx1 dimérique, permet d'apporter des éléments de réponse. Le complexe caractérisé est formé d'un homodimère de Prx et de deux monomères de hSrx (Figure 67 page 138). Les molécules de hSrx sont prises en sandwich entre la surface du site actif d'un monomère de Prx et l'extrémité C-terminale de l'autre monomère de Prx qui recouvre la molécule de Srx par la face opposée au site actif («domain swapping»).

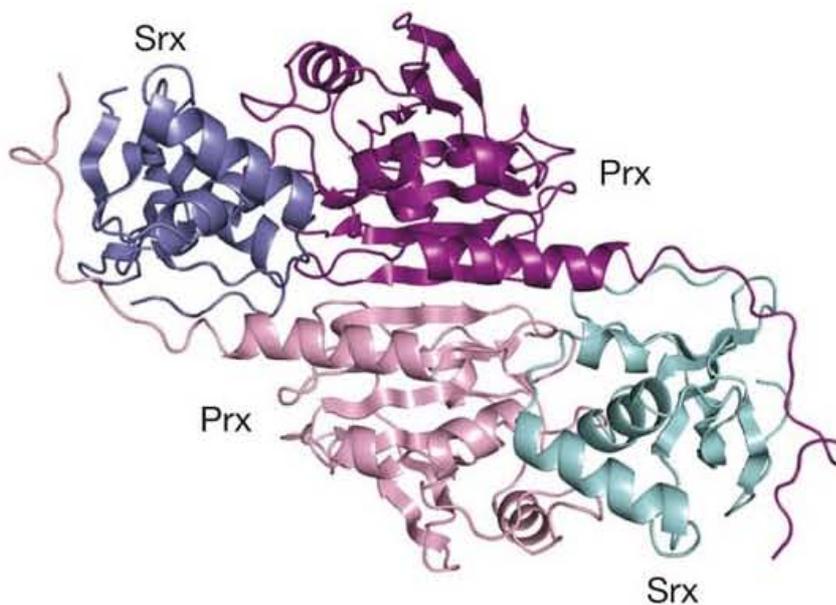


Figure 67 : Structure du complexe Prx1-hSrx (Jönsson *et al.*, 2008a).

Les monomères de Prx1 sont colorés en violet, et les monomères de hSrx sont colorés en bleu.

L'étude de l'interface entre les sites actifs montre que la Phe50 de Prx1 interagit avec une poche hydrophobe de hSrx composée des Leu52 et 82, de la Phe96, des Val118 et 127 et de la Tyr128 (Figure 68 page 139). Cette interaction semble être responsable d'un changement de conformation de Prx déstabilisant l'interaction entre l'acide sulfonique et l'Arg du site actif de Prx, et orientant la C_pSO₂ vers le site actif de Srx. L'extrémité C-terminale de Prx, comportant la C_R et l'hélice α avec le motif YF, est déstructurée et forme des interactions hydrophobes avec des résidus de Srx situés à l'opposé du site actif. Ces résidus sont l'Ile50, la Tyr92, la Phe93 et la Leu117. La déstructuration de l'extrémité C-terminale de la Prx permettrait l'accessibilité de son site actif pour Srx ainsi que la stabilisation du complexe Srx/Prx dans une conformation active. En effet, des variants de Srx de ces quatre résidus présentent une baisse voir une absence d'activité (Jönsson *et al.*, 2008a).

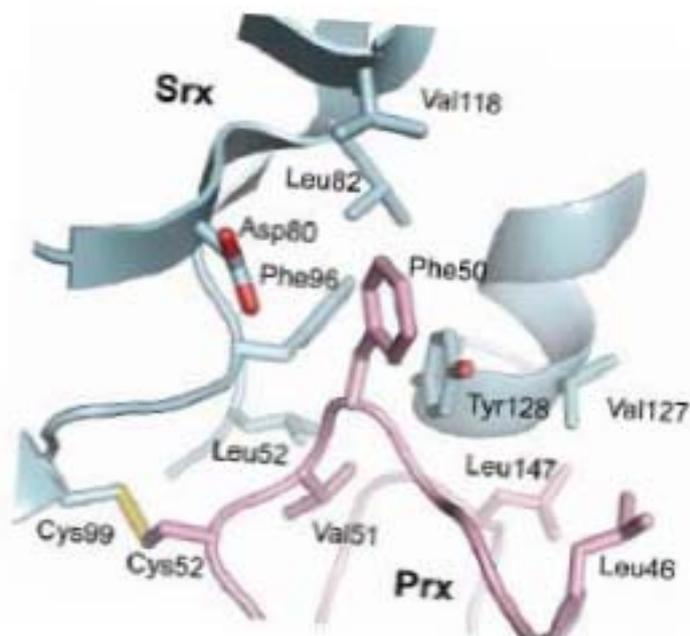


Figure 68 : Interface entre les sites actifs de Prx1 et hSrx (Jönsson *et al.*, 2008a).
Prx1 est colorée en violet, et hSrx est colorée en bleu.

Il est également intéressant de noter que la dynamique conformationnelle de cette région C-terminale de la Prx est également requise pour l'étape de formation du pont disulfure intermoléculaire au cours du cycle peroxydasique de la Prx. En outre, ce sont des différences de flexibilité de cette région qui expliquent la forte sensibilité des Prx d'origine eucaryote vis-à-vis de la suroxydation par rapport aux Prx procaryotes, en raison d'une compétition cinétique entre la vitesse de formation du pont disulfure intermoléculaire et de suroxydation de l'intermédiaire C_p -sulfénique. En conséquence, la reconnaissance structurale entre Srx et Prx pourrait être un facteur cinétique limitant. Si tel est le cas, les pK_{app} titrés ne reflèteraient pas des pK_{app} liés à la catalyse chimique. Une approche en vue de tester cette hypothèse consisterait à suivre la formation de ce complexe en utilisant une sonde spectroscopique d'anisotropie de fluorescence d'un dérivé fluorescent de Srx.

B. Stœchiométrie de l'interaction Prx/Srx.

Parmi les éléments permettant la reconnaissance Prx/Srx, la région précédant la Cys C_p dans la séquence de Prx, incluant la Phe50, forme une boucle qui participe également à l'interface dimère-dimère au sein du décamère de Prx. A l'instar de la région C-terminale de la Prx, la flexibilité conformationnelle de cette boucle, qui est requise pour permettre une bonne reconnaissance structurale de la C_pSO_2 avec Srx, suggère que l'état oligomérique de la Prx pourrait être affecté au cours de la catalyse de Srx. De plus, dans l'hypothèse où le

Discussion et Perspectives

décamère conserverait sa structure au cours de la catalyse, se pose la question de la stœchiométrie et de la coopérativité de l'interaction entre le décamère, les molécules de Srx et l'ATP.

Pour savoir sous quel état oligomérique se trouve la PrxSO₂ lors de sa réduction par Srx, nous avons initié une étude par spectrométrie de masse en conditions natives de l'interaction PrxSO₂ avec différents «ratios» de Srx. Les résultats préliminaires obtenus par le Dr. H. Mazon au laboratoire montrent une fixation spécifique de Srx sur la forme décamerique de Prx. En revanche, une première analyse des résultats semble indiquer une fixation statistique sans effet de coopérativité.

La dynamique de formation des complexes entre Prx, Srx et le cofacteur détermine l'ordre d'interaction et de dissociation des partenaires de la réaction et donc la nature du mécanisme enzymatique. Lors du suivi de la réaction en absence de réducteur, nous obtenons une stœchiométrie de 1 Pi libéré pour 1 Srx. Par contre, en suivant la libération d'ADP en absence de réducteur, nous observons une stœchiométrie d'environ 0,5 ADP formé pour 1 Srx. Une hypothèse est qu'une partie de l'ADP n'est pas relarguée lors de la formation de l'intermédiaire thiosulfinate et serait séquestrée dans Srx lors de l'oxydation de cette dernière sous forme de pont disulfure intramoléculaire. Cette fraction d'ADP produit serait ensuite libérée lors de la réduction de scSrx_{ox}. Cette valeur de 0,5 pourrait être liée à un phénomène de coopérativité au niveau du relargage de l'ADP des complexes entre Prx et Srx, mais aucune donnée à ce jour ne permet de répondre à cette question. En effet, les limites techniques des tests d'activité que nous avons mis au point ne nous ont pas permis de déterminer le mécanisme cinétique de Srx, c'est-à-dire l'ordre de fixation des substrats et l'ordre de relargage des produits.

La caractérisation structurale de complexes entre Prx et Srx a été entreprise en utilisant une stratégie de stabilisation des complexes formés à différents ratios de Srx/Prx par pont disulfure entre la Cys C_P et la Cys catalytique de Srx. Pour cela, la C_P est activée chimiquement par le 2PDS. La Prx ainsi activée est ensuite incubée en présence de «ratios» variables en Srx. L'obtention de cristaux de complexe Prx/Srx, pour une étude structurale classique par Rayons X s'avérant difficile, nous avons engagé notre étude selon deux axes. Dans un premier temps, la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) permettra d'obtenir des informations sur la structure générale des complexes *via* leur rayon hydrodynamique. Dans un second temps, la méthode de Diffusion des Rayons X aux Petits Angles (SAXS) nous permettra de déterminer la structure générale en solution de ces complexes à basse résolution. Des changements conformationnels majeurs par rapport à la structure (Prx-Srx)₂ déterminée par Lowther *et coll.*, ou une fixation non au hasard des molécules de Srx sur le décamère de Prx pourraient ainsi être révélés. Ces études viennent d'être débutées au laboratoire par le Dr. A. Gruez.

Partie III : Devenir de l'intermédiaire thiosulfinate Prx-SO-S-Srx.

A. Srx à deux Cys.

Nous avons montré que pour la Srx de *S. cerevisiae*, la Cys48 de Srx réagit avec l'intermédiaire thiosulfinate pour former un pont disulfure intramoléculaire entre la Cys48 et la Cys84 de Srx avec libération de la Prx sous forme acide sulfénique. La vitesse intrinsèque de formation de l'espèce $scSrx_{ox}$, probablement très rapide, est limitée par celle des étapes précédentes, c'est à dire 2 min^{-1} . Prise isolément, cette espèce est réduite par la ecTrx en présence de Trx réductase avec une vitesse au moins 600 fois plus rapide que le k_{cat} . Le fait qu'en absence de la Cys48, l'étape limitante soit associée au recyclage de Srx par la Trx, démontre que l'espèce $scSrx_{ox}$ constitue un intermédiaire catalytiquement compétent.

L'existence d'une Cys de recyclage présente uniquement, à ce jour, dans quelques Srx de levures (Figure 34 page 43 de l'Introduction), conduit à définir deux classes de Srx. L'enzyme de *S. cerevisiae* appartient à la classe des Srx à deux Cys, classe qui ne comprend aujourd'hui que des Srx de levures. La Cys de recyclage est présente dans une séquence d'environ 20 acides aminés absente dans les Srx de mammifères. Bien que la structure tridimensionnelle de $scSrx$ ne soit pas encore résolue, l'étude des séquences montre que cette insertion se situe au niveau d'une boucle dans la structure tridimensionnelle de $hSrx$ (Figure 69 page 142).

Lors du recyclage de l'activité de $scSrx$, l'attaque de la Cys48 sur le soufre de la Cys84 permet la libération du produit de la réaction en formant un pont disulfure intramoléculaire. Ceci pose la question des pré-requis pour que cette étape soit efficace. Deux facteurs sont essentiels. D'abord, les 2 Cys, l'une sous forme de thiosulfinate localisée au début d'une hélice α et l'autre sous forme thiol, doivent être proches dans l'espace ou tout au moins la flexibilité conformationnelle des structures secondaires dans lesquelles elles sont engagées doit être telle qu'elle permette une proximité spatiale. Ensuite, il faut qu'il y ait une assistance acide pour que le sulfénate de la Prx devienne un bon groupement partant. A cela, on peut ajouter qu'une activation de la Cys48 pourrait aussi favoriser la formation du pont disulfure bien que cela ne soit pas indispensable, le facteur entropique étant sans doute suffisant.

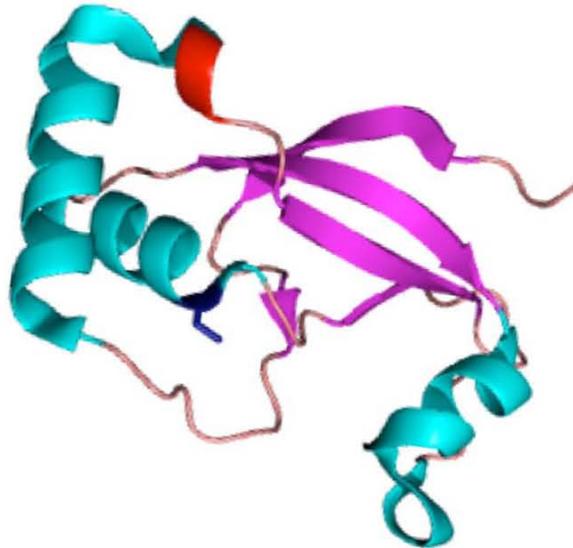


Figure 69 : Structure de la Srx humaine (d'après Jönsson *et al.*, 2005).

Les hélices α sont colorées en bleu-vert, les régions non structurées en rose et les brins β en violet. La zone colorée en rouge est la zone d'insertion de la vingtaine d'acide aminés pour les Srx à deux Cys. La Cys catalytique est colorée en bleu foncé.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la résolution de la structure en solution de scSrx par RMN, en collaboration avec le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR7568 CNRS-INPL, Dr. Marie-Christine Averlant-Petit). Les premiers résultats d'expériences de dynamique moléculaire obtenus sur l'enzyme réduite, montrent que scSrx possède des régions très flexibles, dont la région contenant la Cys48. Ces résultats suggèrent que la Cys48 se trouve dans une région flexible qui peut se positionner à une distance de la Cys84 compatible avec la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. La présence de cette région très flexible peut expliquer que nos efforts pour obtenir des cristaux de scSrx, en vue d'en déterminer la structure tridimensionnelle par radiocristallographie, se soient montrés infructueux alors que la structure par RX de l'enzyme humaine a pu être obtenue par l'équipe de Lowther. En vue d'analyser les contraintes structurales associées à la formation de ce pont disulfure, l'étude structurale de la scSrx oxydée s'avère nécessaire.

Le recyclage de l'activité Srx *in vivo* implique l'existence d'un réducteur à thiol. L'étude cinétique de la réduction de scSrx_{ox} par la scTrx montre que cette réaction, en conditions de «single turn-over», est très efficace ($k_2 = 5.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), avec une reconnaissance entre les deux partenaires ($K_{\text{Trx}} = 56 \mu\text{M}$) et une constante de vitesse de 27 s^{-1} . Ces résultats suggèrent fortement que la scTrx constitue le réducteur physiologique de Srx dans *S. cerevisiae*.

L'identification de Srx comme cible de la Trx pose la question des facteurs moléculaires à l'origine de la reconnaissance structurale entre les deux molécules, sachant que Trx est une protéine ubiquitaire qui reconnaît spécifiquement de nombreuses cibles. L'examen des quelques structures tridimensionnelles de complexes connus entre les Trx et

différents partenaires montrent que les complexes ont une faible surface d'interactions essentiellement dues à des interactions hydrophobes et liaisons hydrogène entre chaînes principales (Maeda *et al.*, 2006 ; Chartron *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous envisageons de caractériser la zone d'interaction entre la Srx et la Trx de *S. cerevisiae* et ce à partir de la structure 3D d'un complexe covalent Srx-S-S-Trx formé entre la Cys48 de scSrx et la Cys30 de scTrx.

Enfin, il est à noter que des résultats non publiés effectués sur des souches $\Delta trx1/2$, $\Delta trr1$ et ySOG par l'équipe du Dr. Toledano, montrent, *in vivo*, qu'en absence de synthèse de Trx cytoplasmiques ou de Trx réductase, le profil d'oxydation de Srx est complexe mais est différent de celui observé dans une souche sauvage alors qu'il est semblable dans une souche mutée où la synthèse de GSH est fortement diminuée (Biteau, 2005). Ces résultats suggèrent que le contrôle de l'état d'oxydation de Srx dans *S. cerevisiae* est bien assuré par les Trx, ce qui est en accord avec nos résultats.

B. Srx à une Cys.

Les Srx de mammifères et de plantes ne contiennent pas de Cys de recyclage. Le recyclage de l'activité de Srx et la libération de PrxSOH nécessitent donc la réduction de l'intermédiaire thiosulfinate par une attaque directe d'un réducteur sur le soufre sulfénique de la fonction thiosulfinate. Le fait que l'étape de recyclage de mSrx ou C48S scSrx devienne limitante en présence de Trx, avec une vitesse très faible de l'ordre de 0.2 min^{-1} , suggère que la Trx ne peut être le réducteur physiologique des Srx à une Cys.

La sestrine, qui avait été copurifiée avec la Srx, pourrait être ce réducteur. Elle est décrite comme possédant un domaine homologue à l'enzyme AhpD, enzyme qui permet le recyclage de la 2-Cys Prx AhpC de *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, le domaine homologue à AhpD ne possède, à l'inverse d'AhpD, qu'une seule Cys. Le recyclage de Srx par la sestrine nécessiterait donc la présence d'un autre réducteur en vue de réduire le complexe Srx/sestrine, ce qui n'est pas en faveur d'un rôle des sestrines dans le recyclage de l'activité des Srx de mammifères.

Un réducteur autre que la Trx ou la sestrine doit donc être impliqué. Dans ce contexte, le mutant C48S Srx de *S. cerevisiae* est un bon modèle d'études des Srx de mammifères dans la mesure où l'intermédiaire thiosulfinate ne peut conduire à une Srx oxydée sous forme de pont disulfure. Les études faites par l'équipe du Dr. Toledano ont montré (Biteau, 2005), chez *S. cerevisiae*, qu'il n'y a pas de différence du phénotype de croissance après traitement par H_2O_2 entre une souche produisant la Srx sauvage et une souche produisant la C48S Srx. Ceci suggère que le recyclage de la Srx sous forme de complexe avec la Prx *via*

Discussion et Perspectives

une liaison thiosulfinate implique un réducteur qui comme indiqué plus haut ne peut être la Trx. Bien que GSH ne soit pas impliqué dans la régénération de la Srx oxydée sous forme de pont disulfure, rien n'exclut l'implication de GSH dans le recyclage de la Srx de *S. cerevisiae* liée à la Prx sous forme d'une liaison thiosulfinate. Pour valider une telle hypothèse, plusieurs études *in vivo* pourraient être faites. Dans un premier temps, le phénotype de croissance après traitement par H₂O₂ d'une souche de *S. cerevisiae* n'exprimant plus la Srx ni les Trx cytoplasmiques ou la thiorédoxine réductase ($\Delta srx1$, $\Delta trx1/2$) et surexprimant C48S Srx, pourrait être établi. L'absence de phénotype confirmerait que l'intermédiaire thiosulfinate est réduit par un autre réducteur autre que la Trx. Si le GSH est ce réducteur, la souche ySOG de *S. cerevisiae* qui présente une concentration intracellulaire en GSH 100 fois inférieure à celle d'une souche sauvage (Spector *et al.*, 2001) délétée du gène codant Srx sauvage mais exprimant C48S Srx devrait présenter un phénotype de croissance différent après traitement à H₂O₂. Un tel résultat est-il attendu ? Si le GSH intervient, le mécanisme de régénération de C48S Srx passerait par la formation d'un intermédiaire Srx/GSH qui serait ensuite réduit par une glutarédoxine formant un intermédiaire Grx-S-SG, recyclé *via* le système GSH/Glutathion réductase. Dans un tel mécanisme, la formation de l'intermédiaire Srx/GSH se fait suivant un processus cinétique de deuxième ordre, donc qui ne dépend que de la concentration de la forme réactive, thiolate, du GSH. Dans *S. cerevisiae*, le pH intracellulaire est de ~ 6,6 et la concentration en GSH est de l'ordre du millimolaire. Vu le pK_{app} du GSH qui est de 8,7 (Marchal et Branlant, 1999), la concentration de GSH, sous forme thiolate, serait de l'ordre de 0.01 mM. Dans les cellules de mammifères et les chloroplastes de plantes, le pH intracellulaire est de l'ordre de 7,5 alors que la concentration en GSH est sensiblement la même que dans *S. cerevisiae*. La concentration en GSH sous forme thiolate serait donc de l'ordre de 0.1 mM, ce qui ne devrait pas être limitant dans le processus cinétique global de réduction de PrxSO₂ de mammifères. L'implication du GSH dans le recyclage de l'activité Srx de mammifères semble donc possible mais demandera néanmoins à être validée par des études cinétiques *in vitro* sur la mSrx et C48S scSrx avec le système GSH/Grx.

Matériels

&

Méthodes

A. Matériel biologique et milieux de culture.

A.1 Souches bactériennes.

E. coli DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hscR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Cette souche est utilisée pour la préparation d'ADN plasmidique.

E. coli BL21 (DE3) : *hdsS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7* gène1). Cette souche est utilisée pour l'expression d'une séquence codante clonée sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, reconnu de façon spécifique par l'ARN polymérase du bactériophage T7, par exemple dans le cas des plasmides de la série pET (Novagen).

E. coli C41 (DE3) : souche dérivée de la souche BL21 (DE3): *hdsS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7* gène1) plus deux mutations non caractérisées (Miroux et Walker, 1996).

A.2 Plasmides.

pET-20b-Srx Σ : plasmide portant la séquence nucléotidique synthétique, optimisée pour l'expression de la protéine chez *E. coli*, codant Srx de *S. cerevisiae* (scSrx), sous le contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline.

pET-28b-Tsa : plasmide portant la séquence nucléotidique codant Tsa1 de *S. cerevisiae* (Prx) sous forme de fusion N-terminale avec une séquence codant une étiquette Histidine, sous contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.

pET-28b-PNP : plasmide portant la séquence nucléotidique codant la PNP de *E. coli* sous forme de fusion N-terminale avec une séquence codant une étiquette Histidine, sous contrôle du promoteur *lac*. Ce vecteur porte le gène de résistance à la kanamycine.

A.3 Milieux de culture bactérienne.

Milieu riche LB (Luria Bertani) : tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH. Pour les milieux gélosés, de l'agar est ajouté à raison de 17 g/L de milieu de culture avant stérilisation. Les milieux sont autoclavés pendant 20 min à 120 °C et à 1 bar. Afin de sélectionner les clones recombinants, l'antibiotique approprié est

Matériels et Méthodes

ajouté après stérilisation. Ce milieu est utilisé pour la réalisation des minipréparations d'ADN plasmidique ainsi que pour les précultures pour la production des différentes protéines.

Milieu riche SOC : tryptone (20 g/L), extrait de levure (5 g/L), NaCl (5 g/L), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM). Ce milieu est utilisé pour la régénération des bactéries compétentes après transformation.

Milieu auto-inductible ZYM 5052 : tryptone (10 g/L), extrait de levure (5 g/L), Na₂HPO₄ (25 mM), KH₂PO₄ (25 mM), NH₄Cl (50 mM), Na₂SO₄ (5 mM), glycérol (0,5%), glucose (0,05%), lactose (0,2%), MgSO₄ (2 mM), FeCl₃ (5 μM), CaCl₂ (2 μM), MnCl₂ (1 μM), ZnSO₄ (1 μM), CoCl₂ (0,2 μM), CuCl₂ (0,2 μM), NiCl₂ (0,2 μM), Na₂SeO₃ (0,2 μM), Na₂MoO₄ (0,2 μM) et H₃BO₃ (0,2 μM) (Studier, 2005). Le pH est ajusté à 7,4. Ce milieu est utilisé pour la production de Tsa et de PNP. L'auto-induction repose sur les mécanismes mis en œuvre par la bactérie pour réguler l'utilisation des sources d'énergie carbonées présentes dans le milieu de culture. En présence de glucose, la répression catabolique empêche l'entrée du lactose dans la cellule par la lactose perméase. Quand le glucose est consommé en totalité, le lactose peut être pris en charge pour être converti en allolactose par la β-galactosidase, l'inducteur naturel du promoteur *lac* dont dépend l'expression de l'ARN polymérase T7 et donc de la protéine à exprimer.

Milieu GRAFFINITY : milieu LB, glucose (0,5%), HEPES (20 mM), lactose (0,6%). Ce milieu est utilisé pour la production de scSrx.

B. Techniques de génie génétique.

B.1 Préparation de l'ADN plasmidique.

B.1.1 La minipréparation.

La minipréparation d'ADN est utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN dans un but analytique, à partir de 5 mL de culture. Les cellules sont lysées grâce à une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1%, le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 90%. Le culot ainsi obtenu

est ensuite lavé à l'éthanol à 70% puis séché, repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, et finalement traité 1 heure à 37 °C par la ribonucléase A (1 µg/mL).

B.1.2 Analyse de l'ADN.

Pour vérifier la taille des plasmides purifiés et du fragment du gène d'intérêt inséré après purification, l'ADN (500 ng) est hydrolysé par des enzymes de restriction (3 à 5 unités) pendant une heure et demi à 37 °C dans les conditions préconisées par les fournisseurs. Les fragments d'ADN hydrolysés, obtenus par coupure simple par *NdeI* (Biolabs) et par *SacI* (MBI Fermentas) et par double coupure (*NdeI+SacI*), sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant du bromure d'éthidium et révélés sous ultra violet. La taille des plasmides est déterminée par comparaison à un marqueur de taille (100 bp plus, MBI Fermentas).

B.1.3 Préparation et transformation des bactéries compétentes.

Cette méthode est utilisée pour transformer les souches d'*E. coli* DH5α, BL21(DE3) et C41(DE3). Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB (milieu SOC sans glucose) à une température comprise entre 35 et 37 °C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5. Après centrifugation, le culot est repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7). Après incubation 30 min dans la glace et centrifugation, le culot est repris dans 1/10^{ème} du volume initial de solution TB, en présence de diméthyle sulfoxyde (7 % final) et incubé 2 heures dans la glace. Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C (Inoue *et al.*, 1990).

La méthode classique de transformation des bactéries compétentes est utilisée (Sambrook *et al.*, 1989). La transformation est réalisée en mélangeant 1 à 100 ng de plasmide et 50 µL de bactéries compétentes. Après incubation dans de la glace pendant 30 min, le mélange est soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42 °C. Les cellules sont ensuite régénérées 1 heure à 37 °C en milieu SOC avant d'être étalées sur boîte LB avec l'antibiotique de résistance approprié au plasmide utilisé. Les boîtes sont enfin placées à 37 °C pendant une nuit.

Matériels et Méthodes

B.2 Mutagenèse dirigée par PCR.

La méthode de mutagenèse dirigée par PCR utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* de *Pyrococcus furiosus* pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité. Etant donnée la faible vitesse d'élongation de la *Pfu*, liée à son activité 3'-exonucléase, il faut adapter les durées d'élongation en fonction du plasmide (2 min/kb).

Le protocole nécessite aussi un plasmide double brin et deux oligodésoxyribonucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, servent d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase, ce qui conduit à un plasmide muté, aux extrémités non reliées.

Le produit amplifié par PCR est ensuite traité par l'endonucléase *DpnI* (Biolabs, séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, afin de digérer l'ADN parental méthylé et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches de *E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *DpnI*. Une fraction du mélange de digestion, contenant l'ADN double brin muté, circulaire et coupé, est utilisée pour transformer des bactéries DH5 α compétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et l'amplifier. Après transformation de 50 μ L de cellules DH5 α compétentes par 1 à 5 μ L de mélange de PCR, les cellules sont cultivées pendant une nuit sur un milieu solide sélectif.

C. Production, purification de Prx et PNP.

C.1 Production.

Les protéines Prx et PNP sont produites dans la souche BL21(DE3), transformée par le vecteur plasmidique pET-28b-Tsa ou pET-28b-PNP, dans du milieu ZYM 5052 supplémenté en kanamycine (50 mg/L). Les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO_{600nm} puis incubées à 37°C sous agitation pendant 16 heures. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

C.2 Purification.**C.2.1 Extraction.**

Après suspension du culot de cellules dans du tampon start (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5), le mélange est passé deux fois successivement dans un désintégrateur de cellules sous une pression de 1350 bar (Constant Cell Disruption Systems), à 4 °C, puis centrifugé à 12000 g à 4 °C pendant 40 min. Le surnageant correspond à l'extrait brut débarrassé des débris cellulaires insolubles.

C.2.2 Chromatographie d'affinité sur complexe Ni^{2+} (IMAC).

La protéine est retenue sur la résine grâce à des interactions spécifiques entre les ions Ni^{2+} , fixés préalablement à la résine, et la séquence His-Tag fusionnée du côté N-terminal. Ces interactions sont dues aux propriétés des histidines dont le noyau imidazole possède un doublet d'électrons libres (à $\text{pH} > \text{p}K_a$), porté par un atome d'azote, pouvant former des complexes avec les ions métalliques divalents comme le Cu^{2+} ou le Ni^{2+} . Les ions Ni^{2+} utilisés pour cette purification, sont fixés à la résine qui possède des groupements iminodiacétiques, chélateur de ces ions.

Le surnageant filtré sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 μm , est injecté sur la colonne Ni Sepharose HP (25 ml, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC (Pharmacia), préalablement équilibrée avec le tampon start, en présence de 50 mM d'imidazole. La présence d'imidazole lors de la charge a pour but d'éliminer la fixation non spécifique des protéines cellulaires, tout en assurant la fixation de la totalité de Prx ou PNP. L'imidazole contenu dans le tampon d'élution entre en compétition avec les chaînes latérales des histidines de l'étiquette His de la protéine. L'élution est obtenue grâce à un palier d'imidazole à une concentration de 500 mM, et est suivie par la mesure de la $\text{DO}_{280\text{nm}}$.

C.2.3 Concentration et conservation des protéines.

Les fractions contenant Prx ou PNP pure, identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE, sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (limite d'exclusion de 10 kDa). La protéine Prx est dialysée contre du tampon TK (Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, pH 7,0) en présence de DTT 20 mM, et additionné de 5% de glycérol. La protéine est enfin conservée à -20 °C après ajustement à 15% en glycérol.

Matériels et Méthodes

La protéine PNP est dialysée contre du tampon TK et est ensuite lyophilisée pour une conservation à -20 °C.

D. Production, purification de la Srx de *S. cerevisiae*.

D.1 Culture et extraction.

La protéine Srx est produite dans la souche C41(DE3) transformée par le plasmide pET-20b-Srx Σ dans du milieu GRAFFINITY supplémenté en ampicilline (200 mg par litre). Dans un premier temps, les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO_{600nm} dans du LB plus glucose 0,5% supplémenté en ampicilline, puis incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 1,2 et 1,5. Les cultures sont ensuite diluées 2 fois par ajout de LB supplémenté en lactose 0,6% final, Hepes 20 mM final et IPTG 1 mM final (milieu GRAFFINITY), et sont incubées à 20 °C sous agitation pendant 18 heures. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g.

Les conditions d'extraction des protéines solubles sont les mêmes que celles décrites respectivement dans le paragraphe §C.2.1., en utilisant le tampon MES (MES 100 mM, pH 6,1) plus 0,1 % de Triton X-100.

D.2 Précipitation au sulfate d'ammonium.

Après extraction, le surnageant dilué à une DO_{280nm} de 25 est amené à 55% de saturation en sulfate d'ammonium et est incubé une heure à 4 °C sous agitation. La protéine Srx est récupérée dans le culot après 60 min de centrifugation à 12000 g.

D.3 Chromatographie échangeuse de cations.

Le culot de précipitation repris dans le tampon MES est injecté, après filtration sur une membrane d'acétate de cellulose 0,45 μ m, sur une colonne échangeuse de cations de type SP-Sépharose HP (résine portant des groupements sulfopropyl, volume de 75 ml, Amersham Biosciences), couplée au système FPLC (Pharmacia), préalablement équilibrée avec le même tampon. La protéine Srx est éluée par un gradient linéaire en KCl de 0 à 1 M sur 3 volumes colonne. Cette étape permet de séparer Srx d'une grande partie des contaminants

protéiques grâce à son caractère basique (pI théorique de 9,2). Les fractions contenant Srx, identifiées par électrophorèse de type SDS-PAGE sont rassemblées.

D.4 Chromatographie d'interactions hydrophobes.

Les fractions contenant Srx issues de la chromatographie échangeuse de cations sont ajustées à 1 M de sulfate d'ammonium, puis injectées sur colonne de type Phényl Sépharose HP (volume de 75 ml, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC (Pharmacia), préalablement équilibrée dans le tampon MES/SA (MES 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 1M, pH 6,1). Les protéines sont éluées par deux gradients linéaires en sulfate d'ammonium, le premier de 1 à 0,5 M en 1,5 volumes colonne, et le deuxième de 0,5 à 0 M en 4,5 volumes colonne. Cette étape permet de séparer Srx des contaminants protéiques en fonction de leur degré d'hydrophobie de surface.

Les fractions contenant Srx sont concentrées, dialysées contre du tampon TK et Srx est conservée sous forme précipitée à -20 °C en présence de DTT 20 mM et de sulfate d'ammonium à 70% de saturation.

E. Oxydation de Prx de *S. cerevisiae* sous forme acide sulfinique et sous forme disulfure.

E.1 Mise au point du test d'activité peroxydase de Prx.

L'activité peroxydasique de Prx est mesurée en utilisant la Trx comme réducteur, qui permet de coupler la réaction au système Trx/Trx réductase/NADPH, et de suivre la consommation de NADPH par spectrophotométrie à 340 nm. Le mélange réactionnel, contenant H₂O₂, la Trx, la Trx réductase et le NADPH, est incubé à 30 °C dans du tampon TK. Une mesure est enregistrée à blanc avant de déclencher la réaction avec Prx.

La Trx et la Trx réductase d'*E. coli* ont été produites et purifiées au laboratoire selon les protocoles décrits précédemment (Mulrooney, 1997 ; Mossner *et al.*, 1998).

E.2 Oxydation de la Cys catalytique de Prx sous forme acide sulfinique.

La forme de Prx suroxydée en acide sulfinique sur la Cys C_p (PrxSO₂) est obtenue en présence du substrat H₂O₂ et d'un réducteur permettant de placer l'enzyme en conditions de

Matériels et Méthodes

cycle catalytique. La protéine Prx est incubée à 30 °C en présence d'H₂O₂ à 5 mM et de DTT à 100 mM, pendant 10 minutes ; un second ajout de 5 mM de H₂O₂ suivi d'une incubation de 10 minutes à 30 °C permet d'atteindre un degré d'oxydation de la Cys C_P en acide sulfinique supérieur à 97 %, suivi par la perte de l'activité peroxydase. Le mélange réactionnel est dessalé par filtration sur gel sur une colonne de type Econo-Pac 10DG (Biorad) pour éliminer le DTT et H₂O₂ en excès. La Cys C_P de C171A Prx (mutée sur la Cys C_R) est oxydée sous forme acide sulfinique par le même protocole.

F. Caractérisation biochimique des protéines.

F.1 Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Ce type d'électrophorèse (Laemmli, 1970) permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification, ainsi que d'analyser les espèces covalentes protéiques produites au cours de la réaction de Srx en absence de réducteur. Après concentration des protéines par migration dans un gel à 5 % en polyacrylamide, celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 12,5 % en polyacrylamide. Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie R-250 (Studier, 2005).

F.2 Détermination de la masse moléculaire des protéines par spectrométrie de masse en électrospray et en conditions dénaturantes.

La technique de spectrométrie de masse nécessitant un échantillon exempt de toute trace de sels, 500 µg de protéines sont dessalés par chromatographie en phase inverse sur une colonne de type C8 (Aquapore RP-300, Brownlee columns, volume de 1,6 ml) couplée au système ÄKTA explorer (Amersham Biosciences). Les protéines sont éluées par un gradient de 0 à 80 % en acétonitrile/TFA 0,1 % en 10 volumes colonne. La fraction la plus concentrée est ensuite lyophilisée.

Les masses moléculaires des protéines ont été déterminées au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique UMR CNRS-ULP 7509 à Strasbourg dirigé par le Dr A. Van Dorsselaer. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre VG-Bio triple quadripole (Micromass).

F.3 Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines.

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été déterminé à l'aide des méthodes de Lewis (Mach *et al.*, 1992) et de Gill et von Hippel (Gill et von Hippel, 1989). La méthode de Lewis repose sur le calcul de la concentration en protéine par une relation empirique :

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

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

F.4 Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB).

Le contenu en thiols libres des protéines purifiées est déterminé par réaction avec le DTNB (0,3 mM) en suivant l'apparition du thionitrobenzoate libéré à 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La concentration en protéine (7,35 μN en site) est choisie pour donner un signal de 0,1 $DO_{412 \text{ nm}}$ par SH libre. En conditions dénaturantes (SDS 2% final), l'expérience permet de doser la totalité des cystéines réduites. Le tampon utilisé est du tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2mM, pH 8.

F.5 Spectres de fluorescence de Srx et de Prx réduite et oxydée.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été réalisés sur un fluorimètre Flx (SAFAS) à une concentration en enzyme de 1 μM , en tampon TK. Pour les spectres d'excitation, la longueur d'onde d'émission est fixée à 340 nm, la longueur d'onde d'excitation variant de 260 à 320 nm par incrément de 1 nm. Pour les spectres d'émission, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 280 ou à 295 nm, la longueur d'émission variant de 300 à 500 nm par incrément de 1 nm.

G. Caractérisation enzymatique de la Srx de *S. cerevisiae*.

G.1 Technique d'étude des propriétés enzymatiques.

G.1.1 Test d'activité en présence du réducteur Trx.

Les tests d'activité sont effectués dans le tampon TK à 30 °C en utilisant la Trx et la Trx réductase de *E. coli*. La disparition du NADPH est suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm au cours du temps. Le mélange réactionnel comporte : PrxSO₂ (100 μM), ATP (1 mM), MgCl₂ (1 mM), Trx (50 μM), Trx réductase (0.5 μM), NADPH (200 μM), l'ajout de Srx déclenchant la réaction. Une mesure à blanc est enregistrée systématiquement avant l'ajout de Srx et est déduite de la mesure finale. La Trx jouant le rôle de réducteur dans les cycles catalytiques de Srx et de Prx libérée sous forme oxydée en acide sulfénique, deux moles de NADPH sont consommées par mole de PrxSO₂, soit un coefficient d'extinction molaire résultant à 340 nm de $2 * 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ soit $12400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la réaction.

G.1.2 Détermination des paramètres cinétiques à l'état stationnaire.

Les paramètres cinétiques de Srx pour PrxSO₂ et pour l'ATP sont déterminés dans les conditions des tests d'activité en faisant varier la concentration d'un partenaire dans une gamme allant de 0,5 à 10 K_M , la concentration des autres substrats restant fixe. Les points expérimentaux sont analysés, à l'aide du logiciel Sigma plot 6.0, par régression non linéaire à l'équation de Michaelis-Menten $k_{\text{obs}} = k_{\text{obsmax}} * [S] / (K_M + [S])$, avec [S], concentration du substrat variable.

G.1.3 Cinétique de l'évolution du message de fluorescence de Prx lors de la réaction catalysée par Srx, en fonction du pH.

Cette technique est fondée sur la variation d'intensité d'émission de fluorescence de Prx après excitation à 295 nm, en fonction de son état d'oxydation. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil de cinétique rapide Applied Photophysics SX18MV-R (Leatherhead, UK) (stopped-flow). La première seringue contient Srx (2 à 10 μM) dans du tampon TK, la deuxième seringue contient la PrxSO₂ (20 à 40 μM), ATP 2 mM, MgCl₂ 2 mM, dans du tampon TK. La température est maintenue à 30 °C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm. Les traces expérimentales obtenues sont ajustées à une

équation décrivant une phase exponentielle décroissante suivie d'une phase linéaire afin de déterminer les constantes de vitesse correspondantes.

$$y = A e^{-k_{\text{obs}} t} + Bt + C$$

Avec A l'amplitude de la phase exponentielle correspondant à la réaction enzymatique ; B la pente correspondant au bruit de fond non spécifique ($B < 0$), C une constante et k_{obs} la constante de vitesse de la réaction enzymatique.

G.2 Techniques d'étude du mécanisme catalytique

Les procédures expérimentales suivantes sont explicitées en détail dans les trois publications :

- Suivi de la libération d'ADP.
- Suivi de la libération de phosphate.
- Suivi de la formation des intermédiaires thiosulfinate Prx/Srx et scSrx_{ox}.
- Visualisation et identification des intermédiaires de la réaction par électrophorèse SDS-PAGE, Western Blot et spectrométrie de masse.
- Suivi de la formation de complexe Srx-S-S-Trx avec C48A-C106A ou C84A-C106A scSrx.

Matériels et Méthodes

Références
Bibliographiques

An, J. H. et Blackwell, T. K. (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. Genes Dev, 17, 1882-93.

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

Aran, M., Caporaletti, D., Senn, A. M., Tellez de Iñon, M. T., Girotti, M. R., Llera, A. S., et Wolosiuk, R. A. (2008) ATP-dependent modulation and autophosphorylation of rapeseed 2-Cys peroxiredoxin. FEBS J, 275, 1450-1463.

Arent, S., Pye, V. E. et Henriksen, A. (2008) Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. Plant Physiol Biochem, 46, 292-301.

Bae, S. H., Woo, H. A., Sung, S. H., Lee, H. E., Lee, S. K., Kil, I. S. et Rhee, S. G. (2008) Induction of sulfiredoxin via an Nrf2-dependent pathway and hyperoxidation of peroxiredoxin III in the lungs of mice exposed to hyperoxia. Antioxid Redox Signal,

Baker, L. M. et Poole, L. B. (2003) Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. J Biol Chem, 278, 9203-11.

Banik, U., et Roy, S. (1990) A continuous fluorimetric assay for ATPase activity. **Biochem J**, 266, 611-614.

Berlett, B. S. et Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem, 272, 20313-6.

Bienert, G. P., Schjoerring, J. K. et Jahn, T. P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta, 1758, 994-1003.

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

Biteau, B. (2005) La sulfirédoxine, une nouvelle enzyme illustrant les deux facettes biologiques de l'H₂O₂: toxicité et signalisation, Thèse en Biologie de l'Université Paris 11 Orsay, 204 p.

Bondareva, A. A., Capecchi, M. R., Iverson, S. V., Li, Y., Lopez, N. I., Lucas, O., Merrill, G. F., Prigge, J. R., Siders, A. M., Wakamiya, M., Wallin, S. L. et Schmidt, E. E. (2007) Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. Free Radic Biol Med, 43, 911-23.

Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., van Duijn, C. M., Oostra, B., Meco, G. et Heutink, P. (2003) DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. Neurol Sci, 24, 159-60.

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

Bozonet, S. M., Findlay, V. J., Day, A. M., Cameron, J., Veal, E. A. et Morgan, B. A. (2005) Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the

Bibliographie

transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. J Biol Chem, 280, 23319-27.

Budanov, A. V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skaliter, R., Gudkov, A. V., Chumakov, P. M. et Feinstein, E. (2002) Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. Oncogene, 21, 6017-31.

Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V. et Chumakov, P. M. (2004) Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. Science, 304, 596-600.

Cai, H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res, 68, 26-36.

Camier, S., Ma, E., Leroy, C., Pruvost, A., Toledano, M. et Marsolier-Kergoat, M. C. (2007) Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. Free Radic Biol Med, 42, 1008-16.

Candeias, L. P., Patel, K. B., Stratford, M. R. et Wardman, P. (1993) Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. FEBS Lett, 333, 151-3.

Canet-Aviles, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A. et Cookson, M. R. (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 9103-8.

Carr, A. C., Hawkins, C. L., Thomas, S. R., Stocker, R. et Frei, B. (2001) Relative reactivities of N-chloramines and hypochlorous acid with human plasma constituents. Free Radic Biol Med, 30, 526-36.

Chartron, J., Shiau, C., Stout, C. D. et Carroll, K. S. (2007) 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase in complex with thioredoxin: a structural snapshot in the catalytic cycle. Biochemistry, 46, 3942-51.

Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S. et Rhee, S. G. (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. J Biol Chem, 279, 50994-1001.

Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. et Rabilloud, T. (2003) Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. J Biol Chem, 278, 37146-53.

Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. et Ames, B. N. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell, 41, 753-62.

Christman, M. F., Storz, G. et Ames, B. N. (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 3484-8.

Clay, M. D., Jenney, F. E., Jr., Hagedoorn, P. L., George, G. N., Adams, M. W. et Johnson, M. K. (2002) Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase: implications for active-site structures and the catalytic mechanism. J Am Chem Soc, 124, 788-805.

Compan, I. et Touati, D. (1993) Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol, 175, 1687-96.

Copley, S. D., Novak, W. R. et Babbitt, P. C. (2004) Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. Biochemistry, 43, 13981-95.

D'Aquino, M., Dunster, C. et Willson, R. L. (1989) Vitamin A and glutathione-mediated free radical damage: competing reactions with polyunsaturated fatty acids and vitamin C. Biochem Biophys Res Commun, 161, 1199-203.

Daub, E., Zawadzke, L. E., Botstein, D. et Walsh, C. T. (1998) Isolation, cloning, and sequencing of the *Salmonella typhimurium* *ddlA* gene with purification and characterization of its product, D-Alanine:D-Alanine ligase (ADP forming). Biochemistry, 27, 3701-08.

Davies, K. J. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie, 83, 301-10.

Davies, M. J. (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. Photochem Photobiol Sci, 3, 17-25.

Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. et Actis, L. A. (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. Microbiology, 150, 3657-67.

Drabowicz, J., Kielbasinski, P., et Mikolajczyk, M. (1990) Sulphinic acids and esters in synthesis. S. Patai, The chemistry of sulphinic acids, esters and their derivatives, 351-429.

Emerson, J. P., Coulter, E. D., Phillips, R. S. et Kurtz, D. M., Jr. (2003) Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. J Biol Chem, 278, 39662-8.

Engstrom, N. E., Holmgren, A., Larsson, A. et Soderhall, S. (1974) Isolation and characterization of calf liver thioredoxin. J Biol Chem, 249, 205-10.

Favier, A. (2003) Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 11-12, 108-115.

Findlay, V. J., Townsend, D. M., Morris, T. E., Fraser, J. P., He, L. et Tew, K. D. (2006) A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. Cancer Res, 66, 6800-6.

Flohe, L., Gunzler, W. A. et Schock, H. H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett, 32, 132-4.

Bibliographie

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M. et Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature, 422, 442-6.

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A. et Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. J Biol Chem, 271, 9573-8.

Gechev, T. S. et Hille, J. (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. J Cell Biol, 168, 17-20.

Geiszt, M. et Leto, T. L. (2004) The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. J Biol Chem, 279, 51715-8.

Giles, G. I., Tasker, K. M., Collins, C., Giles, N. M., O'Rourke, E. et Jacob, C. (2002) Reactive sulphur species: an in vitro investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides. Biochem J, 364, 579-85.

Gill, S. C. et von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem, 182, 319-26.

Gitlin, G., Tsarbopoulos, A., Patel, S. T., Sydor, W., Pramanik, B. N., Jacobs, S., Westreich, L., Mittelman, S. et Bausch, J. N. (1996) Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. Pharm Res, 13, 762-9.

Gregory, E. M. et Fridovich, I. (1973) Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. J Bacteriol, 114, 1193-7.

Grune, T., Reinheckel, T. et Davies, K. J. (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. Faseb J, 11, 526-34.

Hague, S., Rogaeva, E., Hernandez, D., Gulick, C., Singleton, A., Hanson, M., Johnson, J., Weiser, R., Gallardo, M., Ravina, B., Gwinn-Hardy, K., Crawley, A., St George-Hyslop, P. H., Lang, A. E., Heutink, P., Bonifati, V. et Hardy, J. (2003) Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. Ann Neurol, 54, 271-4.

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

Herrera, K., Cahoon, R. E., Kumaran, S. et Jez, J. (2007) Reaction mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*: site-directed mutagenesis of active site residues. J Biol Chem, 282, 17157-65.

Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. et Stamler, J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat Rev Mol Cell Biol, 6, 150-66.

Ho, Y. S., Dey, M. S. et Crapo, J. D. (1996) Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. Am J Physiol, 270, L810-8.

Hofmann, B., Hecht, H. J. et Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. Biol Chem, 383, 347-64.

Hoier, C. K., Sonnenborg, T. O., Jensen, K. H. et Gudbjerg, J. (2009) Model analysis of mechanisms controlling pneumatic soil vapor extraction. J Contam Hydrol, 103, 82-98.

Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. Annu Rev Biochem, 54, 237-71.

Hudson, A. J., Andrews, S. C., Hawkins, C., Williams, J. M., Izuhara, M., Meldrum, F. C., Mann, S., Harrison, P. M. et Guest, J. R. (1993) Overproduction, purification and characterization of the Escherichia coli ferritin. Eur J Biochem, 218, 985-95.

Inoue, H., Hisamoto, N., An, J. H., Oliveira, R. P., Nishida, E., Blackwell, T. K. et Matsumoto, K. (2005) The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. Genes Dev, 19, 2278-83.

Jackson, C., Dench, J., Moore, A. L., Halliwell, B., Foyer, C. H. et Hall, D. O. (1978) Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. Eur J Biochem, 91, 339-44.

Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast, 14, 1511-27.

Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J. et Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. Cell, 117, 625-35.

Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E. et Dyson, H. J. (1994) High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin. Structure, 2, 853-68.

Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y. et Rhee, S. G. (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. J Biol Chem, 281, 14400-7.

Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C., Poole, L. B. et Lowther, W. T. (2005) Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. Biochemistry, 44, 8634-42.

Jonsson, T. J., Johnson, L. C. et Lowther, W. T. (2008a) Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace. Nature, 451, 98-101.

Jonsson, T. J., Murray, M. S., Johnson, L. C. et Lowther, W. T. (2008b) Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. J Biol Chem, 283, 23846-51.

Jonsson, T. J., Tsang, A. W., Lowther, W. T. et Furdul, C. M. (2008c) Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. J Biol Chem, 283, 22890-4.

Bibliographie

Jovanovic, T., Ascenso, C., Hazlett, K. R., Sikkink, R., Krebs, C., Litwiler, R., Benson, L. M., Moura, I., Moura, J. J., Radolf, J. D., Huynh, B. H., Naylor, S. et Rusnak, F. (2000) Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase. *J Biol Chem*, 275, 28439-48.

Kallis, G. B. et Holmgren, A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 255, 10261-5.

Kang, S. W., Baines, I. C. et Rhee, S. G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem*, 273, 6303-11.

Kanofsky, J. R., Wright, J., Miles-Richardson, G. E. et Tauber, A. I. (1984) Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *J Clin Invest*, 74, 1489-95.

Kato, S., Ueno, T., Fukuzumi, S. et Watanabe, Y. (2004) Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase: mechanistic investigation by kinetic isotope effect. *J Biol Chem*, 279, 52376-81.

Katona, G., Carpentier, P., Niviere, V., Amara, P., Adam, V., Ohana, J., Tsanov, N. et Bourgeois, D. (2007) Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme. *Science*, 316, 449-53.

Kobashi, N., Nishiyama, M. et Tanokura, M. (1999) Kinetic and mutation analyses of aspartate kinase from *Thermus flavus*. *J Biosci Bioeng*, 87, 739-45.

Koh, C. S., Didierjean, C., Navrot, N., Panjkar, S., Mulliert, G., Rouhier, N., Jacquot, J. P., Aubry, A., Shawkataly, O. et Corbier, C. (2007) Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol*, 370, 512-29.

Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. et Nakayama, K. (2000) A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem J*, 351, 107-14.

Koo, K. H., Lee, S., Jeong, S. Y., Kim, E. T., Kim, H. J., Kim, K., Song, K. et Chae, H. Z. (2002) Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch Biochem Biophys*, 397, 312-8.

Krokan, H. E., Standal, R. et Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*, 325 (Pt 1), 1-16.

Kroll, J. S., Langford, P. R., Wilks, K. E. et Keil, A. D. (1995) Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology*, 141 (Pt 9), 2271-9.

Kwon, J., Lee, S. R., Yang, K. S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R. et Rhee, S. G. (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16419-24.

- Lambeth, J. D.** (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol, 4, 181-9.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G. et Ryu, S. E.** (2004) Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. Nat Struct Mol Biol, 11, 1179-85.
- Lee, D. Y., Rhee, S. G., Ferretti, J. et Gruschus, J. M. e. a.** (2005) ¹H, ¹⁵N, and ¹³C chemical shift assignments of the human Sulfiredoxin (hSrx). J Biomol NMR, 32, 339.
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, I. K., Ko, J., Jeong, C. S., Kim, G. H., Park, C., Kang, S. O., Suh, P. G., Lee, H. S. et Cha, S. S.** (2003) Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. J Biol Chem, 278, 44552-9.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. et Rhee, S. G.** (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. J Biol Chem, 273, 15366-72.
- Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W. et Rhee, S. G.** (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. J Biol Chem, 277, 20336-42.
- Lee, W. C., Ohshiro, T., Matsubara, T., Izumi, Y. et Tanokura, M.** (2006) Crystal structure and desulfurization mechanism of 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinic acid desulfinase. J Biol Chem, 281, 32534-9.
- Li, J., Fei, J., Huang, F., Guo, L. H. et Schwarz, W.** (2000) Functional significance of N- and C-terminus of the amino acid transporters EAAC1 and ASCT1: characterization of chimeric transporters. Biochim Biophys Acta, 1467, 338-46.
- Li, Q., Harraz, M. M., Zhou, W., Zhang, L. N., Ding, W., Zhang, Y., Eggleston, T., Yeaman, C., Banfi, B. et Engelhardt, J. F.** (2006) Nox2 and Rac1 regulate H₂O₂-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. Mol Cell Biol, 26, 140-54.
- Li, Y., Hu, Y., Zhang, X., Xu, H., Lescop, E., Xia, B. et Jin, C.** (2007) Conformational fluctuations coupled to the thio-disulfide transfert between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 282, 11078-83.
- Lim, J. C., Choi, H. I., Park, Y. S., Nam, H. W., Woo, H. A., Kwon, K. S., Kim, Y. S., Rhee, S. G., Kim, K. et Chae, H. Z.** (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. J Biol Chem, 283, 28873-80.
- Liochev, S. I. et Fridovich, I.** (1997) A mechanism for complementation of the sodA sodB defect in Escherichia coli by overproduction of the rbo gene product (desulfoferrodoxin) from *Desulfoarculus baarsii*. J Biol Chem, 272, 25573-5.
- Liu, X. P., Liu, X. Y., Zhang, J., Xia, Z. L., Liu, X., Qin, H. J. et Wang, D. W.** (2006) Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. Cell Res, 16, 287-96.

Bibliographie

Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D. et Niviere, V. (2000) Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. J Biol Chem, 275, 115-21.

Mach, H., Middaugh, C. R. et Lewis, R. V. (1992) Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. Anal Biochem, 200, 74-80.

Maeda, K., Hagglund, P., Finnie, C., Svensson, B. et Henriksen, A. (2006) Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. Structure, 14, 1701-10.

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. et Goldstein, B. J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. J Biol Chem, 276, 21938-42.

Maiorino, M., Gregolin, C. et Ursini, F. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol, 186, 448-57.

Marchal, S. et Branlant, G. (1999) Evidence for the Chemical Activation of Essential Cys-302 upon Cofactor Binding to Nonphosphorylating Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Biochemistry, 38, 12950-58.

Martin, M. E., Byers, B. R., Olson, M. O., Salin, M. L., Arceneaux, J. E. et Tolbert, C. (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. J Biol Chem, 261, 9361-7.

Martinez-Ruiz, A. et Lamas, S. (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. Cardiovasc Res, 62, 43-52.

Mathe, C., Mattioli, T. A., Horner, O., Lombard, M., Latour, J. M., Fontecave, M. et Niviere, V. (2002) Identification of iron(III) peroxo species in the active site of the superoxide reductase SOR from *Desulfoarculus baarsii*. J Am Chem Soc, 124, 4966-7.

Mathe, C., Niviere, V. et Mattioli, T. A. (2005) Fe³⁺-hydroxide ligation in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* is associated with pH dependent spectral changes. J Am Chem Soc, 127, 16436-41.

McCord, J. M. et Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J Biol Chem, 244, 6049-55.

Meng, T. C., Fukada, T. et Tonks, N. K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. Mol Cell, 9, 387-99.

Messner, K. R. et Imlay, J. A. (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 274, 10119-28.

Messner, K. R. et Imlay, J. A. (2002) Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. J Biol Chem, 277, 42563-71.

- Mitsumoto, A. et Nakagawa, Y.** (2001) DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. Free Radic Res, 35, 885-93.
- Mitsumoto, A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Takanezawa, Y.** (2001) Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. Free Radic Res, 35, 301-10.
- Moon, J. C., Hah, Y. S., Kim, W. Y., Jung, B. G., Jang, H. H., Lee, J. R., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J. et Lee, S. Y.** (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. J Biol Chem, 280, 28775-84.
- Moore, D. J., Dawson, V. L. et Dawson, T. M.** (2003) Genetics of Parkinson's disease: what do mutations in DJ-1 tell us? Ann Neurol, 54, 281-2.
- Mossner, E., Huber-Wunderlich, M. et Glockshuber, R.** (1998) Characterization of Escherichia coli thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. Protein Sci, 7, 1233-44.
- Mulrooney, S. B. et Williams, C. H., Jr.** (1997) Evidence for two conformational states of thioredoxin reductase from Escherichia coli: use of intrinsic and extrinsic quenchers of flavin fluorescence as probes to observe domain rotation. Protein Sci, 6, 2188-95.
- Nagy, P. et Ashby, M. T.** (2007) Reactive sulfur species: kinetics and mechanism of the hydrolysis of cysteine thiosulfinate ester. Chem Res Toxicol, 20, 1364-72.
- Nagy, P., Lemma, K. et Ashby, M. T.** (2007) Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the reaction of cysteine thiosulfinate ester with cysteine to give cysteine sulfenic acid. J Org Chem, 72, 8838-46.
- Oae, S., Nomura, R., Yoshikawa, Y. et Tagaki W.** (1969) Alkaline hydrolysis of aryl benzenethiolsulfonates. Bull. Chem.Soc.Jpn., 42, 2903-6.
- Oakhill, J. S., Joannou, C. L., Buchanan, S. K., Gorrings, A. R. et Evans, R. W.** (2002) Expression and purification of functional recombinant meningococcal transferrin-binding protein A. Biochem J, 364, 613-6.
- Okuyama, T.** (1990) Mechanism of nucleophilic displacement reactions of sulfinic acid derivatives. S. Patai, The chemistry of sulphinic acids, esters and their derivatives, 625-637.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., et Branlant, G.** (2004) Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from Neisseria meningitidis. Biochemistry, 43, 11616-11622.
- Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A. et Poole, L. B.** (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. Biochemistry, 44, 10583-92.
- Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M. et Hazen, S. L.** (2000) Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. Free Radic Biol Med, 28, 1717-25.

Bibliographie

Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. et Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. J Biol Chem, 272, 15661-7.

Pullar, J. M., Vissers, M. C. et Winterbourn, C. C. (2001) Glutathione oxidation by hypochlorous acid in endothelial cells produces glutathione sulfonamide as a major product but not glutathione disulfide. J Biol Chem, 276, 22120-5.

Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P. et Lunardi, J. (2002) Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. J Biol Chem, 277, 19396-401.

Raha, S., McEachern, G. E., Myint, A. T. et Robinson, B. H. (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. Free Radic Biol Med, 29, 170-80.

Reddie, K. G. et Carroll, K. S. (2008) Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. Curr Opin Chem Biol, 12, 746-54.

Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S. et Woo, H. A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. Curr Opin Cell Biol, 17, 183-9.

Rhee, S. G., Woo, H. A., Bae, S. H. et Park, S. (2008) Sestrin 2 Is Not a Reductase for Cysteine Sulfinic Acid of Peroxiredoxins. Antioxid Redox Signal.

Romao, C. V., Liu, M. Y., Le Gall, J., Gomes, C. M., Braga, V., Pacheco, I., Xavier, A. V. et Teixeira, M. (1999) The superoxide dismutase activity of desulfoferrodoxin from Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774. Eur J Biochem, 261, 438-43.

Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K. et Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. Nature, 423, 769-73.

Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J. et Wartenberg, M. (2000) Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. FEBS Lett, 476, 218-23.

Scandalios, J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz J Med Biol Res, 38, 995-1014.

Schlecker, T., Comini, M. A., Melchers, J., Ruppert, T. et Krauth-Siegel, R. L. (2007) Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of Trypanosoma brucei. Biochem J, 405, 445-54.

Schroder, E., Littlechild, J. A., Lebedev, A. A., Errington, N., Vagin, A. A. et Isupov, M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. Structure, 8, 605-15.

- Seaver, L. C. et Imlay, J. A.** (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 183, 7173-81.
- Seo, J. H., Lim, J.C., Lee, D. Y., Kim, K. S., Piszczek, G., Nam, H. W., Kim, Y. S., Ahn, T., Yun, C. H., Kim, K., Chock, P. B., et Chae, H. Z.** (2009) Novel protective mechanism against irreversible hyperoxidation of Peroxiredoxin: N{alpha}-terminal acylation of human peroxiredoxin II. J Biol Chem, 284, 13455-65.
- Sies, H.** (1999) Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med, 27, 916-21.
- Silva, G., Oliveira, S., Gomes, C. M., Pacheco, I., Liu, M. Y., Xavier, A. V., Teixeira, M., Legall, J. et Rodrigues-pousada, C.** (1999) Desulfovibrio gigas neelaredoxin. A novel superoxide dismutase integrated in a putative oxygen sensory operon of an anaerobe. Eur J Biochem, 259, 235-43.
- Singh, A., Ling, G., Suhasini, A. N., Zhang, P., Yamamoto, M., Navas-Acien, A., Cosgrove, G., Tuder, R. M., Kensler, T. W., Watson, W. H. et Biswal, S.** (2009) Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs. Free Radic Biol Med, 46, 376-86.
- Soriano, F. X., Leveille, F., Papadia, S., Higgins, L. G., Varley, J., Baxter, P., Hayes, J. D. et Hardingham, G. E.** (2008) Induction of sulfiredoxin expression and reduction of peroxiredoxin hyperoxidation by the neuroprotective Nrf2 activator 3H-1,2-dithiole-3-thione. J Neurochem, 107, 533-43.
- Spector, D., Labarre, J. et Toledano M. B.** (2001) A genetic investigation of the essential role of glutathione. J Biol Chem, 276, 7011-16.
- Stone, J. R. et Yang, S.** (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. Antioxid Redox Signal, 8, 243-70.
- Studier, F. W.** (2000) Slab-gel electrophoresis. Trends Biochem Sci, 25, 588-90.
- Studier, F. W.** (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif, 41, 207-34.
- Thomas, E. L., Jefferson, M. M., Learn, D. B., King, C. C. et Dabbous, M. K.** (2000) Myeloperoxidase-catalyzed chlorination of histamine by stimulated neutrophils. Redox Rep, 5, 191-6.
- Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D. et Storz, G.** (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. Cell, 78, 897-909.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L. et Tacnet, F.** (2004) Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. Trends Biochem Sci, 29, 351-7.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayte, J., Toledano, M. B. et Hidalgo, E.** (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 8875-80.

Bibliographie

von Montfort, C., Sharov, V. S., Metzger, S., Schoneich, C., Sies, H. et Klotz, L. O. (2006) Singlet oxygen inactivates protein tyrosine phosphatase-1B by oxidation of the active site cysteine. *Biol Chem*, 387, 1399-404.

Wagner, E., Luche, S., Penna, L., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. et Rabilloud, T. (2002) A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem J*, 366, 777-85.

Wei, Q., Jiang, H., Matthews, C. P. et Colburn, N. H. (2008) Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19738-43.

Weisiger, R. A. et Fridovich, I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 248, 4793-6.

Wilmot, C. M. (2007) Biochemistry. An ancient and intimate partnership. *Science*, 316, 379-80.

Wong, C. M., Siu, K. L. et Jin, D. Y. (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem*, 279, 23207-13.

Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K. et Rhee, S. G. (2003a) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*, 300, 653-6.

Woo, H. A., Kang, S. W., Kim, H. K., Yang, K. S., Chae, H. Z. et Rhee, S. G. (2003b) Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem*, 278, 47361-4.

Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T. S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S. et Rhee, S. G. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem*, 280, 3125-8.

Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R. et Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*, 41, 5493-504.

Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., et Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.*, 28, 32-40.

Wu, C. H., Tsai-Wu, J. J., Huang, Y. T., Lin, C. Y., Liou, G. G. et Lee, F. J. (1998) Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett*, 439, 192-6.

Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., Hwang, S. C., Chae, H. Z., Kim, K. et Rhee, S. G. e. a. (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem*, 277, 38029-36.

Yeh, A. P., Hu, Y., Jenney, F. E., Jr., Adams, M. W. et Rees, D. C. (2000) Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry*, 39, 2499-508.

Youn, H. D., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, Y. C. et Kang, S. O. (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. Biochem J, 318 (Pt 3), 889-96.

Gamocky, M., Furtmuller, P. G. et Obinger, C. (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. Antioxid Redox Signal, 10, 1527-48.

Zhou, W., Zhu, M., Wilson, M. A., Petsko, G. A. et Fink, A. L. (2006) The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. J Mol Biol, 356, 1036-48.

Les peroxyrédoxines à deux cystéines typiques (2-Cys Prx) sont impliquées dans la résistance des cellules au stress oxydant associé à H_2O_2 , en réduisant H_2O_2 en H_2O . En parallèle, ces enzymes participent à la transduction du signal dépendant de H_2O_2 en tant que second messager, *via* leur état rédox. La suroxydation sous forme d'acide sulfinique des 2-Cys Prx typiques eucaryotes est une modification posttraductionnelle qui inactive l'activité peroxydase, permettant de réguler le passage du message cellulaire H_2O_2 -dépendant. La réduction de cette espèce oxydée est essentielle pour la viabilité des cellules. Cette réaction est catalysée par les sulfirédoxines (Srx).

Les études réalisées ont permis de caractériser le mécanisme catalytique de Srx de *S. cerevisiae* qui consiste en : 1) l'activation de la fonction acide sulfinique sous forme d'anhydride phosphoryl sulfinique, par transfert direct du phosphate γ de l'ATP ; 2) la réduction de la fonction acide sulfinique activée par attaque de la Cys catalytique de Srx, ce qui conduit à un intermédiaire covalent thiosulfinate Prx/Srx ; 3) le recyclage de Srx avec la libération de PrxSOH. Au niveau du recyclage de l'activité Srx, deux classes de Srx peuvent être définies, celle à deux Cys et celle à une Cys. La classe de Srx à deux Cys, composée jusqu'à présent de Srx de levures, possède une Cys de recyclage qui attaque le thiosulfinate au niveau de la Cys de Srx, libérant la PrxSOH et la Srx oxydée sous forme de pont disulfure intramoléculaire. Cette forme oxydée de Srx est ensuite reconnue et réduite par la thiorédoxine. La classe de Srx à une Cys dont font partie les Srx de mammifères, ne possédant pas de Cys de recyclage, passe par un mécanisme de recyclage impliquant un réducteur autre que la Trx, qui réduit directement la fonction thiosulfinate, et dont la nature reste à déterminer.

Typical two-cysteine peroxiredoxins are involved in cell resistance against H_2O_2 -induced oxidative stress, by reducing H_2O_2 in H_2O . Furthermore, these enzymes take part in H_2O_2 signalling, which is transmitted and regulated by their redox state. The eukaryotic typical 2-Cys Prxs are subject to post-translational oxidation under sulfinic acid state, which inactivates their peroxidase activity and thus regulates the H_2O_2 -dependent cellular message. Reduction of the sulfinic acid oxidation is essential for the cell viability. Sulfiredoxin (Srx) catalyzes this reduction.

The presents studies demonstrated that the catalytic mechanism of Srx occurs in three steps: first, the sulfinic acid is activated as a sulfinyl phosphoryl anhydride intermediate by a direct transfer of the γ -phosphate of ATP; second, the activated sulfinic acid intermediate is reduced *via* attack of the catalytic Cys of Srx, which leads to formation of a thiosulfinate intermediate and; third Srx, is recycled with concomitant release of PrxSOH. Two classes of Srx could be defined depending on the mechanism of Srx recycling. The class comprising yeast Srxs have one recycling Cys. This Cys attacks the thiosulfinate intermediate, resulting in PrxSOH release and formation of an oxidized Srx intermediate. This oxidized species, with an intramolecular disulfide bond, is recognized and reduced by thioredoxin. In the class comprising Srx devoid of recycling Cys, which includes the mammalian Srxs, Srx is recycled by a reducer distinct from thioredoxin, which reduces directly the thiosulfinate function.

Mots-clés : sulfirédoxine, peroxyrédoxine, thiorédoxine, acide sulfinique, thiosulfinate, régulation redox.