



Modification de macromolécules par insertion radicalaire. Etude de la méthylthiotransférase RimO et de la 4-demethylwyosine synthase TYW1 appartenant toutes deux à la superfamille Radical SAM.

Thibaut Molle

► **To cite this version:**

Thibaut Molle. Modification de macromolécules par insertion radicalaire. Etude de la méthylthiotransférase RimO et de la 4-demethylwyosine synthase TYW1 appartenant toutes deux à la superfamille Radical SAM.. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2014. Français. <NNT : 2014GRENV061>. <tel-01242551>

HAL Id: tel-01242551

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01242551>

Submitted on 13 Dec 2015

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie et Science du Vivant / Chimie Inorganique
et Bio-Inorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Thibaut MOLLE

Thèse dirigée par **Mohamed ATTA**

Codirigée par **Etienne Mulliez et Marc Fontecave**

Préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des
Métaux (CEA de Grenoble)**

Dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences**

**Modification de macromolécules par insertion
radicalaire. Etude de la méthylthiotransférase
RimO et de la 4 -demethylwyosine synthase
TYW1 appartenant toutes deux à la superfamille
Radical SAM.**

Thèse soutenue publiquement le **12 Décembre 2014**

Devant le jury composé de :

M. Bruno GUIGLIARELLI

Professeur à l'Université Aix-Marseille rôle, Rapporteur

M. Olivier BERTEAU

Chercheur à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Rapporteur

M. Olivier PLOUX

Professeur à l'ENSCP, Examineur

M. Fabrice THOMAS

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Examineur

M. Mohamed ATTA

Ingénieur-Chercheur au CEA de Grenoble, Directeur

M. Etienne MULLIEZ

Chercheur au CEA de Grenoble, Co-directeur



SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	- 5 -
INTRODUCTION GENERALE.....	- 7 -
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 9 -
I – Activation des liaisons C-H en Biologie.....	- 9 -
I-1) Oxydation par insertion d'oxygène.....	- 9 -
I-1-a. Flavines et flavoprotéines.....	- 9 -
I-1-b. Métalloprotéines hémiques.....	- 11 -
I-1-c. Métalloprotéines non-hémiques.....	- 13 -
I-2) Les Cobalamines.....	- 14 -
I-2-a. Le cofacteur adénosylcobalamine.....	- 14 -
I-2-b. Mécanisme radicalaire des enzymes adénosylcobalamines.....	- 15 -
I-2-c. Exemples de protéines à cofacteur cobalamine.....	- 15 -
I-3) Activation radicalaire par enzymes Fer-Soufres.....	- 18 -
I-3-a. les enzymes [4Fe-4S] ATP-dépendantes.....	- 18 -
I-3-b. Les enzymes Radical SAM.....	- 19 -
I-3-b-1. La S-Adénosyle-méthionine (SAM).....	- 19 -
I-3-b-2. Le centre [4Fe-4S] radical-SAM.....	- 20 -
I-3-b-3. Mécanisme de réductolyse de la SAM.....	- 21 -
II – Les centres Fe-S.....	- 22 -
II-1) Biogénèse et fonctions des centres Fe-S.....	- 22 -
II-1-a. Biosynthèse des centres Fe-S.....	- 23 -
II-1-b. Fonctions des centres Fe-S.....	- 23 -
II-2) Diversité et structures des centres Fe-S.....	- 24 -
II-2-a. Centre [2Fe-2S].....	- 24 -
II-2-b. Centre [4Fe-4S].....	- 25 -
II-2-c. Autres types de centre Fe-S.....	- 26 -
II-3) Spectroscopie des centres [4Fe-4S].....	- 27 -
II-3-a. La spectrophotométrie UV-visible des centres [4Fe-4S].....	- 27 -
II-3-b. La spectroscopie RPE des centres [4Fe-4S].....	- 27 -
II-3-c. La spectroscopie Mössbauer des centres [4Fe-4S].....	- 28 -
II-3-d. Les centres [4Fe-4S] différenciés.....	- 28 -
III – Les enzymes d'insertion radicalaire.....	- 32 -
III-1) Insertion de sulfure : BioB et LipA.....	- 32 -
III-2) Insertion de méthylsulfure : RimO et MiaB.....	- 34 -
III-3) Insertion de composé à deux carbonés : TYW1.....	- 38 -
IV – Problématique de la thèse : double utilisation de la SAM.....	- 39 -
V – Présentation des chapitres de la thèse.....	- 43 -
V-1) Chapitre I : Caractérisation biochimique et spectroscopique de RimO.....	- 44 -
V-2) Chapitre II : Etude biochimique et spectroscopique du site actif de RimO.....	- 44 -
V-3) Chapitre III : Etude de RimO en présence de SAM.....	- 44 -
V-4) Chapitre IV : Formation de complexe enzyme-substrat pour la cristallogénèse.....	- 45 -
V-5) Chapitre V : Etude du mécanisme enzymatique de la réaction catalysée par TYW1.....	- 45 -
MATERIELS & METHODES.....	- 47 -
I – Matériel biologique.....	- 47 -
I-1) Souches bactériennes.....	- 47 -
I-1-a. <i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene®).....	- 47 -

I-1-b. <i>E. coli</i> DH5 α	- 47 -
I-1-c. <i>E. coli</i> BL21(DE3).	- 47 -
I-1-d. <i>E. coli</i> BL21(DE3)-RIL (Codonplus®).	- 47 -
I-1-e. <i>E. coli</i> MiaB- (TX3346).	- 48 -
I-2) Plasmides de surexpression.	- 48 -
I-2-a. RimO-Tm-p7-7.	- 48 -
I-2-b. MiaB-Tm-pT7-7.	- 48 -
I-2-c. TYW1-PAB2039-pT7-7.....	- 48 -
I-2-d. T7RNAP-6H-pET-3a.	- 48 -
I-2-e. TEV-pMal.....	- 49 -
I-2-f. ARNt-Phe-pUC18.	- 49 -
I-2-g. ARNt-Phe-pTRC99Phe.....	- 49 -
I-2-h. AspB-6H-pBAD.	- 49 -
I-3) Milieux de cultures.	- 49 -
II – Biologie moléculaire.	- 50 -
II-1) Préparation des bactéries compétentes.	- 50 -
II-2) Transformation des bactéries.	- 50 -
II-3) Production et purification de plasmide.	- 50 -
II-4) Mutagenèse dirigée.....	- 51 -
III) Techniques biochimiques.	- 53 -
III-1) Surproduction des protéines et ARNt.....	- 53 -
III-1-a. Surexpression des protéines thermophiles.	- 53 -
III-1-b. Surexpression des ARNt-Phe et ARNt-Ser.	- 54 -
III-1-c. S12 : le substrat de l'enzyme RimO.	- 54 -
III-2) Purification des protéines.....	- 55 -
III-2-a. Préparation des extraits solubles de protéines.....	- 55 -
III-2-b. Purification sur colonne hydrophobe Butyl-Sépharose.....	- 55 -
III-2-c. Préparation des apoprotéines.	- 55 -
III-2-d. Purification sur colonne d'exclusion Superdex® 75.....	- 56 -
III-2-e. Purification sur colonne d'affinité Ni-NTA.....	- 56 -
III-2-f. Purification sur colonne d'affinité Héparine.	- 56 -
III-3) Purification des ARN de transferts.....	- 57 -
III-3-a. Extraction des ARNt.....	- 57 -
III-3-b. Purification sur colonne d'affinité Nucleobond®.....	- 57 -
III-3-c. Purification sur colonne d'hydroxyapatite-céramique.	- 58 -
III-4) Reconstitution des centres [4Fe-4S] de protéines thermophiles.	- 58 -
III-4-a. Réaction de reconstitution en conditions anaérobies.....	- 58 -
III-4-b. Purification des protéines reconstituées.	- 59 -
III-4-c. Réduction chimique des protéines reconstituées.....	- 60 -
III-5) Dosages biochimiques.	- 60 -
III-5-a. Dosage de protéines.....	- 60 -
III-5-b. Dosage de Fer	- 60 -
III-5-c. Dosage du Soufre.	- 61 -
III-6) Transcription <i>in vitro</i>	- 61 -
III-6-a. Préparation de l'ADN matrice.	- 61 -
III-6-b. Réaction de transcription <i>in vitro</i>	- 62 -
III-6-c. Purification des transcrits.....	- 62 -
III-7) Tests d'activités enzymatiques.....	- 63 -
III-7-a. Tests d'activités avec RimO, MiaB et TYW1.	- 63 -
III-7-b. Tests d'activité avec MiaA et TRM5.	- 64 -
III-7-c. Digestion des ARNt.....	- 65 -
III-7-d. Formation de complexe enzyme/substrat/co-substrat.	- 65 -
IV – Techniques analytiques.....	- 66 -
IV-1) Chromatographie liquide haute performance (HPLC).	- 66 -
IV-1-a. Analyse HPLC du peptide-S12.	- 66 -
IV-1-b. Analyses HPLC des ARNt.	- 67 -
IV-1-c. Analyses HPLC des sous-produits de réaction.	- 68 -

IV-2) Spectrométrie de masse.....	- 69 -
IV-2-a. Analyses du peptide mimétique S12.....	- 69 -
IV-2-b. Analyses des nucléotides.....	- 69 -
V – Techniques spectroscopiques.....	- 70 -
V-1) La spectroscopie UV-visible.....	- 70 -
V-2) La spectroscopie RPE en onde continue (CW).....	- 70 -
V-3) La spectroscopie RPE en onde pulsée HYSCORE.....	- 72 -
V-2) La spectroscopie Mössbauer.....	- 73 -
VI – Synthèses bio-organiques et organiques.....	- 75 -
VI-1) Biosynthèse et purification de la SAM.....	- 75 -
VI-2) Synthèse et purification d’aspartates deutérés R et S en position β	- 76 -
VI-3) Synthèse de mime peptidique à partir des aspartates deutérés.....	- 77 -
VII – Electrochimie des protéines.....	- 79 -
RESULTATS & DISCUSSIONS.....	- 81 -
CHAPITRE I.....	- 81 -
CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET SPECTROSCOPIQUE DE RIMO.....	- 81 -
I-1) L’enzyme RimO sauvage de <i>T. maritima</i>	- 81 -
I-1-a. Caractéristiques biochimiques.....	- 81 -
I-1-b. Caractérisation de RimO par spectroscopie Mössbauer.....	- 85 -
I-1-c. Caractérisation de RimO par spectroscopie RPE CW et RPE-HYSCORE.....	- 89 -
I-2) Questions et hypothèses de travail.....	- 92 -
I-3) Etude du triple mutant RimO-S (contenant le seul centre S).....	- 92 -
I-3-a. Etude Biochimique du mutant RimO-S.....	- 93 -
I-3-c. Spectroscopie Mössbauer.....	- 94 -
I-3-d. Spectroscopie RPE et RPE-HYSCORE.....	- 96 -
I-4) Etude du triple mutant RimO-RS.....	- 97 -
I-4-a. Présentation de RimO-RS.....	- 97 -
I-4-b. Etude biochimique du mutant RimO-RS.....	- 98 -
I-4-c. Spectroscopie Mössbauer.....	- 99 -
I-4-d. Spectroscopie RPE CW et HYSCORE.....	- 101 -
I-5) Discussion.....	- 102 -
CHAPITRE II.....	- 105 -
ETUDE SPECTROSCOPIQUE ET ROLES DES RESIDUS DU SITE ACTIF DE RIMO.....	- 105 -
II-1) Hypothèse de travail.....	- 105 -
II-2) Analyse structurale et conservation des résidus du site actif.....	- 105 -
II-3) Choix des résidus mutés.....	- 108 -
II-4) Le mutant RimO K161A.....	- 108 -
II-4-a. Production du mutant.....	- 108 -
II-4-b. Etude biochimique du mutant RimO K161A.....	- 109 -
II-4-c. Analyse par spectroscopie Mössbauer.....	- 110 -
II-4-d. Analyse par spectroscopies RPE CW et RPE-HYSCORE.....	- 112 -
II-4-e. Résumé des résultats obtenus avec RimO K161A.....	- 114 -
II-5) Le mutant RimO R268A.....	- 114 -
II-5-a. Production du mutant.....	- 114 -
II-5-b. Etude biochimique du mutant RimO R268A.....	- 114 -
II-5-c. Analyse par spectroscopie Mössbauer.....	- 116 -
II-5-d. Analyse par spectroscopies RPE CW et RPE HYSCORE.....	- 118 -
II-5-e. Résumé des résultats obtenus avec RimO R268A.....	- 119 -
II-6) Discussion.....	- 120 -

CHAPITRE III.....	- 123 -
ETUDE SPECTROSCOPIQUE DE L'ENZYME RIMO EN PRESENCE DE SAM.	- 123 -
III-1) Etude par spectroscopie UV-visible de RimO sauvage.....	123 -
III-2) Etude RPE CW et RPE HYSCORE en présence de SAM.	124 -
III-2-a. L'enzyme RimO sauvage.....	124 -
III-2-b. L'enzyme RimO-S.....	126 -
III-2-c. L'enzyme RimO-RS.....	127 -
III-2-d. L'enzyme RimO K161A.....	129 -
III-2-e. L'enzyme RimO R268A.....	132 -
III-3) Etude Mössbauer en présence de SAM.....	133 -
III-3-a. L'enzyme RimO sauvage à l'état oxydé.....	133 -
III-3-b. L'enzyme RimO sauvage à l'état réduit.....	135 -
III-3-c. L'enzyme RimO R268A.....	136 -
III-4) Etude électrochimique.....	137 -
III-4-a. L'enzyme RimO sauvage.....	138 -
III-4-b. L'enzyme RimO-S.....	139 -
III-4-c. L'enzyme RimO-RS.....	139 -
III-4-d. Résumé des résultats obtenus en électrochimie.....	140 -
III-5) Analyse de l'enzyme RimO marquée à l'azote ¹⁵ N.....	141 -
III-6) Discussion.....	146 -
III-7) Mécanisme proposé de l'enzyme RimO.....	151 -
CHAPITRE IV.....	- 155 -
FORMATION DES COMPLEXES RIMO-S12D89 ET MIAB-I6A37ARNt POUR LES ETUDES DE CRISTALLOGENESE.	- 155 -
IV-1) Complexe RimO-S12D89-SAM.....	155 -
IV-1-a. Préparation de l'enzyme.....	155 -
IV-1-b. Préparation du substrat S12D89-MBP.....	155 -
IV-1-c. Production et purification du complexe.....	156 -
IV-1-d. Résumé et discussion des résultats pour le complexe RimO/S12D89/SAM.....	162 -
IV-2) Complexe MiaB/i ⁶ A ₃₇ ARNt/SAM.....	163 -
IV-2-a. Préparation de l'enzyme.....	163 -
IV-2-b. Préparation du substrat par transcription <i>In Vitro</i>	164 -
IV-2-c. Production et purification du complexe.....	164 -
IV-1-d. Résumé et discussion des résultats pour le complexe MiaB/i ⁶ A ₃₇ ARNt/SAM.....	165 -
CHAPITRE V.....	- 167 -
ETUDE DU MECANISME ENZYMATIQUE DE LA REACTION CATALYSEE PAR TYW1.....	- 167 -
V-1) Rappel des données avant l'étude.....	167 -
V-2) Mécanismes proposés.....	168 -
V-3) Etude de TYW1 de <i>Pyrococcus abyssi</i>	171 -
V-3-a. Préparation de l'ARNt substrat par transcription <i>in vitro</i>	171 -
V-3-b. Etude mécanistique par marquage isotopique.....	171 -
V-3-c. Etude du rôle de la lysine 41.....	177 -
V-4) Discussion.....	177 -
CONCLUSION GENERALE.....	- 179 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 183 -

ABREVIATIONS

UV	Ultra-Violet
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>Tm</i>	Thermotoga maritima
wt	Wild type
LB	Luria Bertani
MM	Masse moléculaire
SAM	S-adénosyl-méthionine
AdoH	5'-desoxy-adénosine
SAH	S-adénosyl-homocystéine
NTP	ribonucléotides triphosphate
pI	Point isoélectrique
rpm	Rotation par minute
dNTP	Désoxynucléotide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
Plasmide RIL	Plasmide Arginine Isoleucine Leucine
PMSF	PhenylMethaneSulfonylFluoride
MBP	Maltose Binding Protein
TEV	Tobacco Etch Virus
CsdA	Cystéine désulfurase A
U	Unité d'activité enzymatique
MT	Méthyltransférase
MTT	Méthylthiotransférase
δ	Déplacement isomérique
ΔEQ	Eclatement quadripolaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
FTR	Ferrédoxine-Thiorédoxine Réductase
PFL-AE	Activase de la Pyruvate-Formate Lyase
MS	Mass spectroscopy (spectroscopie de masse)
LC	Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide)
ESI	ElectroSpray Ionisation
Å	Angström
ppm	Partie par million
ε	Coefficient d'extinction molaire
DO	Densité optique
AE	Activating Enzyme (Enzyme activatrice)
RimO	Ribosomale modification O
ms-D89-S12	Méthylthio aspartate 89 de la protéine ribosomale S12

MiaB	Méthylthio isopentyl adenosine B
ARNt-A37	Adénosine 37 des acides ribonucléiques de transfert
i6 A-37	N6-isopentyl adénosine 37
ms2i6A-37	2-méthylthio-N6-isopentenyladenosine 37
ms2t6A-37	2-méthylthio-N6-thréonylcarbamoyladénosine 37
SAM	S-adénosylméthionine
Ado°	Radical 5'-désoxyadénosyle
ORF	Open reading frame (cadre de lecture)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PLP	Phosphate de pyridoxal
S	Etat de spin
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
CW	Onde continue
HYSCORE	2D hyperfine sub-level correlation
ENH	Electrode normale à hydrogène
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
DTT	Dithiothréitol
HPLC	High pressure liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside
SDS	dodécyl sulfate de sodium
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis
TFA	Acide trifluoroacétique
Tris	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
TEA	Triéthanolamine
DMPD	N,N-diméthyl-p-phénylènediamine monochlorohydrate
Fmoc	Fluorenylméthoxy-carbonyl
DIEA	Diisopropylethylamine
DMF	Diméthylformamide
tBu	terbutyl
w/w	Pourcentage en poids
TIM	Triose phosphate isomérase
SWV	Square Wave voltametry
CV	Cyclic Voltametry

INTRODUCTION GENERALE

La traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines est un des processus biologiques les plus finement contrôlé. Parmi les moyens mis en œuvre par la cellule pour réaliser ce contrôle, on peut citer la modification post-transcriptionnelle et post-traductionnelle des macromolécules participant à ce processus. Ces modifications chimiques concernent à la fois les ARNm, ARN ribosomiaux (ARNr), les protéines du complexe ribosomal et les ARN de transfert (ARNt). Le processus de traduction comporte trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison qui se déroulent au sein du ribosome. L'ARNm, issu de la transcription de l'ADN génomique, est reconnu et traduit en acide aminé par section de trois bases (triplet appelé codon). Lors de la traduction, chaque acide aminé est chargé par un ARNt spécifique que le codon de l'ARNm reconnaît grâce à sa partie anticodon complémentaire.

Les mécanismes et les éléments nécessaires à la traduction étant très complexes, ce processus est très coûteux en énergie pour la cellule. Dans le but de rentabiliser au maximum l'énergie investie, de très nombreux contrôles ont été mis en place au cours de l'Evolution. Un premier élément particulièrement sensible est l'assemblage du complexe ribosomal qui, s'il est mal contrôlé, peut aboutir à la formation d'un ribosome non fonctionnel qui doit être éliminé. Un deuxième élément se situe au niveau de l'appariement entre le codon de l'ARNm et l'anti-codon de l'ARNt qui doit être optimal pour éviter des éventuels décalages de cadre de lecture et par conséquent la formation de protéines mal traduites et donc non fonctionnelles. Pour minimiser les erreurs lors de la traduction, des systèmes enzymatiques complexes de modification des macromolécules ont été mis en place.

Dans le ribosome d'*E. coli*, ce sont une douzaine de protéines qui portent des modifications post-traductionnelles. En ce qui concerne les ARNt chez la bactérie, plus d'une centaine de nucléosides modifiés ont déjà été répertoriés. Il a été estimé que 1% du génome bactérien est dévolu aux enzymes impliquées dans ces modifications, ce qui représente 4 fois l'information génétique nécessaire pour synthétiser les ARNts. Cependant, le rôle exact de tous ces nucléosides modifiés reste, pour la plupart, inconnu et seulement une petite partie des mécanismes enzymatiques impliqués dans leurs biosynthèses a été décrite.

Ces mécanismes de biosynthèse peuvent être classés en deux catégories. La première implique des enzymes qui utilisent la chimie ionique et la seconde celles opérant via la chimie radicalaire. Les enzymes réalisant des modifications radicalaires sont utilisées dans la cellule pour activer et fonctionnaliser des molécules au niveau de liaisons peu réactives comme des liaisons C-H. Les mécanismes mis en jeu dans ce type de réaction peuvent être particulièrement complexes et donc difficile à élucider. Cependant leur compréhension représente un enjeu important notamment au niveau des biotechnologies ou de la santé puisque certaines modifications ont été reliées au déclenchement de pathologies graves comme le diabète de type II ou le cancer.

Dans ce rapport de thèse, les études portent principalement sur deux systèmes. Le premier est la méthylthiotransférase (MTTase) RimO, avec pour objectif la compréhension détaillée du mécanisme d'insertion radicalaire du groupement thiométhyle dans la protéine ribosomale S12. Le second système concerne la 4-déméthylwyosine synthase, TYW1, qui participe à la voie de biosynthèse de la wybutosine, une base hypermodifiée présente dans les ARNt^{Phe} des eucaryotes et des archées. Une troisième protéine a également été étudiée, mais seulement sur le plan structural, il s'agit de la méthylthiotransférase MiaB. Cette enzyme réalise la même réaction que RimO mais son substrat n'est pas une protéine mais une adénine modifiée présente dans certains ARNt bactériens.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'étonnante diversité de fonction des macromolécules biologiques peut être corrélée au très grand nombre de combinaisons qui peuvent être obtenues à partir des vingt-deux acides aminés et/ou des quatre bases nucléiques qui les constituent. En fait, l'optimisation toujours plus fine de mécanismes biologiques a suscité l'émergence évolutive de stratégies visant à complexifier les macromolécules après leur assemblage, leur conférant des propriétés hors d'atteinte autrement. Par définition, les briques élémentaires constituant ces assemblages ne sont pas facilement modifiables et l'introduction de groupements (hétéroatomes ou fragments moléculaires) fait souvent intervenir une chimie difficile. De ce point de vue, un des problèmes le plus fréquemment rencontré en Biologie est la fonctionnalisation de liaisons C-H non acides. Ce type de réaction repose largement sur l'utilisation de la chimie radicalaire. La source primordiale de ces radicaux peut être soit l'oxygène par ses dérivés réduits (superoxyde, peroxyde ou radical hydroxyle) soit les métaux de transition biologiques (Fe, Cu, Mn, Co...) associés à divers cofacteurs. Dans cette introduction, nous nous proposons de répertorier les principaux modes d'activation radicalaire de liaisons C-H peu réactives.

I – Activation des liaisons C-H en Biologie.

I-1) Oxydation par insertion d'oxygène.

Les enzymes catalysant des réactions d'oxydation par activation de liaison C-H peuvent être classées en trois groupes : les enzymes sans cofacteur métallique, les métalloenzymes héminiques et les métalloenzymes non-héminiques (Lewis et al. 2011). Ces trois types de protéines sont présents en particulier chez les organismes aérobies car elles utilisent généralement le dioxygène comme accepteur d'électrons pour fonctionner.

I-1-a. Flavines et flavoprotéines.

Les flavoprotéines sont des enzymes capables de catalyser des réactions d'oxygénation et qui ne contiennent pas d'atome métallique participant à la catalyse (Barquera et al. 2002). Ces enzymes possèdent un cofacteur organique, une flavine, qui peut exister sous trois états

redox différents. On connaît trois types de flavine : la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la riboflavine (figure I-1-a-1).

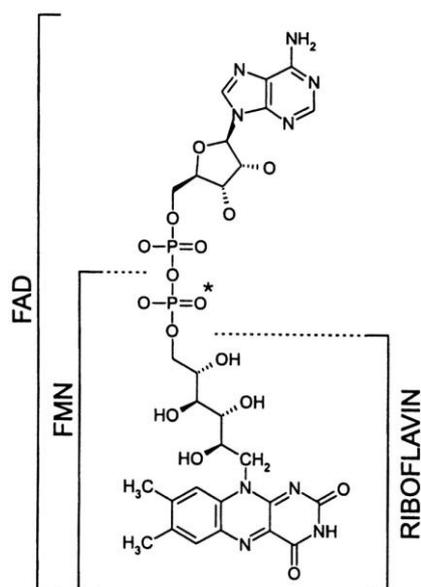


Figure I-1-a-1 : Structures chimiques des cofacteurs flavines FMN, FAD et riboflavine (Barquera et al. 2002).

La réactivité de ces composés provient de leur partie hétérocyclique isoalloxazine expliquant le fait que ces trois systèmes emploient le même mécanisme réactionnel. (Massey et al. 2000 ; Van Berkel et al. 2006 ; Lewis et al. 2011) (Figure I-1-a-2).

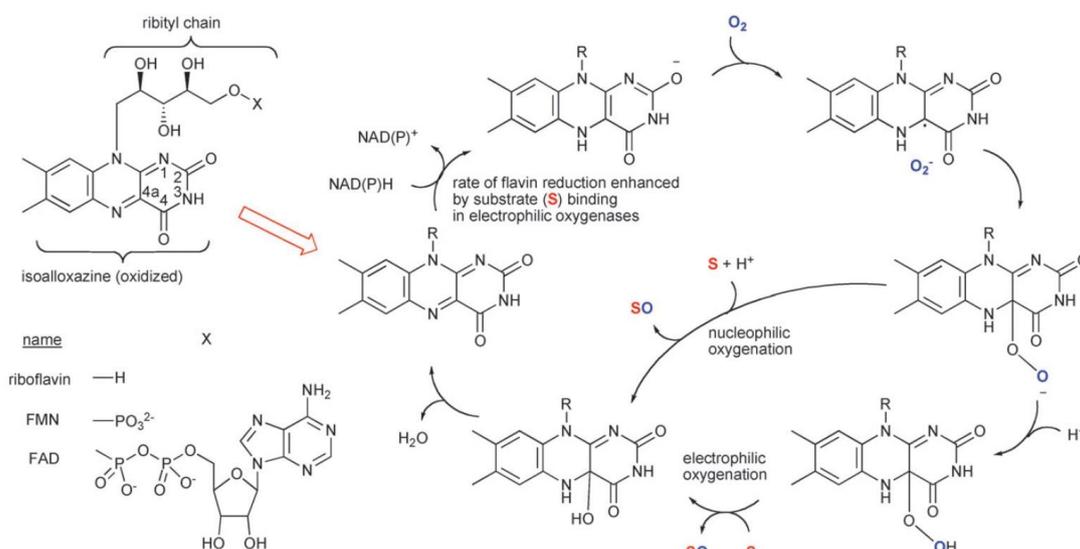


Figure I-1-a-2 : Mécanisme d'oxygénation nucléophile et électrophile catalysé par l'action des cofacteurs flavines (Lewis et al. 2011).

Dans le mécanisme présenté ci-dessus, l'étape clé est l'état réduit qui, en présence de dioxygène, conduit à un intermédiaire peroxy pouvant alors transférer un atome d'oxygène au substrat.

Il existe de nombreux exemples décrits dans la littérature, un des plus connus est celui de la luciférase (Campbell et al. 2009 + Sucharitakul et al. 2014) (Figure I-1-a-3).

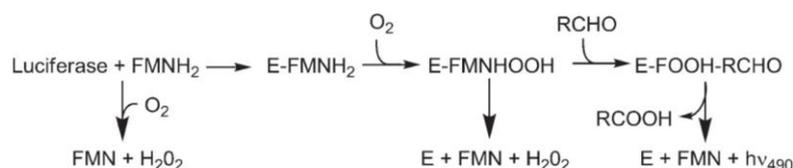


Figure I-1-a-3 : Réaction d'oxygénation catalysée par la luciférase (Campbell et al. 2009). E : enzyme.

La luciférase est une enzyme bactérienne qui catalyse l'oxygénation d'une longue chaîne aliphatique au niveau d'une fonction aldéhyde pour former un acide carboxylique. Cette enzyme est notamment connue pour la luminescence associée à son activité.

I-1-b. Métalloprotéines héminiques.

L'hème est un groupement prosthétique présent dans un grand nombre d'enzymes et qui leur confère une grande variété de réactivité (Sono et al. 1996). Il est constitué d'un noyau porphyrinique diversement substitué, coordiné à un atome de Fer au centre de la structure. (Figure I-1-b-1).

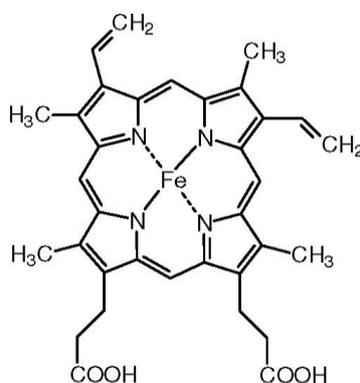


Figure I-1-b-1 : Structure chimique d'un cofacteur Hème-Fe.

Cet édifice plan permet de doter l'atome de Fer de nouvelles propriétés, notamment la capacité d'atteindre des hauts degrés d'oxydation, Fe^{IV} et/ou Fe^{V} (Meunier et al. 2004). L'hème fixe le Fe^{III} par l'intermédiaire de 4 azotes, la fixation à la protéine se fait par un résidu jouant le rôle de cinquième ligand du Fer et la sixième position de coordination est classiquement occupée par une molécule d'eau facilement échangeable.

Dans la littérature, les exemples les mieux décrits concernent les cytochromes P450 qui sont capables de réaliser une multitude de réaction d'oxydation de liaisons C-H (Figure I-1-b-2).

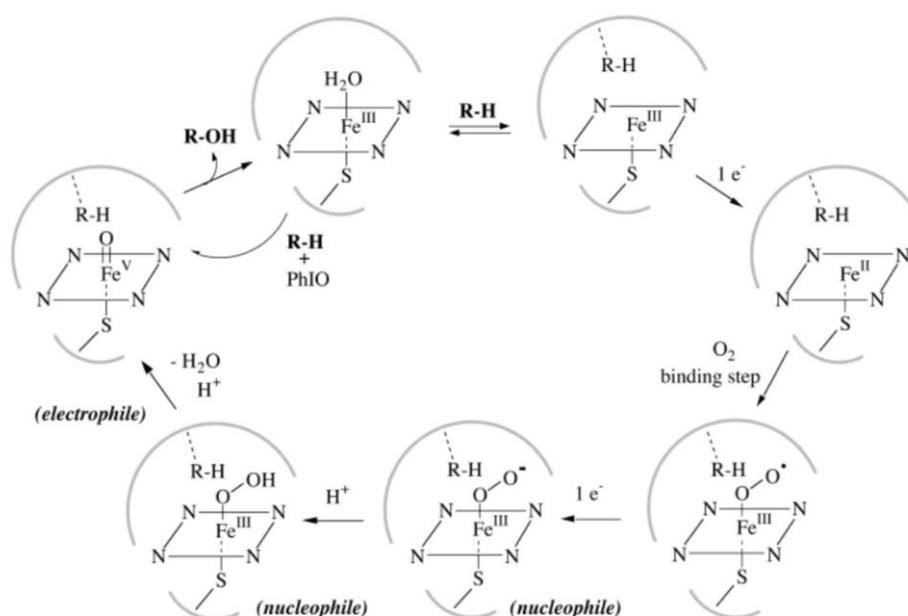


Figure I-1-b-2 : Mécanisme d'oxygénation de liaison C-H catalysée par les cytochromes P450 (Meunier et al. 2004).

Les cytochromes P450 sont capables d'activer une molécule de dioxygène pour former une espèce intermédiaire très oxydante $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$. Cette espèce oxyde des liaisons C-H peu réactives et réalise des oxygénations par un mécanisme dit « oxygen rebound ». Le mécanisme est le suivant : l'enzyme à l'état Fe^{III} est réduite en Fe^{II} . Sous cet état elle peut alors fixer et réduire une molécule de dioxygène pour générer un intermédiaire superoxyde. Ce dernier est réduit à un électron pour former l'espèce peroxy puis hydroperoxy après protonation. En présence d'un électron l'oxygène distal est éliminé sous la forme d'une molécule d'eau donnant naissance à l'intermédiaire Fe^{V} -oxo mentionné plus haut. En présence du substrat, cet intermédiaire est capable d'arracher un atome d'hydrogène et le

radical substrat obtenu « rebondit » sur le $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$ formé pour donner le produit hydroxylé et l'enzyme à l'état Fe^{III} .

I-1-c. Métalloprotéines non-héminiques.

Les métalloprotéines non héminiques capables d'activer des liaisons C-H pour réaliser des oxydations utilisent généralement le Fer ou le cuivre pour réaliser ce type de réactions (Lipscomb et al. 1996 ; Que et al. 2004). Dans le cas des métalloprotéines à Fer, on distingue deux sous-groupes : les enzymes avec un seul Fer (mononucléaire de Fer) et les enzymes contenant deux atomes de Fer (binucléaire de Fer).

L'un des exemples les plus étudiés de métalloprotéines à Fer non-héminique est celui de la méthane monooxygénase (MMO) (Figure I-1-c).

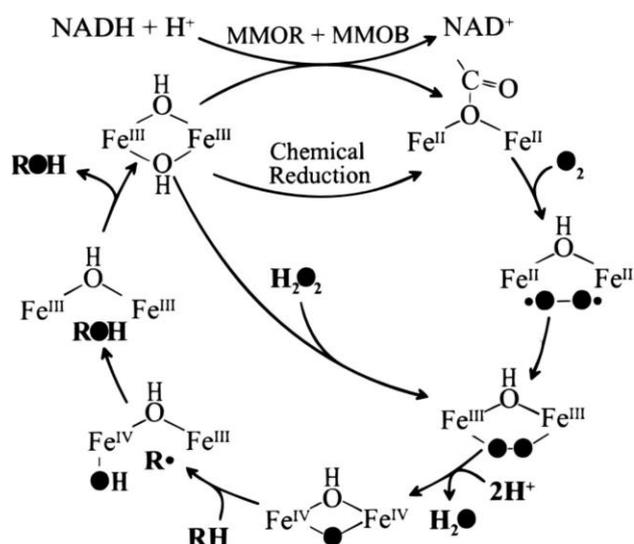


Figure I-1-c : Mécanisme d'oxygénation catalysée par l'enzyme MMO (Lipscomb et al. 1996).

Cette enzyme possède un site actif composé de deux fers non-héminiques à ponts μ -hydroxo capables d'activer le dioxygène pour réaliser l'oxygénation du méthane (ou d'alcane). Le mécanisme fait intervenir des intermédiaires Fe-oxo à hauts degrés d'oxydation similaires à ceux impliqués dans les hémoprotéines et capables d'activer le substrat sous forme radicalaire. L'étape clé est, ici aussi, la réduction du centre binucléaire bi ferrique en centre bi ferreux. Ce dernier réagit avec le dioxygène pour conduire à un intermédiaire bi ferrique à pont μ -peroxy. Un des deux oxygènes du peroxy est réduit à deux électrons par les deux Fer puis éliminé sous la forme d'une molécule d'eau. L'apport de deux électrons

(fournis par le binucléaire) et de deux protons conduit à l'élimination d'une molécule d'eau et à un binucléaire de Fe^{IV} lié par deux ponts, un μ -hydroxo et un μ -oxo. Ce binucléaire de Fe^{IV} est proposé catalyser l'oxydation de la liaison C-H du substrat qui peut ensuite être oxygéné. Ce type de système peut également utiliser le peroxyde d'hydrogène pour produire directement l'intermédiaire avec deux Fe^{III} et le pont μ -peroxo (peroxide shunt). Ce mécanisme de la MMO est valable pour l'oxygénation du méthane mais également pour l'oxygénation d'alcane plus longs.

I-2) Les Cobalamines.

Pour catalyser des réactions nécessitant une activation radicalaire d'une liaison C-H, un grand nombre de systèmes connus sont les enzymes utilisant l'adénosylcobalamine appelé également coenzyme B12 (Halpem et al. 1985). L'avantage principal de ce type d'enzymes est le fonctionnement sans utilisation de dioxygène, ce qui leur permet d'être actives en conditions anaérobies.

I-2-a. Le cofacteur adénosylcobalamine.

L'adénosylcobalamine est un cofacteur organométallique utilisé par plusieurs enzymes pour activer par chimie radicalaire des substrats peu réactifs (Frey et al. 2006 ; Marsh et al. 2010 ; Broderick et al. 2014) (Figure I-2-a).

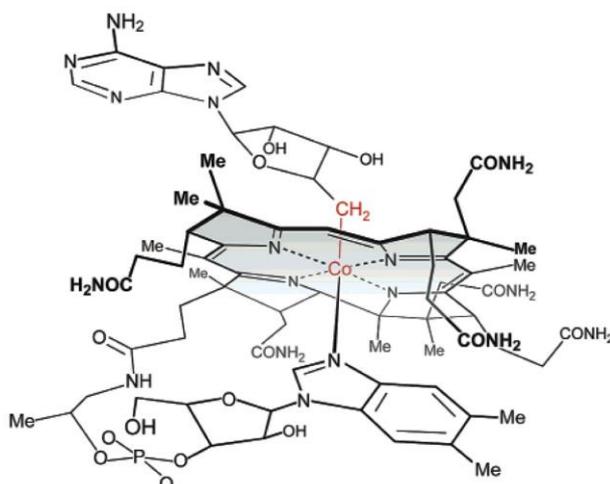


Figure I-2-a : Structure chimique de l'adénosylcobalamine (Frey et al. 2006).

Il est composé d'une partie de type corrine ressemblant à une porphyrine non conjuguée, coordonnée dans le plan équatorial à un Co^{III} . Le cobalt est également coordonné de façon apicale par un ligand de type benzimidazole et par le carbone 5' d'un groupement 5'-désoxyadénosyle résultant en une liaison organométallique.

I-2-b. Mécanisme radicalaire des enzymes adénosylcobalamines.

Le mécanisme d'activation radicalaire de liaisons C-H est commun à toutes les enzymes dépendantes de l'adénosylcobalamine (Reed et al. 2004) (Figure I-2-b).

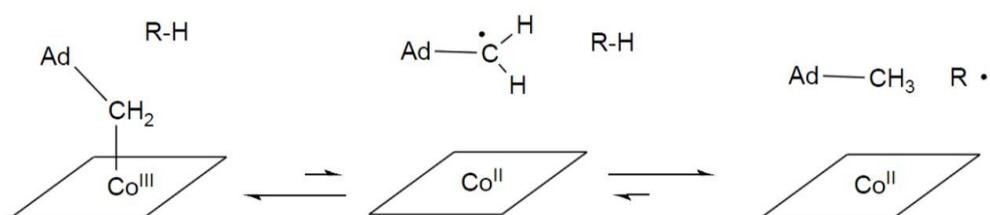


Figure I-2-b : Mécanisme d'action radicalaire de liaison C-H par le cofacteur adénosylcobalamine (Reed et al. 2004).

L'adénosylcobalamine est en équilibre avec deux espèces issues de la coupure homolytique de la liaison Co-C. Le radical 5'-désoxyadénosyle est une espèce extrêmement réactive capable de réaliser un arrachement d'un atome d'hydrogène d'une liaison C-H pour activer un substrat sous forme radicalaire. L'impossibilité de piéger ce radical a parfois été présentée comme l'indice d'un mécanisme dans lequel la cassure homolytique de la liaison C-Co est concertée avec celle de la liaison C-H (Booker et al. 2009).

I-2-c. Exemples de protéines à cofacteur cobalamine.

Les enzymes dépendantes de l'adénosylcobalamine sont impliquées dans un grand nombre de réactions. Il existe deux grandes classes d'enzymes utilisant ce cofacteur. La première, de loin la plus nombreuse, regroupe les enzymes de type isomérases qui réalisent des transferts intramoléculaires de groupements chimiques. Le mécanisme radicalaire impliqué est toujours le même entre les différentes isomérases décrites (Frey et al. 1967 ; Banerjee et al. 2003) (Figure III-2-c-1).

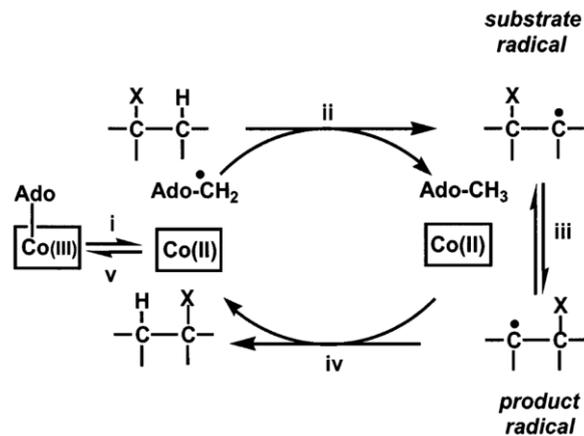


Figure I-2-c-1 : Mécanisme de transfert de groupement chimique par activation et réarrangement radicalaire impliqué dans les mécanismes enzymatiques catalysés par les isomérases (Banerjee et al. 2003).

Les isomérases participent à une grande variété de voies métaboliques et de très nombreux exemples sont décrits dans la littérature (Leutbecher et al. 1992 ; Ratnatilleke et al. 1999 ; Zelder et al. 1994 ; Haller et al. 2000 ; Banerjee et al. 2003) (Figure I-2-c-2).

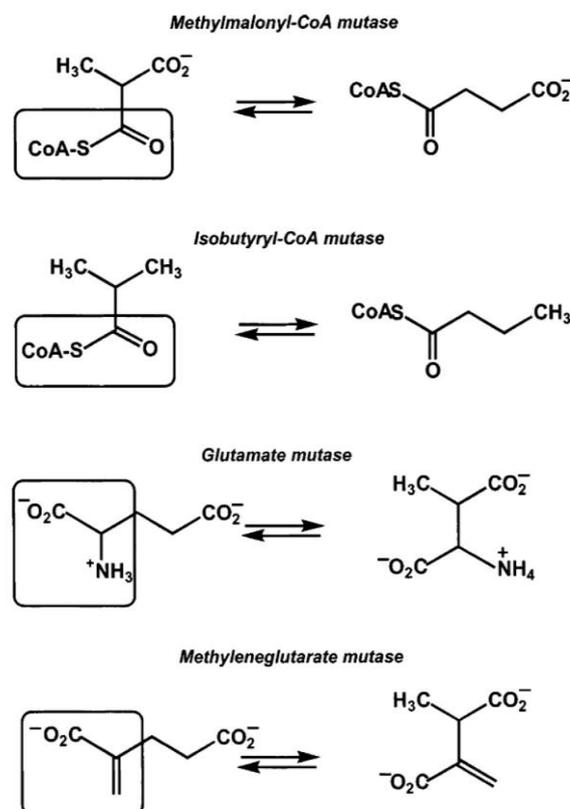


Figure I-2-c-2 : Exemples d'isomérases utilisant le cofacteur adénosylcobalamine (Banerjee et al. 2003).

Les quatre exemples présentés ci-dessus montrent que les isomérases catalysent la migration de groupements chimiques très différents tels que thioester, aminocarboxylate ou encore propénoïque.

La seconde classe de réaction utilisant l'adénosyl-cobalamine peut être vue formellement comme une réaction de réduction. Ce type de réaction a été établi avec les ribonucléotides réductases de classe II (RNRs) ainsi qu'avec certaines deshydratases. Les RNR catalysent la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides (Licht et al. 1999 ; Banerjee et al. 2003) (Figure I-2-c-3).

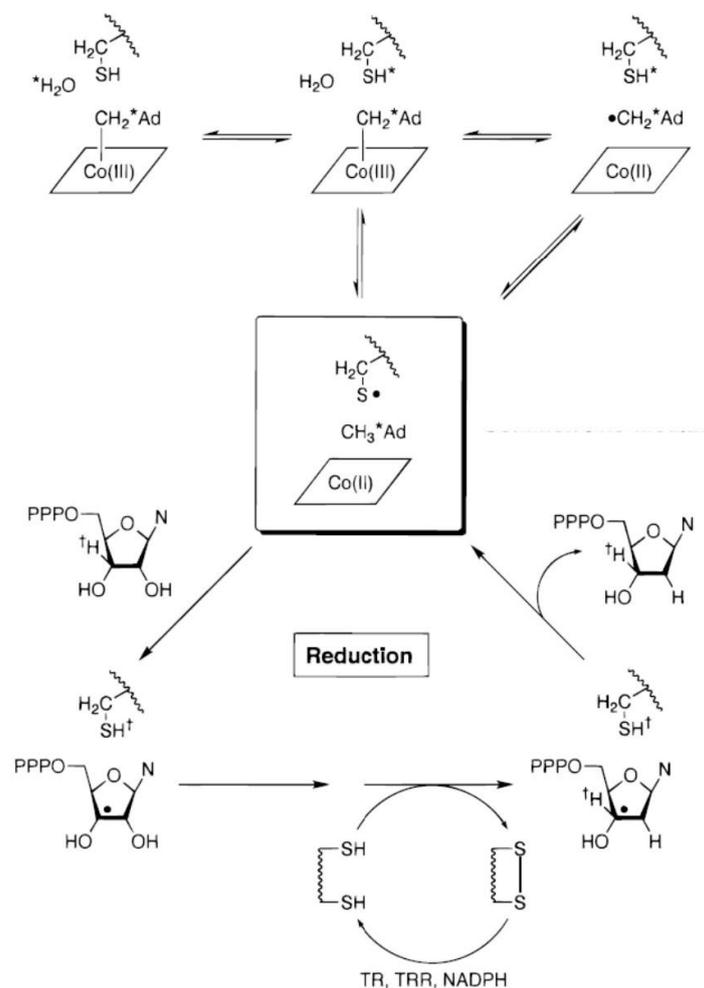


Figure I-2-c-3 : Mécanisme de réduction des ribonucléotides catalysé par les RNRs B12-dépendantes (Licht et al. 1999).

Dans le mécanisme présenté ci-dessus, le radical 5'-désoxyadénosyle oxyde le ribonucléotide par arrachement d'un hydrogène en position 3' du ribose. Après protonation le groupement hydroxyle en 2' est éliminé sous forme d'eau provoquant le transfert du radical

du C3' en C2' et la formation d'un intermédiaire ceto en 3'. La réduction de cet intermédiaire par deux cystéines du site actif conduit à la formation d'un radical en C3'. Ce radical est réduit par la 5'-desoxyadénosine formée dans la première étape régénérant le cofacteur Cbl et libérant le désoxyribonucléotide, produit de la réaction.

I-3) Activation radicalaire par enzymes Fer-Soufres.

Les centres Fer-Soufres (Fe-S) sont également connus pour être des acteurs majeurs de la chimie d'activation radicalaire. Leur rôle d'activateur peut se faire de deux façons différentes, soit par réduction et formation de radical anion, soit par oxydation (arrachement d'hydrogène) formant une espèce radicalaire neutre.

I-3-a. les enzymes [4Fe-4S] ATP-dépendantes.

Dans certains cas, les réactions de transfert d'un électron sont très difficiles à réaliser et les potentiels redox à atteindre doivent être particulièrement bas. Le seul potentiel réducteur d'un centre [4Fe-4S] ne suffisant plus, le transfert d'électron est couplé à l'hydrolyse d'ATP pour apporter l'énergie nécessaire (Buckel et al. 2014). Les deux exemples les plus connus parmi ce type d'enzymes sont la Benzoyl-CoA reductase (BCR) et les (R)-2-hydroxyacyl-CoA déshydratases (HAD) (Figure I-3-a).

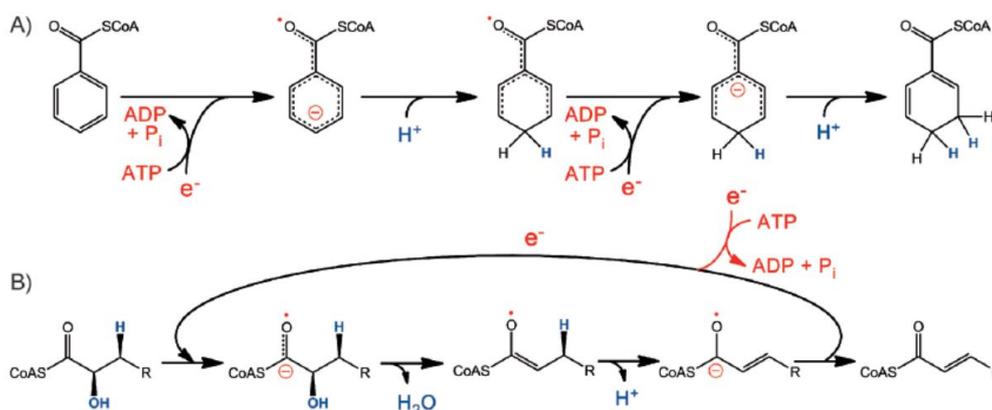


Figure I-3-a : Réactions catalysées par les enzymes BCR (A) et HAD (B) (Buckel et al. 2014).

Ces deux enzymes fonctionnent suivant un mécanisme similaire, la première étape consiste à former un radical anion par transfert d'un électron depuis le centre [4Fe-4S] vers le

substrat. Cette réaction est couplée à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Après une étape de protonation, une seconde étape de réduction est réalisée avec l'hydrolyse d'une deuxième molécule d'ATP suivie d'une dernière protonation pour obtenir le produit final.

I-3-b. Les enzymes Radical SAM.

I-3-b-1. La S-Adénosyle-méthionine (SAM).

La S-adénosyle-méthionine, plus communément appelée SAM, est un acteur central de la cellule (Figure I-3-b-1-1).

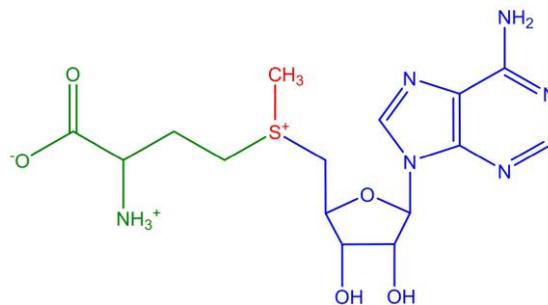


Figure I-3-b-1-1 : Structure chimique de la S-adénosyle-méthionine (SAM). Représenté en bleu : la partie adénine, en rouge : la partie méthylsulfonium et en vert : la partie méthionine.

Cette molécule est composée de trois parties : une partie adénosine, une partie ribose et une partie méthionine, qui possèdent toutes une ou plusieurs fonctions.

La SAM participe à une très grande variété de réactions dans la cellule, c'est notamment le principal donneur de méthyle. Chacune des trois parties qui la composent peut être utilisée pour former un grand nombre de produits différents (Fontecave et al. 2004) (Figure I-3-b-1-2).

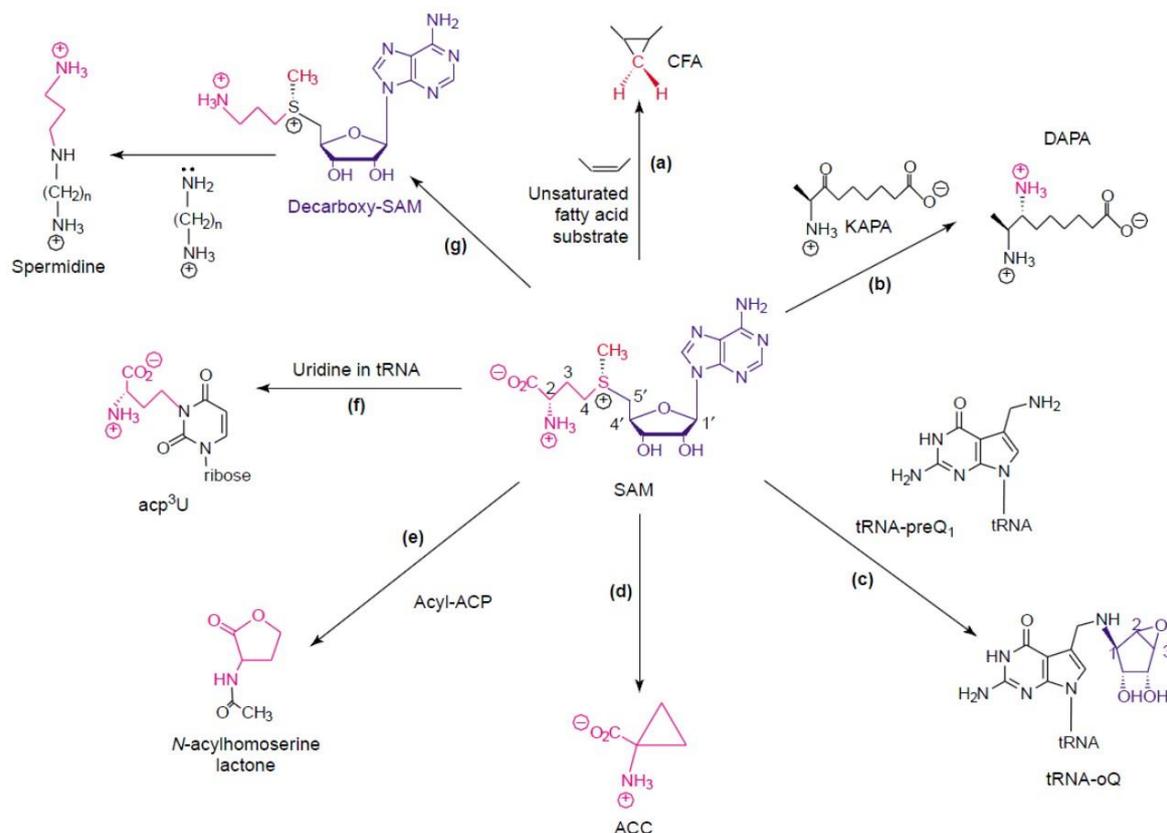


Figure I-3-b-1-2 : Exemples d'utilisation des composants de la SAM (Fontecave et al. 2004). Les enzymes correspondantes sont : (a) cyclopropane fatty acid (CFA) synthase ; (b) 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) synthase ; (c) SAM-tRNA ribosyltransferase-isomerase (QueA) ; (d) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase ; (e) Acylhomoserine lactone synthase ; acyl carrier protein (ACP); (f) 3-(3-amino-3-carboxypropyl)-uridine (Acp3U)synthase ; (g) SAM decarboxylase et spermidine synthase.

Le groupement méthyle est notamment utilisé pour la formation de cyclopropane (a), le ribose pour la modification oQ de certains ARNt (c) et la partie méthionine est utilisée plus ou moins partiellement dans diverses biosynthèses (b, d, e, f et g).

I-3-b-2. Le centre [4Fe-4S] radical-SAM.

Les centres [4Fe-4S] dits « Radical-SAM » (RS) sont fixés à la protéine par un motif de cystéines très caractéristique CX₃CX₂C (mises à part de très rares exceptions) (Sofia et al. 2001 ; Fontecave et al. 2004 ; Krebs et al. 2002 ; Shisler et al. 2012). Ce cluster n'étant coordonné que par 3 cystéines, il possède une position de coordination libre qui a pour fonction de fixer la SAM par le groupement aminocarboxylate de sa partie méthionine (Figure I-3-b-2).

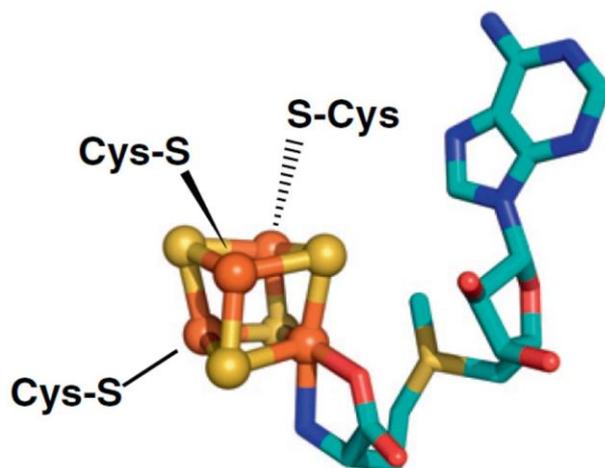


Figure I-3-b-2 : Représentation structurale d'un centre Radical-SAM coordonnant une molécule de SAM (Shisler et al. 2012).

La SAM coordine le centre [4Fe-4S] Radical-SAM par l'amine et le carboxyle de sa partie méthionine au niveau du Fer libre. Ce mode de coordination conduit à un intermédiaire pentacoordiné qui présente en spectroscopie Mössbauer une signature spécifique.

I-3-b-3. Mécanisme de réductolyse de la SAM.

En présence d'une source d'électrons, le centre RS catalyse la réductolyse de la SAM : l'injection d'un électron dans la liaison $\text{AdoCH}_2\text{-S}^+$ provoque la rupture homolytique de celle-ci et conduit à la formation d'un radical adénosyle et d'une molécule de méthionine. (Walsby et al. 2005 ; Fontecave et al. 2004) (Figure I-3-b-3).

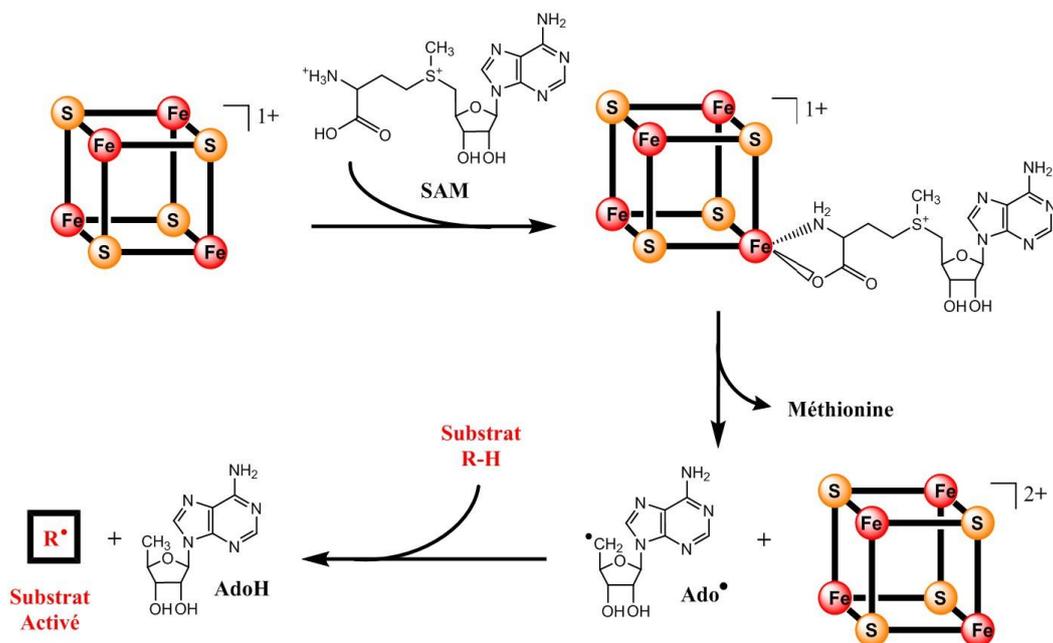


Figure I-3-b-3 : Mécanisme de réductolyse de la S-adényl-méthionine (SAM) et activation radicalaire du substrat.

Comme dans le cas des cobalamines, le radical 5'-désoxyadényloyle peut alors arracher un hydrogène sur une liaison peu réactive de type C-H et former ainsi un radical substrat très réactif et donc facile à fonctionnaliser (Layer et al. 2004).

II – Les centres Fe-S.

Il apparait donc que les centres Fe-S jouent un rôle clé dans l'activation radicalaire de molécules peu réactives. Dans ce paragraphe nous nous proposons de répertorier les principales caractéristiques physiques, biologiques et spectroscopiques de ces agrégats.

II-1) Biogénèse et fonctions des centres Fe-S.

La formation des centres Fe-S dans la cellule ne se produit pas spontanément mais nécessite un mécanisme de biosynthèse complexe auquel participent plusieurs protéines d'échafaudage, de maturation et de transfert (Rouault et al. 2005). L'intégration d'un ou plusieurs centres Fe-S dans une apoprotéine lui confère en général de nouvelles propriétés.

II-1-a. Biosynthèse des centres Fe-S.

Actuellement on connaît trois systèmes participant à la production et la maturation des centres Fe-S : ISC, SUF et NIF, ce dernier spécifique à la maturation de la Nitrogénase (Roche et al. 2013). Ces trois systèmes font chacun intervenir une cystéine désulfurase pour fournir le Soufre et plusieurs protéines d'assemblage qui contrôlent la formation et la maturation des clusters mais également le transfert vers la protéine d'intérêt (Figure II-1-a).

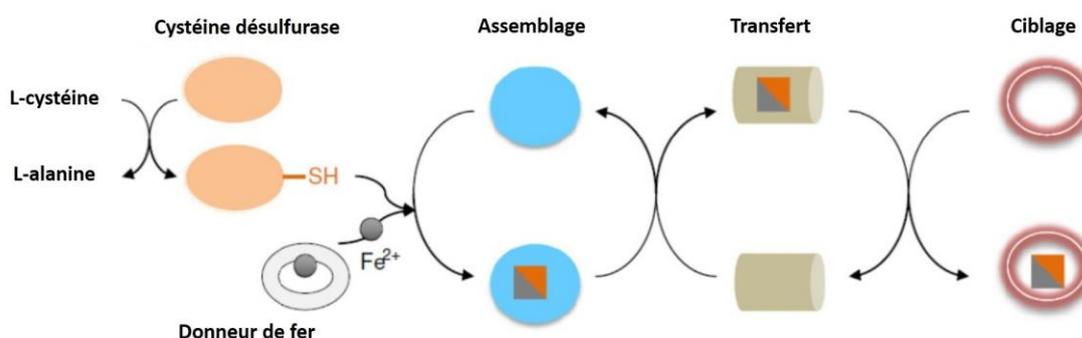


Figure II-1-a : Mécanisme global de biosynthèse des centres Fer Soufre (Roche et al. 2013).

Le système principal d'assemblage est la machinerie ISC (Iron-Sulfur Cluster), il est actif en conditions physiologiques normales (Lill et al. 2009). Chez les procaryotes le complexe multi-protéique ISC est composé de plusieurs protéines dont le rôle de certaines n'est pas encore clairement identifié. Un deuxième système de biosynthèse est la machinerie SUF (SulfUR) qui est complémentaire du premier car exprimé en conditions de stress oxydant ou lorsque la cellule est carencée en Fer (Ollagnier-de-Choudens et al. 2003). Ce système SUF, comme ISC, est également composé de plusieurs protéines dont le rôle de certaines reste encore à déterminer (Roche et al. 2013). Le système NIF (NItrogen Fixation) est la troisième machinerie d'assemblage des centres Fe-S. Il est spécifiquement dédié à l'enzyme nitrogénase et n'est présent que chez les organismes capables de fixer le diazote (Bandyopadhyay et al. 2008).

II-1-b. Fonctions des centres Fe-S.

Les centres Fe-S sont des cofacteurs ubiquitaires et omniprésents dans le monde vivant. Ils sont nécessaires au maintien des processus fondamentaux de la vie grâce à leur capacité à transférer des électrons, à activer des liaisons chimiques peu réactives, à stocker du Fer et du Soufre et à réguler l'expression génique (Johnson et al. 2005).

La fonction la plus commune des centres Fe-S est le transfert d'électrons qui est basée sur la capacité du Fer à atteindre facilement les états d'oxydation +2 et +3. Dans un environnement protéique, les centres Fe-S ont des potentiels redox qui varient entre -500 mV et +300 mV (Beinert et al. 1997). Cette fonction « électron transférase » est notamment utilisée dans les complexes respiratoires I et III mitochondriaux et bactériens, dans le photosystème I ainsi que dans les hydrogénases. Les centres Fe-S peuvent également jouer le rôle d'acide de Lewis dans certaines enzymes, comme par exemple l'aconitase dans laquelle le centre Fe-S est nécessaire pour catalyser la transformation du substrat citrate en produit isocitrate. Les centres Fe-S peuvent aussi avoir un rôle structural ou encore celui de senseur de l'environnement intracellulaire permettant d'ajuster l'expression génique en fonction des conditions physiologiques (Lill et al. 2009). Enfin, comme indiqué précédemment, les centres Fe-S sont capables de catalyse redox.

II-2) Diversité et structures des centres Fe-S.

Les centres Fer-soufres sont communément liés aux protéines par les groupements thiols (SH) des cystéines et plus rarement par des histidines. Ils en existent différents types qui se différencient par le nombre d'atomes qui les composent et par leur structure.

II-2-a. Centre [2Fe-2S].

Les centres [2Fe-2S] sont généralement coordonnés par 4 cystéines, soit deux par atome de Fer et les deux atomes de Fer sont liés par deux atomes de Soufre pontants. Chaque Fer se trouve donc dans un environnement tétraédrique (Fontecave et al. 2006) (Figure II-2-a).

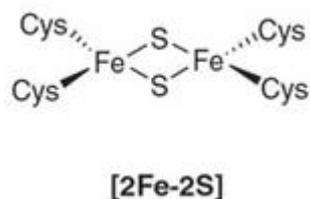


Figure II-2-a : Structure chimique d'un centre [2Fe-2S] (Fontecave et al. 2006).

In vivo, Ce type de centre peut atteindre deux états d'oxydation, un état oxydé [2Fe-2S]²⁺ et un état réduit [2Fe-2S]⁺. Les atomes de Soufre créent un environnement de ligand à

champ faible et par conséquent les atomes de Fer ont une structure électronique de type haut spin ($S = 5/2$). A l'état oxydé, ces derniers sont sous la forme Fe^{III} et sont couplés de façon antiferromagnétique ce qui confère au cluster un spin nul $S = 0$. A l'état réduit, le cluster contient un Fe^{II} ($S = 2$) et un Fe^{III} ($S = 5/2$). Dans la majorité écrasante des cas, le Fe^{II} et le Fe^{III} sont couplés de façon antiferromagnétique conduisant à un spin total $S = 1/2$ actif en RPE. On connaît un seul cas où les deux Fer sont couplés de façon ferromagnétique conduisant à un spin $S = 9/2$ (Johnson et al. 2005).

II-2-b. Centre [4Fe-4S].

Les centres [4Fe-4S] sont classiquement coordonnés par 3 ou 4 cystéines avec une cystéine par atome de Fer. Chaque Fer est dans un environnement tétraédrique et relié aux autres par l'intermédiaire d'un atome de Soufre pontant résultant en une structure cubique (Fontecave et al. 2006). Les centres [4Fe-4S] sont thermodynamiquement favorisés comme le montre leur prévalence en conditions d'auto-assemblage *in vitro* (Ayala-Castro et al. 2008) (Figure II-2-b).

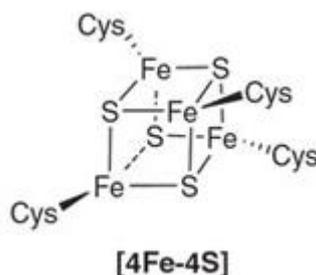


Figure II-2-b : Structure chimique d'un centre [4Fe-4S] (Fontecave et al. 2006).

En fonction de l'environnement protéique, les centres [4Fe-4S] peuvent atteindre 4 degrés d'oxydation allant de 0 à +3. Les deux états redox les plus couramment observés sont $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ et $[\text{4Fe-4S}]^+$ et sont appelés respectivement état oxydé et état réduit. A l'état oxydé $2+$, le centre Fe-S est composé formellement de deux Fe^{II} et deux Fe^{III} arrangés en paires mixtes. Dans ces dernières la valence peut être soit localisée $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ soit moyennée avec deux atomes $\text{Fe}^{2.5+}$, la valence mixte étant de loin majoritaire dans les exemples connus. Les fers d'un centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ sont en configuration haut spin et couplés de manière antiferromagnétique ce qui donne un spin total $S = 0$. A l'état réduit $1+$ une des deux paires de Fers se trouve sous la forme $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ tandis que l'autre se comporte comme dans l'état oxydé. Un centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ peut adopter deux états de spin différents en fonction des couplages entre

les atomes de Fer, $S = 1/2$ et $S = 3/2$ (Johnson et al. 2005). Selon leur fonction, certains centres [4Fe-4S] présentent une position de coordination libre sur un des fers et ne sont donc liés à la protéine que par 3 cystéines. Chez *E. coli* ce type de centre représente environ 90% de tous les centres Fe-S présents, reflétant sans doute leur plus grande variété de fonctions (Fontecave et al. 2006).

II-2-c. Autres types de centre Fe-S.

A côté des centres classiques [2Fe-2S] et [4Fe-4S], il en existe d'autres, plus rares comme les centres [3Fe-4S] qui ressemblent structurellement à un centre [4Fe-4S] avec un atome de Fer en moins (Fontecave et al. 2006 ; Johnson et al. 2005). Ce type de centre a été retrouvé dans la nitrate réductase A chez *E. coli* dans laquelle il sert à transférer des électrons lors de la réaction de réduction du nitrate jusqu'à l'ammoniac qui peut être utilisé par différentes voies de biosynthèses (Fedor et al. 2014).

Il existe également des centres Fe-S beaucoup plus complexes comme le centre FeMoco pour « Fer Molybdène cofactor » présent dans la nitrogénase. Ce centre est composé de 8 atomes de Fer, 9 atomes de Soufre, un atome de molybdène et un atome de carbone au centre de l'édifice (Macleon et al. 2013 ; Hu et al. 2014). Il est lié à la protéine par l'intermédiaire d'une cystéine et d'une histidine. Cet agrégat Fe-S est particulièrement complexe et nécessite sa propre machinerie d'assemblage NIF. Le centre FeMoco est capable de réaliser des transferts de deux électrons simultanément, ce qui est nécessaire pour réduire le diazote et le rendre assimilable par les organismes vivants.

Un autre exemple est celui des hydrogénases. On connaît deux types d'hydrogénase qui se distinguent par la structure de leurs centres Fe-S. L'hydrogénase Fe-Fe contient un binucléaire de Fer dont l'un des fers est coordonné à un centre [4Fe-4S] par l'intermédiaire du Soufre d'une cystéine et par un ligand CO et un ligand CN. Le deuxième Fer contient également ces deux ligands et les deux Fers sont reliés par un ligand pontant dithio-1,1'-méthylamine (Shepard et al. 2014). L'hydrogénase Nickel-Fer contient un binucléaire Fer-Nickel à ponts μ -S provenant de deux résidus cystéines avec deux ligands CO et un ligand CN sur le Fer et deux ligands cystéine sur le Nickel (Stripp et al. 2013).

Le centre Fe-S de l'enzyme CO déshydrogénase est un autre exemple de centre présentant une structure particulière. Cette enzyme, capable de catalyser la conversion réversible du CO₂ en CO, contient plusieurs centres [4Fe-4S] ainsi qu'un centre mixte appelé « cluster C » composé de 4 atomes de Soufre, 4 ou 5 atomes de Fer et 1 atome de Nickel (Can et al. 2014).

II-3) Spectroscopie des centres [4Fe-4S].

Les centres Fe-S et en particulier les centres [4Fe-4S] présentent des caractéristiques spectroscopiques bien définies et bien connues. Les méthodes d'analyses utilisées sont, entre autres, la spectrophotométrie UV-visible, la résonance paramagnétique électronique (RPE) en onde continue (CW) ou en onde pulsée (HYSCORE) et la spectroscopie Mössbauer.

II-3-a. La spectrophotométrie UV-visible des centres [4Fe-4S].

A l'état oxydé, un centre [4Fe-4S] présente une absorbance autour de 400 nm correspondant à la bande de transfert de charge S → Fe^{III}. A l'état réduit, cette bande perd environ les 2/3 de son intensité (voir Matériels & Méthodes V-1). Cette spectrophotométrie est utilisée pour suivre les reconstitutions chimiques de centre [4Fe-4S] au sein des protéines *apo*. Les centres reconstitués *in vitro* sont générés à l'état oxydé avec des coefficients d'extinction molaire d'environ 4000-5000 M⁻¹.cm⁻¹ par Fer. Cette spectroscopie ne permet donc pas de quantifier précisément les différents états redox.

II-3-b La spectroscopie RPE des centres [4Fe-4S].

La spectroscopie RPE est une technique très utile et très sensible pour l'étude des centres Fe-S. Sa principale limitation est qu'elle ne concerne que les états paramagnétiques. Il existe plusieurs types d'analyse RPE, le plus classique étant la RPE en onde continue (CW). Cette technique permet d'obtenir un grand nombre d'informations comme l'état de spin du centre, le taux de réduction ou encore l'état de symétrie du système étudié (voir Matériels & Méthodes V-2). La RPE en onde pulsée HYSCORE (HYperfine Sublevel CORElation) est une autre méthode d'étude de ces centres basée sur la RPE. Elle permet de visualiser les

couplages hyperfins relatifs aux interactions entre le centre paramagnétique et les atomes proches possédant un spin nucléaire non nul. Grâce à cette technique il est possible de connaître certains éléments structuraux de l'environnement direct du centre [4Fe-4S] (voir Matériels & Méthodes V-3).

Ces deux techniques RPE peuvent être complétées par des analyses informatiques. En simulant les spectres RPE CW expérimentaux, il est possible de savoir combien d'espèces paramagnétiques sont présentes dans l'échantillon et dans quelle proportion. Par RPE HYSORE, l'extraction des contributions apportées par les couplages hyperfins permet d'avoir accès à la nature précise des atomes ayant un spin nucléaire non nul et couplés aux centres paramagnétiques.

II-3-c. La spectroscopie Mössbauer des centres [4Fe-4S].

La technique de choix pour l'analyse des centres [4Fe-4S] est la spectroscopie Mössbauer. Elle permet l'étude des états oxydés et réduits de toutes les espèces contenant du Fer présents dans l'échantillon. Le signal Mössbauer informe sur l'état d'oxydation, la symétrie de charge et sur le taux de réduction global (voir Matériels & Méthodes V-4). Cette technique est particulièrement utile pour observer des états de valence atypiques pouvant avoir un rôle important dans un mécanisme enzymatique, comme décrit plus bas dans cette Introduction.

Cette technique est indissociable de l'analyse informatique qui permet, grâce à des simulations théoriques, d'extraire les différentes composantes du signal expérimental. Ce dernier est décomposé entièrement pour obtenir les valeurs des paramètres associés à chacune des composantes.

II-3-d. Les centres [4Fe-4S] différenciés.

Comme expliqué précédemment, dans les centres [4Fe-4S] les atomes de Fer sont appariés deux par deux et possèdent une valence mixte dans la plupart des cas. Cependant, dans certaines conditions, une des paire de Fers peut adopter des valences localisées $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ et le centre [4Fe-4S] présentant cette caractéristique est appelé « différencié », « localisé » ou encore « atypique » (Figure II-3-d-1).

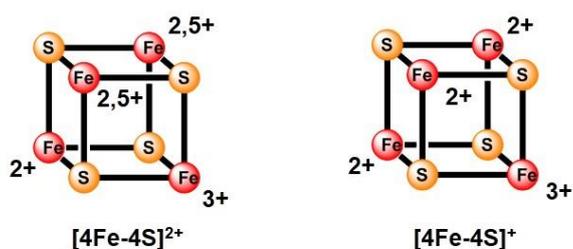


Figure II-3-d-1 : Représentation schématique de la valence de chaque atome de Fer d'un centre [4Fe-4S] « atypique » à l'état oxydé (gauche) et réduit (droite).

Dans tous les exemples connus de la littérature, ce type de centre différencié est toujours dû à la présence d'une coordination particulière du centre [4Fe-4S]. C'est le cas pour l'enzyme FTR (Ferrédoxine-Thiorédoxine Réductase) qui catalyse la réduction de la thiorédoxine par la ferrédoxine (Walters et al. 2005) (Figure II-3-d-2).

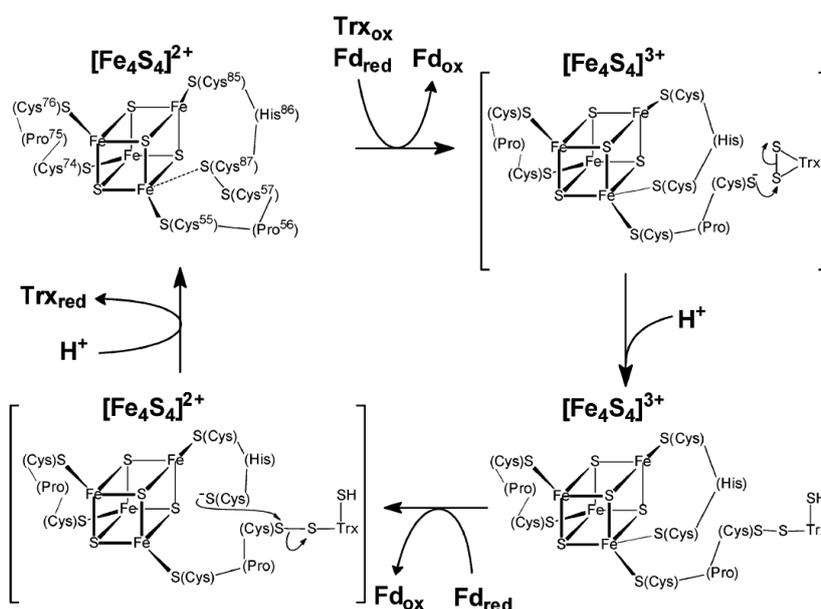


Figure II-3-d-2 : Mécanisme proposé de réduction de la thiorédoxine par la FTR (Walters et al. 2005).

La FTR contient un pont disulfure à proximité d'un centre [4Fe-4S]. Au cours du cycle catalytique un Fe^{II} se trouve coordonné à la fois par un résidu cystéine de la protéine et un groupement thiolate issu de la réduction du pont disulfure protéique. Cela permet la libération du second thiol du disulfure qui peut alors réaliser une attaque nucléophile sur le substrat. La présence d'un Fer pentacoordiné dans les intermédiaires $[4Fe-4S]^{3+}$ est visible en spectroscopie Mössbauer (Walters et al. 2009).

Un deuxième exemple est celui de l'activase de la Pyruvate-Formate Lyase (PFL-AE), une enzyme Radical-SAM qui catalyse la formation d'un radical glycylyl dans la PFL qui, elle-même, catalyse l'oxydation anaérobie du pyruvate en formiate et acetyl-CoA (Yang et al. 2009 ; Shisler et al. 2014) (Figure II-3-d-3).

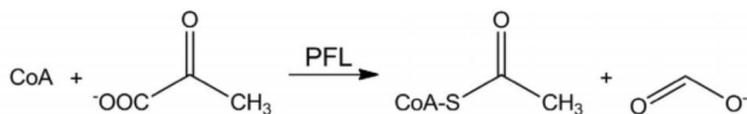


Figure II-3-d-3 : Réaction catalysée par l'enzyme PFL (Shisler et al. 2014).

In vivo, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ est entièrement sous forme « atypique » c'est-à-dire présente une paire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ localisée. Les paires Fe-Fe du centre $[4\text{Fe-4S}]$ de l'enzyme isolée sont, elles, entièrement délocalisées (« typique ») mais l'ajout de petites molécules possédant une partie adénosine conduit à l'obtention d'une paire Fe-Fe localisée comme observé *in vivo*. La signification de ces observations expérimentales est encore inconnue à ce jour, cependant il a été proposé que cette localisation de valence protégerait le centre $[4\text{Fe-4S}]$ vis-à-vis de l'oxygène.

Un troisième exemple concerne LytB, une protéine contenant un centre $[4\text{Fe-4S}]$ qui catalyse une étape de déshydratation lors de la biosynthèse de différents isoprénoides (Ahrens-Botzong et al. 2011) (Figure II-2-d-4).

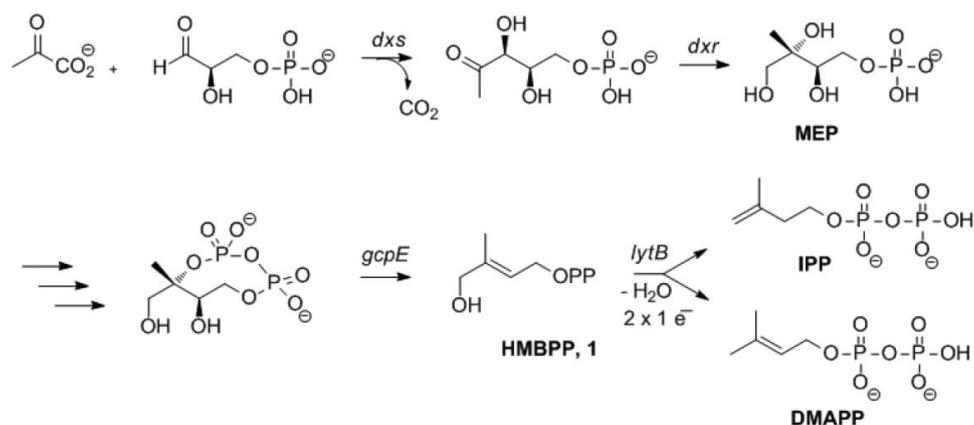


Figure II-3-d-4 : Voies de biosynthèses des isoprénoides IPP et DMAPP dans lesquelles intervient LytB (Ahrens-Botzong et al. 2011).

Dans l'enzyme LytB, la présence d'un site atypique en Mössbauer serait due à la coordination d'un groupement hydroxyle du substrat sur un des Fer du cluster. Ici, la localisation de valence servirait à activer le substrat pour la réaction de déshydratation.

Le quatrième et dernier exemple détaillé ici concerne une sous-classe d'hydrogénase [Ni-Fe] capable de fonctionner en présence d'oxygène. Ces enzymes possèdent un centre [4Fe-3S] très particulier coordonné par six cystéines, capable de stabiliser trois états redox [4Fe-3S]^{3+,4+,5+} (Pandelia et al. 2013). (Figure II-2-d-5).

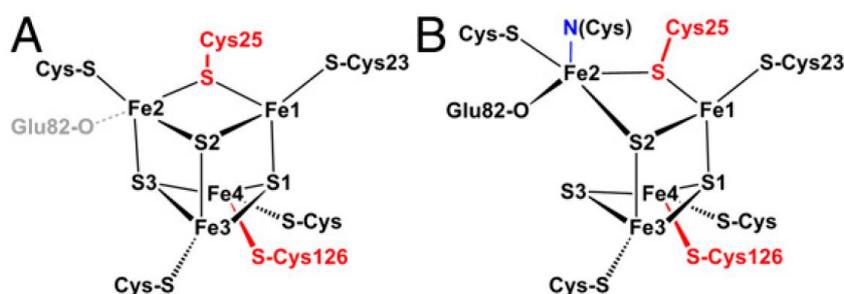


Figure II-2-d-5 : Structures du centre [4Fe-3S] de l'hydrogénase [NiFe] à l'état 3+ (A) et 5+ (B) (Pandelia et al. 2013).

Ces trois états redox couvrent une fenêtre de potentiels de seulement 0,2 V ce qui permet à l'enzyme confrontée à l'oxygène de libérer 2 électrons simultanément pour réduire celui-ci en eau. L'état superoxydé ([4Fe-3S]⁵⁺) est stabilisé par la coordination d'un azote déprotoné de la chaîne polypeptidique et son caractère « atypique » est clairement détectable par spectroscopie Mössbauer.

Il existe d'autres systèmes qui ne sont pas détaillés ici où le centre [4Fe-4S] de l'enzyme présente un site atypique. C'est par exemple le cas de l'enzyme Dph2 (Zhang et al. 2010) ou encore de l'enzyme NadA de *P. horikoshii* (Saunders et al. 2008). Il est intéressant de noter que ce phénomène de différenciation de site par localisation de charge Fe^{II}-Fe^{III} en présence de certains ligands a également été observé sur des centres [4Fe-4S] synthétiques, possédant notamment avec un ligand azoté (Lee et al. 2014).

III – Les enzymes d'insertion radicalaire.

Un sous-groupe de la famille des enzymes Radical-SAM contient, en plus du centre RS, un centre Fe-S additionnel. Ce sous-groupe comporte cinq enzymes impliquées dans l'insertion radicalaire : la biotine synthase et la lipoate synthase (insertion de Soufre), MiaB et RimO (insertion d'un groupement thiométhyle) et TYW1 (insertion d'un fragment carboné). Dans ces cinq enzymes le centre Fe-S additionnel n'est coordonné que par trois cystéines de la chaîne polypeptidique comme dans le cas du cluster RS. Cet arrangement ouvre la possibilité que le deuxième substrat (sulfure, méthylsulfure et pyruvate) puisse être activé par coordination.

III-1) Insertion de sulfure : BioB et LipA.

L'exemple le mieux étudié est celui de la biotine synthase BioB qui insère un atome de Soufre entre deux atomes de carbone aliphatiques du précurseur dethiobiotine. (Jarrett et al. 2005 ; Fontecave et al. 2004) (Figure III-1-1).

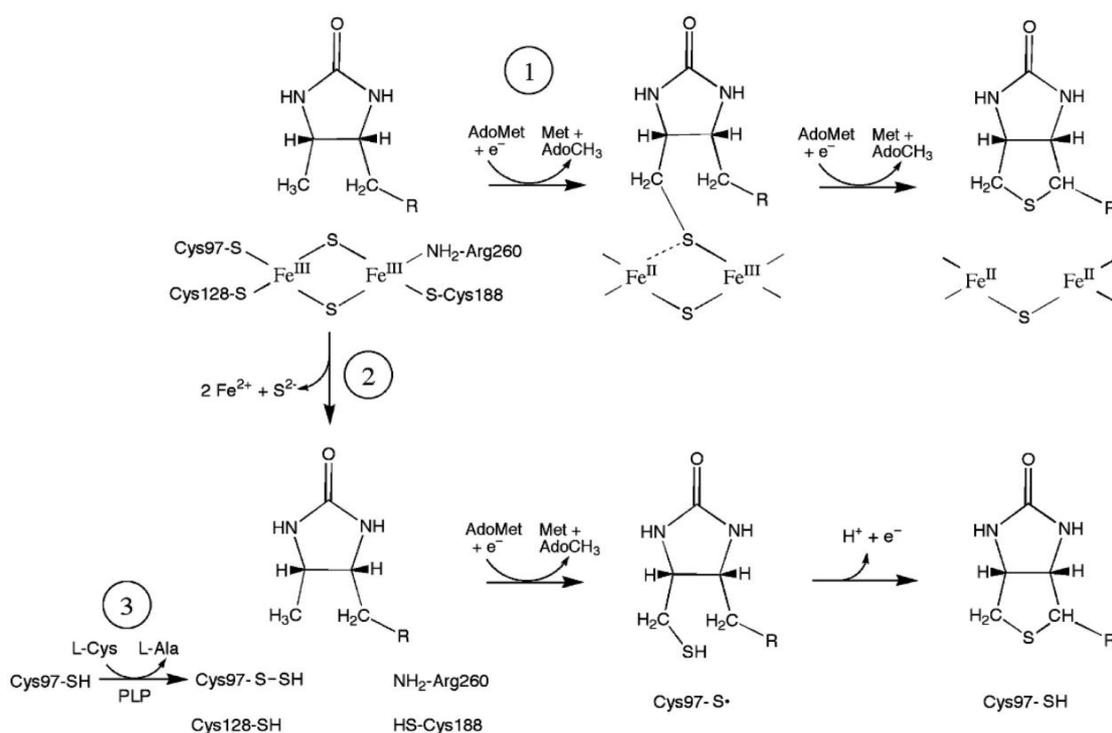


Figure III-1-1 : Mécanisme proposé de la réaction catalysée par la biotine synthase BioB : production de la biotine à partir de la dethiobiotine (Jarrett et al. 2005).

Dans le mécanisme proposé, l'activation radicalaire initiale se fait au niveau du méthyle en position 9 du substrat dethiobiotine. Une fois activée, l'enzyme insère un des atomes de Soufre pontant du cluster additionnel qui est dans le cas de la biotine synthase un cluster [2Fe-2S]. L'activation du deuxième carbone suivie de l'insertion du deuxième Soufre pontant conduit à la biotine et à la destruction du centre [2Fe-2S] qui doit être régénéré pour que l'enzyme puisse fonctionner de manière catalytique. La destruction du centre [2Fe-2S] a été établie par diverses spectroscopies mais n'est pas corrélée avec la formation du produit biotine. Par ailleurs il n'a jamais été possible de reconstruire le centre [2Fe-2S] après destruction. Tous ces éléments suggèrent que la réaction observée est une réaction d'inactivation concurrente avec la réaction catalytique qui, elle, demanderait probablement de fonctionner avec un donneur de Soufre physiologique jusqu'ici non identifié.

La lipote synthase LipA est le deuxième exemple connu d'enzyme capable d'insérer des atomes de Soufre par des mécanismes radicalaires. Tout comme BioB, LipA génère un radical 5'-deoxyadénosyle pour activer le substrat (une « acyl carrier » protéine portant un reste octanoyle). Le substrat activé en C6 capte ensuite un atome de Soufre du cluster additionnel qui est ici un centre [4Fe-4S]. L'opération se répète une deuxième fois en C8 pour former le lipote réduit et un cluster dégradé (formellement 4Fe-2S). (Cicchillo et al. 2004 ; Broderick et al. 2014) (Figure III-1-2).

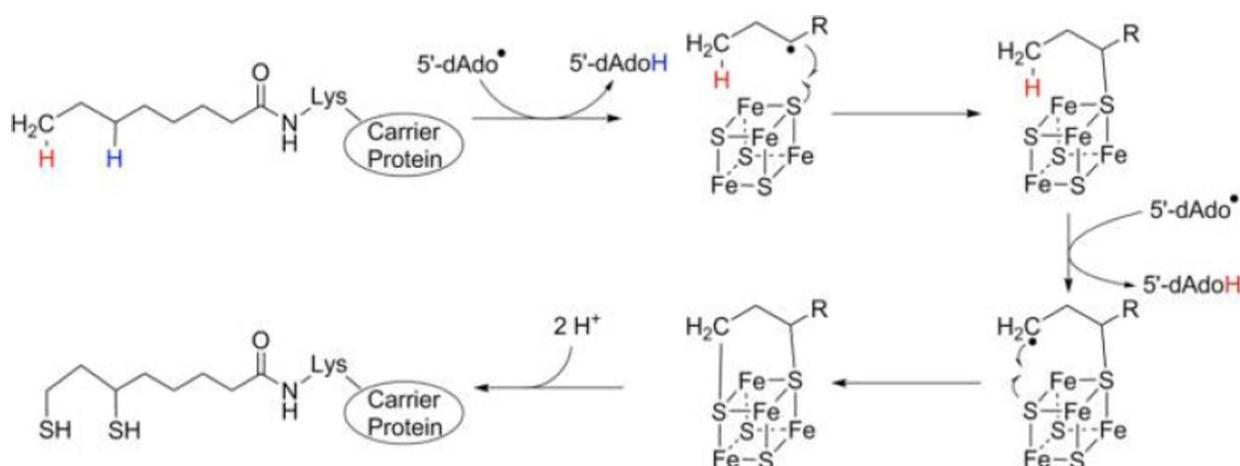


Figure III-1-2 : Mécanisme proposé de la réaction catalysée par l'enzyme LipA (Broderick et al. 2014).

Selon l'hypothèse présentée dans la figure ci-dessus, LipA réaliserait deux réductolyses de SAM successives pour activer deux positions de la chaîne aliphatique du

substrat. La source de Soufre serait un second centre [4Fe-4S], les radicaux formés se coupleraient à deux des Soufres pontants de ce centre qui serait ensuite dégradé pour libérer le produit final dithiolé.

III-2) Insertion de méthylsulfure : RimO et MiaB.

Les enzymes méthylthiotransférases (MTTases) RimO (Ribosomale modification O) et MiaB (pour Méthylthio isopentenyl adénosine B) sont les deux premiers objets d'étude présentés ici. Ces deux enzymes Radical-SAM sont très similaires (38% d'identité) et contiennent deux centres [4Fe-4S].

RimO est le sujet principal de l'étude présentée dans cette thèse. Elle catalyse l'insertion d'un groupement thiométhyle SCH₃ sur le carbone β de l'aspartate 89 de la protéine ribosomale S12 (Anton et al. 2008 ; Arragain et al. 2009) (Figure III-2-1).

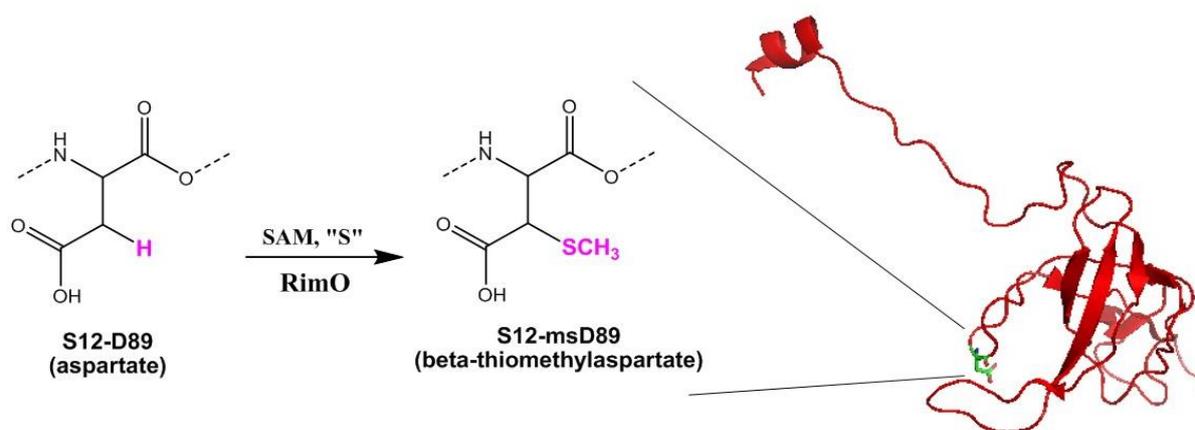


Figure III-2-1 : Réaction de thiométhylation de la protéine S12 catalysée par RimO. Structure cristallographique de la protéine ribosomale S12 isolée de la structure de la sous-unité 30S de ribosome de *T. thermophilus* (pdb 1FJG) dont la séquence est très proche de celle d'*E. coli*.

Le rôle précis de cette thiométhylation n'est pas clairement identifié mais il semblerait qu'elle participe au bon assemblage du complexe ribosomal en diminuant le taux d'erreur lors de sa formation.

Récemment, la structure de l'enzyme RimO avec ses deux centres [4Fe-4S] a été obtenue à 3.3 Å de résolution (Forouhar et al. 2013) (Figure III-2-2).

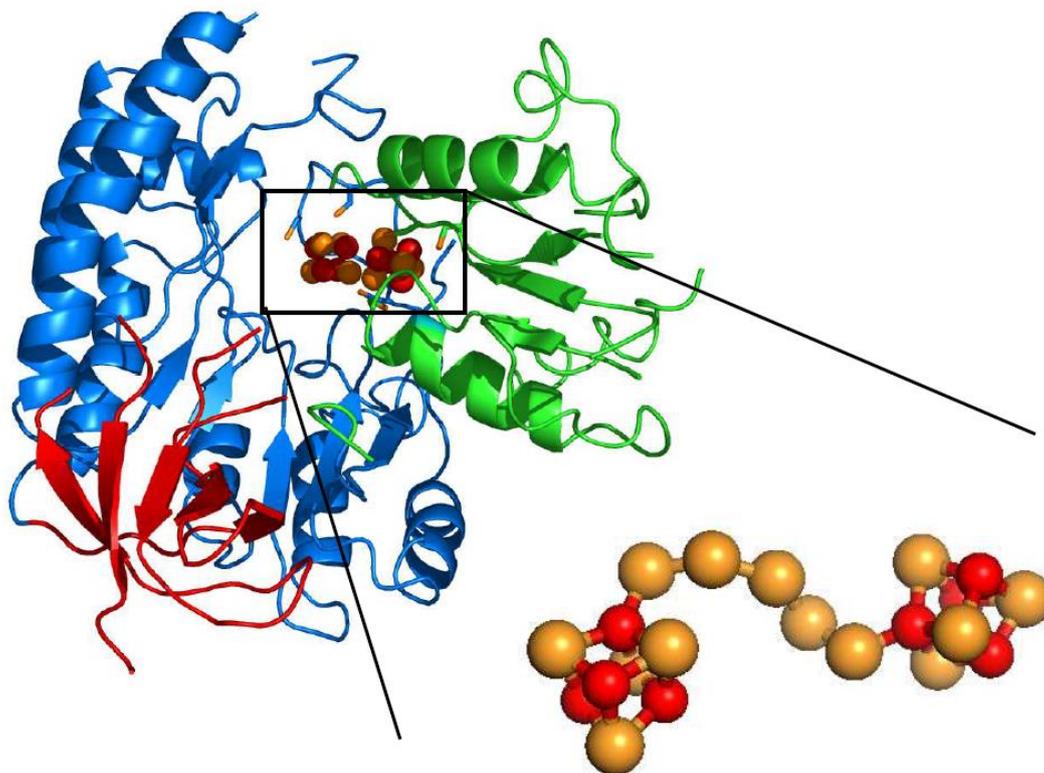


Figure III-2-2 : Structure cristallographique de l'holo-RimO sauvage de *T. maritima* avec une résolution de 3,3Å (pdb 4JC0). En rouge : domaine TRAM, en bleu : domaine radical-SAM, en vert : domaine UPF0004. Un agrandissement de la structure des centres [4Fe-4S] est représentée en bas à droite (Forouhar et al. 2013).

Cette structure est organisée en trois domaines distincts, le premier est le domaine Radical-SAM (en bleu), de type « TIM-barrel », qui coordine un centre [4Fe-4S] dit « centre RS ». Le deuxième domaine UPF 0004 (en vert) fixe un second centre [4Fe-4S] appelé centre « S ». Enfin, un troisième domaine TRAM (en rouge) est caractéristique de protéines interagissant avec des acides nucléiques (TRM & MiaB) (Anantharaman et al. 2001 ; Anton et al. 2010). Au centre de la structure, deux centres [4Fe-4S] sont visibles. L'agrandissement permet de voir la structure détaillée de ces derniers et montre la présence d'une chaîne de polysulfure composée de 5 atomes de Soufre liant les deux centre Fe-S par leur position de coordination libre (Forouhar et al. 2013).

A partir des informations extraites de la structure et des données biochimiques et spectroscopiques, un mécanisme a pu être proposé (Forouhar et al. 2013) (Figure III-2-3).

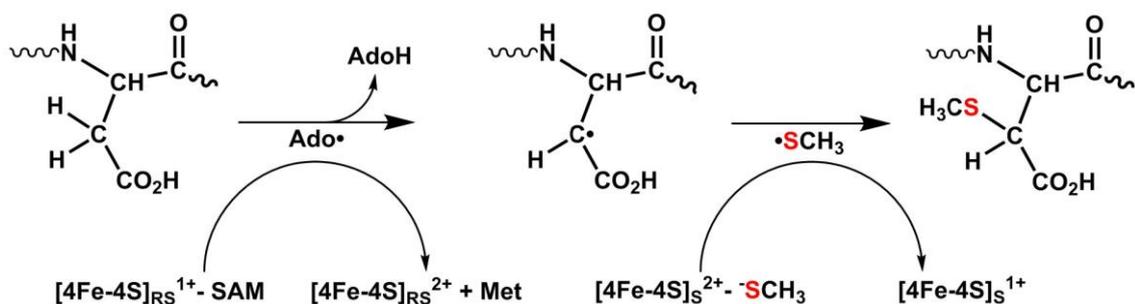


Figure III-2-3 : Mécanisme proposé de la réaction catalysée par RimO.

Le mécanisme proposé implique deux grandes étapes. La première est l'activation radicalaire du substrat par le radical adénosyle issu de la réductolyse de la SAM par le centre RS. La seconde correspond à l'activation radicalaire du méthylsulfure (deuxième substrat) par le centre S suivi d'un couplage radicalaire avec le substrat activé pour former le produit final. En présence d'une source de Soufre exogène (Na_2S , CH_3SNa), l'enzyme peut accomplir jusqu'à 20 turnovers (Forouhar et al. 2013). Dans ce mécanisme, de nombreuses questions ne sont pas résolues, notamment en ce qui concerne la chronologie des événements, les facteurs qui contrôlent la réaction et le mécanisme radicalaire précis.

L'enzyme RimO a été caractérisée par différentes méthodes spectroscopiques, UV-vis., RPE et Mössbauer (Arragain et al. 2010) (Figure III-2-4).

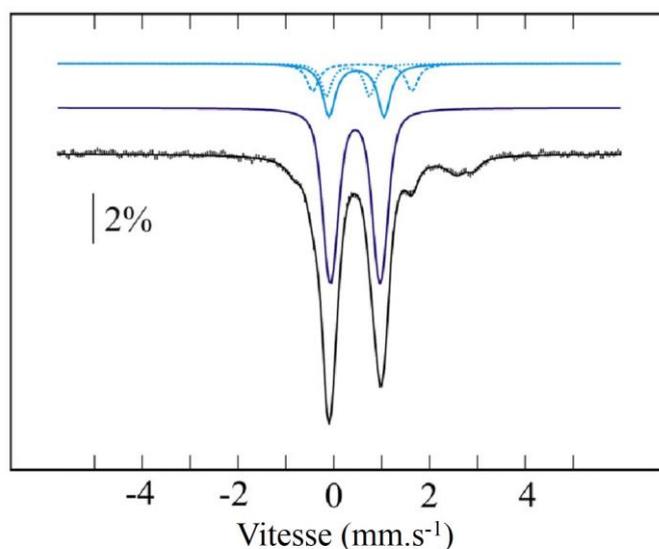


Figure III-2-4 : Spectres Mössbauer expérimental et simulés de l'enzyme RimO sauvage de *T. maritima* à l'état oxydé (Arragain et al. 2010).

Le spectre Mössbauer représenté ci-dessus présente une caractéristique particulière. Le spectre expérimental (en noir) a été simulé en considérant deux jeux de paramètres en bleu et en violet correspondant à deux centres [4Fe-4S]. Le premier est dit « typique » et contient deux paires de Fer identiques et délocalisés ($\text{Fe}^{2,5+}$). Le second, dit « atypique », est composé d'une paire de Fer délocalisée et d'une autre à valence localisée $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$. Ce cas très particulier, qui n'avait pas été commenté à l'époque, pourrait avoir un lien avec le mécanisme réactionnel catalysé par RimO.

L'enzyme MiaB insère un groupement thiométhyle SCH_3 en position 2 d'une adénine 37 déjà modifiée par un groupement isopentenyle en position 6 grâce à l'action d'une première enzyme de modification MiaA (Moore et al. 1997 ; Pierrel et al. 2002) (Figure III-2-5).

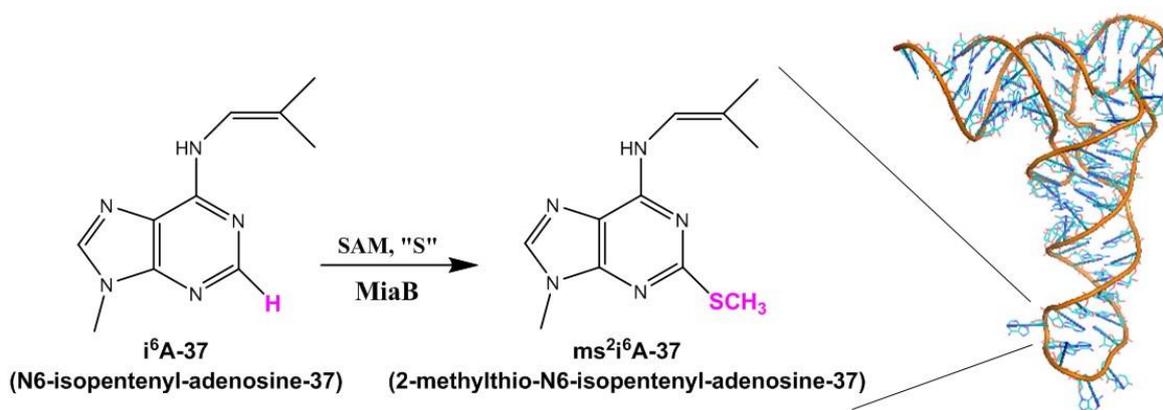


Figure III-2-5 : Réaction de thiométhylation catalysée par MiaB. Structure cristallographique de l'ARNt phénylalanine de *E. coli* (pdb 1FJG).

Comme dans le cas de la thiométhylation catalysée par RimO, celle catalysée par MiaB n'a pas de rôle physiologique précisément établi. Le groupement thiométhyle placé dans cette position formerait des liaisons hydrogène avec l'ARNm en cours de traduction ce qui renforcerait l'interaction codon-anticodon pour prévenir d'éventuels décalages de cadre de lecture et éviter ainsi la formation de protéines mal traduites (Jenner et al. 2010 ; Urbonavicius et al. 2003).

Sur le plan de la réaction enzymatique, les deux protéines MiaB et RimO catalysent l'insertion d'un groupement thiométhyle par activation d'une liaison C-H. Les deux

protéines sont homologues et nécessitent les mêmes cofacteurs pour la catalyse. Cependant, la différence fondamentale réside dans le fait que RimO active un carbone sp^3 et MiaB active un carbone sp^2 (Forouhar et al. 2013).

III-3) Insertion de composé à deux carbones : TYW1.

L'enzyme TYW1 est le troisième objet d'étude présentée dans cette thèse. Elle est impliquée dans la formation de la wybutosine (yW), considérée comme une des bases modifiées les plus complexes, présente dans l'ARNt^{Phe} des eucaryotes et archées en position 37 proche de l'anticodon. (Perche-Letuvée et al. 2012 ; Young et al. 2013). La voie de biosynthèse de yW nécessite cinq étapes. L'enzyme TYW1 est responsable de la deuxième étape en catalysant la transformation de m¹G en 4-déméthylwyosine appelé ImG-14 (Figure III-3-1).

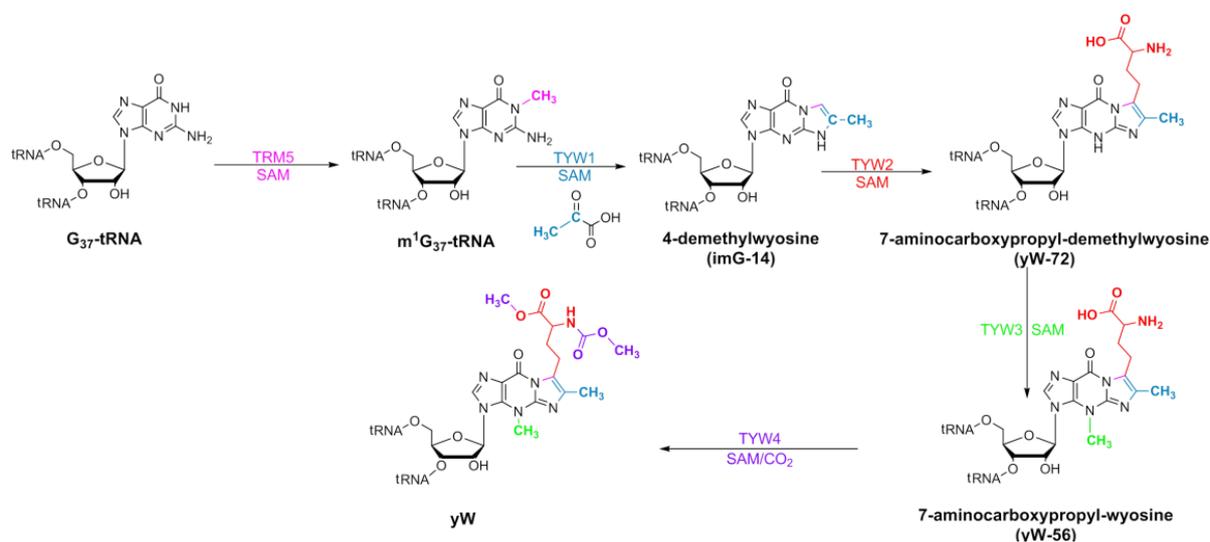


Figure III-3-1 : Schéma réactionnel de biosynthèse de la wybutosine.

Cette réaction consiste en l'insertion de deux unités carbonées suivie d'une cyclisation pour former le produit intermédiaire tricyclique ImG-14. Le précurseur de ces deux atomes de carbone a été identifié par une équipe américaine comme étant le pyruvate au tout début de cette thèse. (Young et al. 2011 ; Perche-Letuvée et al. 2012) (Figure III-3-2).

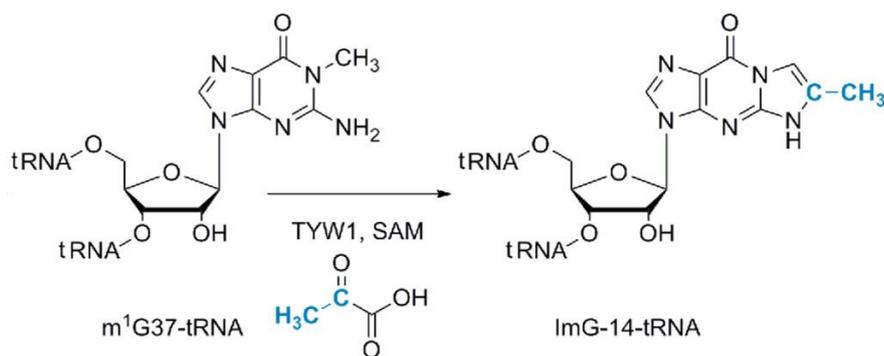


Figure III-3-2 : Réaction d'insertion de deux atomes de carbone et cyclisation catalysée par TYW1 (Perche-Letuvée et al. 2012).

Comme la plupart des modifications des ARNt, la wybutosine n'est pas essentielle pour la cellule. Son rôle supposé serait de stabiliser des interactions entre ARNt et ARNm et donc servirait d'élément de contrôle lors de la réaction de traduction (Noma et al. 2006 ; Young et al. 2013).

IV – Problématique de la thèse : double utilisation de la SAM.

Dans la famille des enzymes Radical SAM plusieurs membres sont capables d'utiliser la SAM pour deux réactions chimiques différentes au cours d'un même cycle catalytique. La première est la réaction de réductolyse de la SAM, commune à toutes les enzymes de la famille. La seconde est une réaction de méthylation selon un mécanisme SN2. Comment une même molécule dans un même site actif est utilisée de deux manières différentes ? Quels types de contrôle sont à l'œuvre dans ces réactions ? Ces questions constituent la problématique de cette thèse.

Cette double utilisation de la SAM se retrouve dans deux des trois systèmes étudiés ici, les deux méthylthiotransférases (MTTases) RimO et MiaB. (Landgraf et al. 2013 ; Forouhar et al. 2013) (Figure IV-1).

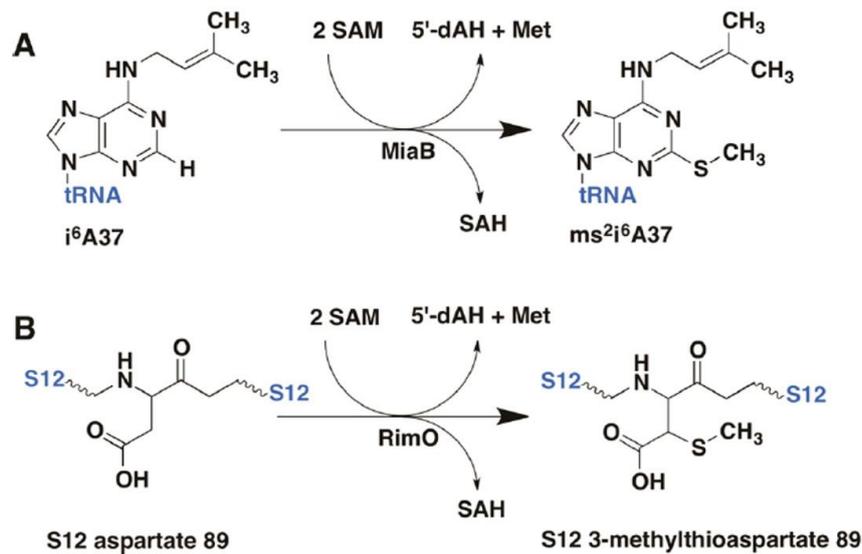


Figure IV-1 : Réactions catalysées par MiaB (A) et RimO (B) avec utilisation de deux molécules de SAM (Landgraf et al. 2013).

Ce double usage de la SAM se manifeste par la formation de deux sous-produits de réaction, la S-adénosyl-homocystéine (SAH) et le 5'-déoxy-adénosine (5'-dAH) qui sont issus respectivement de la réaction de méthylation et de l'activation radicalaire après réductolyse (Figure IV-2).

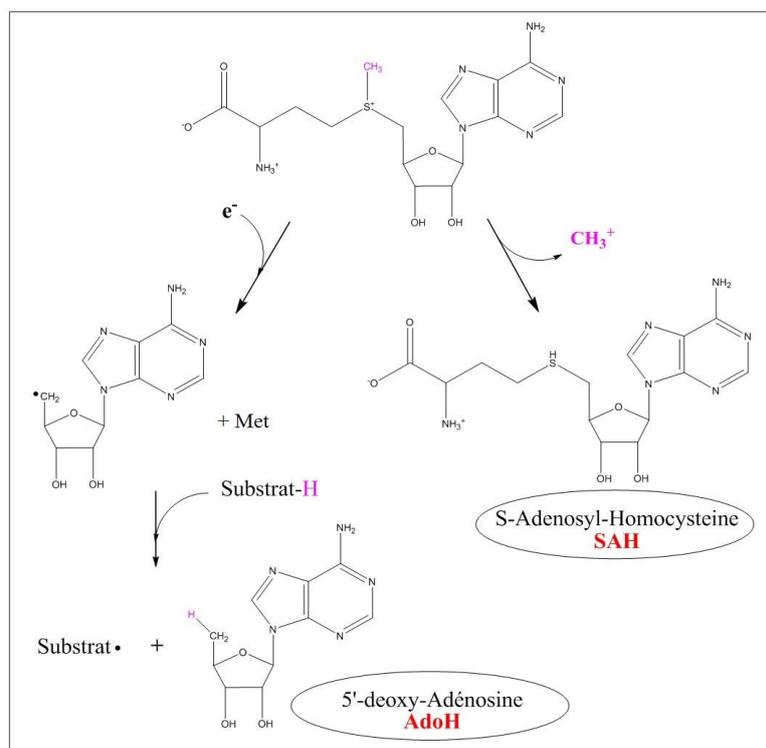


Figure IV-2 : Formations de S-Adénosyl-Homocystéine (SAH) et de 5'-deoxy-Adénosine (AdoH) à partir de la S-Adénosyl-Méthionine (SAM).

Cette problématique a été discutée dans la littérature à travers les quelques autres cas connus d'enzymes RS utilisant deux molécules de SAM pour deux réactions différentes au cours d'un même cycle. Il s'agit toujours de réactions de méthylation et les enzymes responsables sont : Cfr, RlmN et GenK (Grove et al. 2013 ; Kim et al. 2013).

Cfr et RlmN ont été le mieux étudiés sur le plan mécanistique et structural. Ces deux systèmes catalysent la méthylation de l'Adénine 2503 de la sous-unité 23S de l'ARNr chez les bactéries en position C8 et C2 respectivement. (Grove et al. 2013) (Figure IV-3).

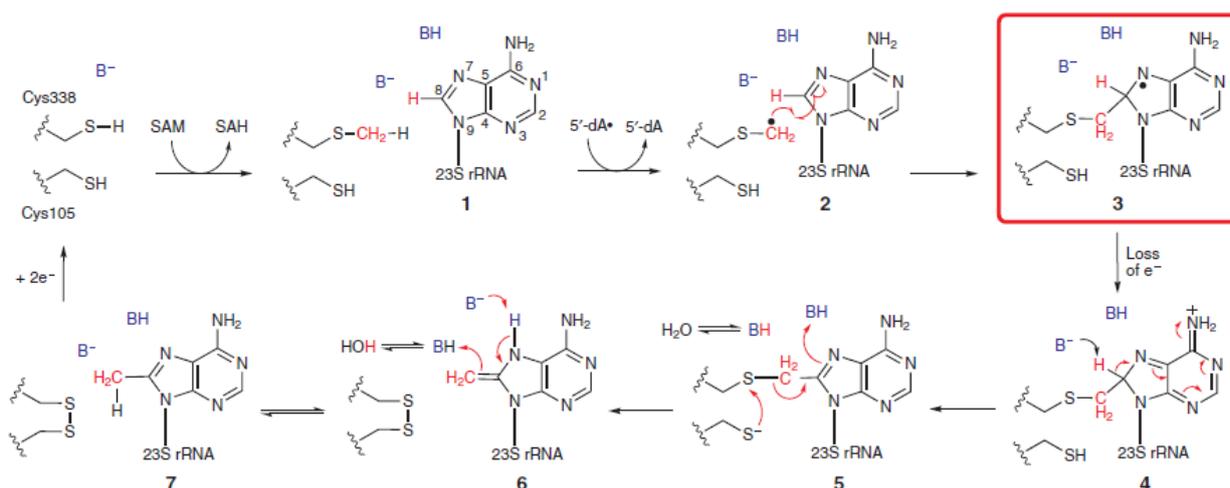


Figure IV-3 : Mécanisme proposé pour l'enzyme Cfr (Grove et al. 2013).

Ces deux enzymes ne contiennent que le seul centre RS. Dans le mécanisme proposé une première molécule de SAM est utilisée pour la méthylation d'une cystéine du site actif (C338) en méthyl-cystéine (mCys). Le radical 5'-deoxyadénosyle issu de la réductolyse de la seconde molécule de SAM par le centre RS arrache un atome d'hydrogène sur le méthyl mCys, conduisant à un radical méthylène intermédiaire. Ce radical est proposé s'additionner en position C8 (C2 pour RlmN) conduisant à un adduit ARNm/Cfr présentant un radical délocalisé sur la partie aromatique du substrat. Cet intermédiaire perd ensuite un électron et la méthyl-8 Adénosine (ou méthyl-2 Adénosine dans le cas de RlmN) est libérée avec l'assistance d'une autre cystéine du site actif (C105) complètement conservée. Dans ce processus il y a formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines qui, *in vitro*, est réduit par le DTT permettant le cycle catalytique de l'enzyme (Silakov et al. 2014). Ce mécanisme a été validé par la structure de RlmN montrant la présence d'un groupe méthyle sur la cystéine 338. L'analyse structurale montre aussi que le site actif de l'enzyme ne peut pas contenir deux

molécules de SAM simultanément. Cette observation a conduit à la proposition que la SAM est coordonnée au centre RS lors de ses deux réactions successives (Landgraf et al. 2013).

L'enzyme GenK catalyse la méthylation en C6' lors de la voie de biosynthèse de la gentamicine, un oligosaccharide antibiotique (Kim et al. 2013) (Figure IV-4).

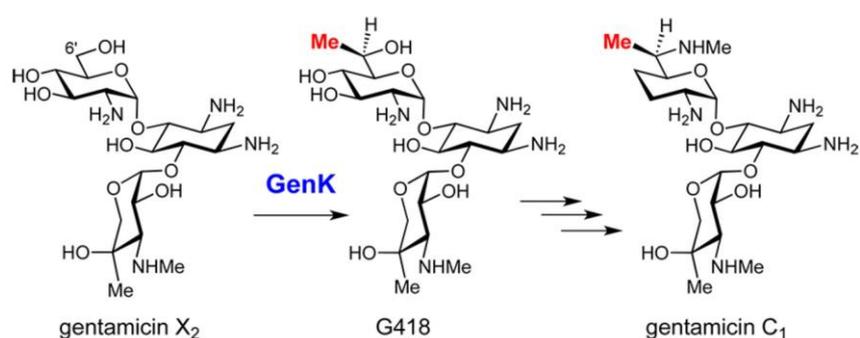


Figure IV-4 : Réaction catalysée par l'enzyme GenK (Kim et al. 2013).

Le mécanisme de la réaction catalysée par GenK n'est pas encore clairement établi. Cependant, les différentes hypothèses mécanistiques émises ont plusieurs points communs : le centre RS est utilisé, par l'intermédiaire d'une première molécule de SAM, pour activer la position 6' du substrat, le cofacteur cobalamine sert à activer le méthyle qui est inséré, ce dernier provenant d'une seconde molécule de SAM.

Un dernier exemple encore mal connu est l'enzyme NifB impliquée dans la formation du cofacteur FeMoco de la nitrogénase (Hu et al. 2014) (Figure IV-5).

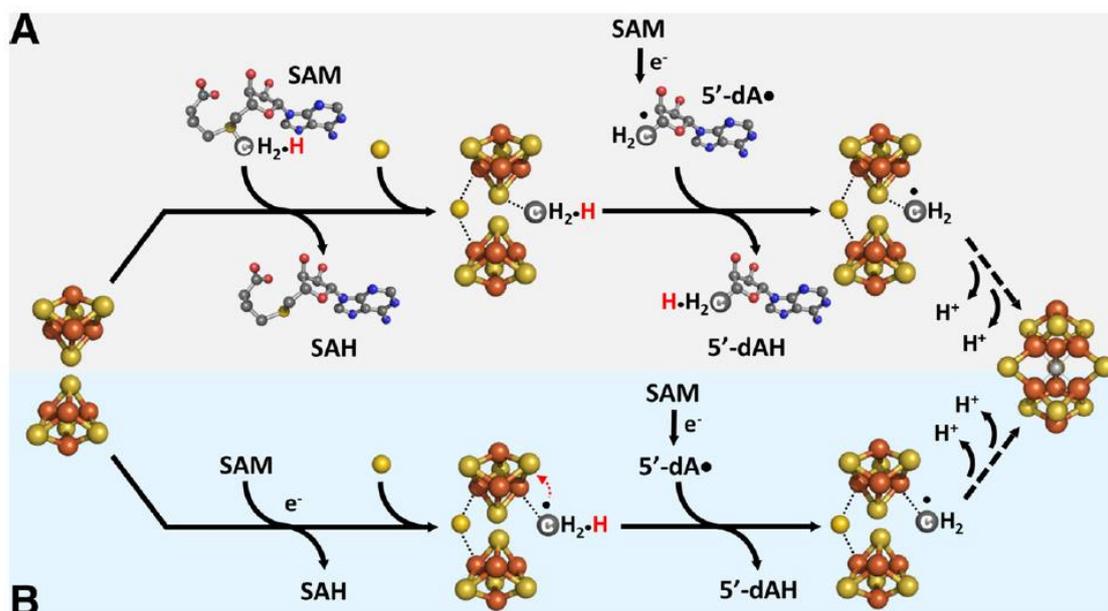


Figure IV-5 : Mécanismes proposés pour l'enzyme NifB. Schéma A : Mécanisme avec méthylation d'un Soufre d'un des centres [4Fe-4S]. Schéma B : Mécanisme avec méthylation d'un Fer d'un des centres [4Fe-4S] (Hu et al. 2014).

L'enzyme NifB catalyse l'insertion d'un groupement méthyle entre deux centres [4Fe-4S] pour former un précurseur très particulier contenant 8 atomes de Fer, 9 atomes de Soufre et 1 atome de carbone totalement déprotoné. Le méthyle est amené par une première molécule de SAM et un premier hydrogène va être arraché par un radical adénosyle issu d'une seconde molécule de SAM. Le premier des deux mécanismes proposés (A) pourrait également résulter d'une insertion directe d'un groupement thiométhyle qui intégrerait le centre [4Fe-4S], plutôt que de métyler un Soufre de ce centre. Le mécanisme des déprotonations postulées qui suivent ne sont pas connues, tout comme l'état électronique du carbone dans le cofacteur formé.

V – Présentation des chapitres de la thèse.

L'objectif du travail présenté dans ce rapport est de comprendre en détail le mécanisme catalytique de l'enzyme RimO. La chronologie, les contrôles réactionnels et les mécanismes radicalaires sont étudiés en se basant sur des analyses structurales, biochimiques et spectroscopiques. Une étude de l'enzyme TYW1 est également présentée ici qui tente d'élucider certaines étapes de son cycle catalytique.

V-1) Chapitre I : Caractérisation biochimique et spectroscopique de RimO.

Dans le premier chapitre, les données biochimiques et les particularités spectroscopiques de l'*holo*-enzyme RimO sont présentées. En plus de la présence d'un site « atypique » vu en spectroscopie Mössbauer à l'état oxydé, les études RPE HYSCORE de l'état réduite de l'enzyme révèlent la présence d'un azote fortement couplé à un des deux centres. L'analyse Mössbauer et RPE HYSCORE des protéines modifiées ne contenant qu'un seul des deux centres a permis de montrer que ces deux caractéristiques étaient portées par le centre RS.

V-2) Chapitre II : Etude biochimique et spectroscopique du site actif de RimO.

Dans ce chapitre le rôle biochimique de plusieurs résidus faisant partie du site actif est appréhendé par l'étude des simples mutants correspondants. La recherche de l'azote responsable du couplage spin/azote détecté par RPE HYSCORE a conduit à proposer comme candidats possibles les résidus R268 et H229. Par contre la particularité Mössbauer reste visible avec tous les simples mutants testés.

V-3) Chapitre III : Etude de RimO en présence de SAM.

Le troisième chapitre concerne l'étude de la protéine RimO oxydée et réduite en présence de SAM. La spectroscopie Mössbauer montre que, avec l'enzyme réduite, la SAM provoque la réoxydation instantanée du centre RS. Dans les mêmes conditions la spectroscopie RPE HYSCORE montre la disparition du couplage spin/azote qui est en accord avec la réoxydation du centre RS. Une étude spectroscopique plus poussée avec une protéine entièrement marquée ^{15}N a permis de montrer que le couplage spin/azote était dû en fait au tampon Tris utilisé. L'ensemble de ces résultats montrent que RimO utilise un « redox switch » pour contrôler la double utilisation de la SAM.

V-4) Chapitre IV : Formation de complexe enzyme-substrat pour la cristallogenèse.

Dans cette partie, les méthodes de préparation des complexes enzyme-substrat sont présentées avec les enzymes RimO et MiaB. Les preuves de la formation de ces complexes sont également apportées. Les études de cristallogenèse n'ont pas encore abouties et sont en cours de réalisation.

V-5) Chapitre V : Etude du mécanisme enzymatique de la réaction catalysée par TYW1.

Ce cinquième et dernier chapitre décrit les résultats obtenus avec l'enzyme TYW1. Le mécanisme catalytique de la réaction a été étudié par différents marquages isotopiques dans le but de confirmer ou d'infirmer les mécanismes proposés dans la littérature. La première étape d'activation radicalaire a été mise en évidence et une des hypothèses mécanistiques a été renforcée.

MATERIELS & METHODES

I – Matériel biologique.

I-1) Souches bactériennes.

I-1-a. *E. coli* XL1-Blue (Stratagene®).

Cette souche commerciale de bactéries à pour génotype : *endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 Amy Cm^R] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*. Elle est spécifiquement utilisée pour la transformation par des plasmides amplifiés par PCR lors des expériences de mutations dirigées. Elle est résistante à la tétracycline.

I-1-b. *E. coli* DH5α.

Les bactéries *E. coli* DH5α ont le génotype : *F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR mupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻*. Elles sont utilisées pour produire des ADN plasmidique.

I-1-c. *E. coli* BL21(DE3).

Cette souche bactérienne à le génotype : *F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*. Elle est utilisée pour la surproduction de protéine contrôlée par le promoteur T7 inductible par addition d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), analogue non hydrolysable de l'allolactose. Cette induction se fait par levée d'inhibition de transcription due à la présence du répresseur *LacI*.

I-1-d. *E. coli* BL21(DE3)-RIL (Codonplus®).

Le génotype de ces bactéries est le même que pour la souche BL21(DE3) mais avec le plasmide RIL en plus : *F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) Tet^R λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5] RIL [argU ileY leuW Cam^R])*. Cette souche est utilisée pour la surproduction de protéines. Le plasmide RIL permet de produire plus d'ARNt arginine ;

isoleucine et leucine qui sont rares chez *E. coli* et contient un gène de résistance à la chloramphénicol.

I-1-e. E. coli MiaB- (TX3346).

Dans le cas de cette bactérie, le génotype est : *F- lacI378 lacZ-GCG proB+/ara Δ (lac-pro) XIII miaB : Tn10dCm*. Le gène codant pour la protéine MiaB a été inactivé ce qui évite au ARNt isopenténylé en position A37 d'être thiométhylé. Cette souche permet donc de produire des ARNt substrats de MiaB.

I-2) Plasmides de surexpression.

I-2-a. RimO-Tm-p7-7.

Le vecteur pT7-7 a été utilisé pour cloner le gène *rimO* de *Thermotoga maritima*. Ce plasmide présente un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries après transformation. C'est ce plasmide qui est utilisé comme « template » pour réaliser des mutations dirigées.

I-2-b. MiaB-Tm-pT7-7.

Comme pour RimO, le gène *miaB* de *T. maritima* a été cloné dans le plasmide pT7-7 pour la surproduction de protéine.

I-2-c. TYW1-PAB2039-pT7-7.

Le gène codant pour l'enzyme TYW1 issue de *Pyrococcus abyssi* a également été intégré au vecteur pT7-7.

I-2-d. T7RNAP-6H-pET-3a.

Le vecteur pT7-7 a aussi été utilisé pour cloner le gène de la T7 RNA polymérase avec une étiquette poly-histidine.

I-2-e. TEV-pMal.

La Tabacco Etch Virus (TEV) est une protéine virale permettant le clivage spécifique d'une séquence peptidique Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly. Son gène a été cloné dans le vecteur pMal.

I-2-f. ARNt-Phe-pUC18.

Le vecteur pUC18 est un plasmide multi-copies, il permet d'obtenir une grande quantité de plasmide. La séquence codante pour l'ARNt-Phe qu'il contient peut être ensuite utilisée pour la transcription *in vitro*, après avoir été isolé et linéarisé. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline.

I-2-g. ARNt-Phe-pTRC99Phe.

Ce plasmide est utilisé pour surproduire l'ARNt-Phe par induction à l'IPTG, il est dérivé du plasmide pTRC99B permettant la surproduction de tous les ARNts. Les bactéries transformées par ce vecteur acquièrent une résistance à l'ampicilline.

I-2-h. AspB-6H-pBAD.

Ce plasmide a été gracieusement donné par le Dr. G. J. Poelarends (pays-Bas). Il est utilisé pour la surproduction de l'enzyme aspartase et porte un gène de résistance à l'ampicilline.

I-3) Milieux de cultures.

Les milieux utilisés sont le milieu complet LB (Luria Bertani) et le milieu minimum M9. Le milieu LB est utilisé à l'état liquide ou solide (LB agar), il contient 10 g/L d'hydrolysate de caséine, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl. Le milieu minimum M9 est lui composé de 6 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄ et 0,5 g/L de NaCl. Ce milieu minimum est complété par 2 mg/L de thiamine, 1 g/L de NH₄Cl et 1 mM de FeCl₃. Pour chaque utilisation les milieux sont tous stérilisés pendant 20 min à 120°C avant d'être supplémenté par les antibiotiques adéquats (ampicilline 100 µg/L, Chloramphénicol 30 g/L).

II – Biologie moléculaire.

II-1) Préparation des bactéries compétentes.

Les cellules sont mises en culture toute la nuit à 37°C dans 5 mL contenant l'antibiotique approprié. 10 mL de milieu LB sont inoculés avec la culture en phase stationnaire et incubés (37°C, 200 rpm) jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm égale à 0,4. Les cellules sont culottées (10 min à 5000 rpm, 4°C) et incubées dans la glace 10 min puis le culot est séché pendant 1 minute sous hotte à flux laminaire pour être repris dans 5 mL de solution stérile de CaCl₂ à 100 mM. Après incubation pendant 30 minutes dans la glace, les cellules sont culottées (10 min à 5000 rpm, 4°C), puis le culot est séché pendant 1 min sous hotte à flux laminaire pour être finalement repris dans 0,7 mL de solution stérile de CaCl₂ à 100 mM contenant 10% de glycérol. Des aliquots de 200 µL sont préparés et congelés immédiatement dans l'azote liquide

II-2) Transformation des bactéries.

Un volume de 100 µL de cellules *E. coli* compétentes est décongelé puis mélangé avec 2 µL de solution plasmidique. Après incubation dans la glace pendant 30 min, un choc thermique est réalisé (2 min à 42°C) puis 900 µL de solution LB stérile sont ajoutés sous hotte à flux laminaire. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures, avant d'être étalées sur milieu solide LB-Agar contenant les antibiotiques appropriés

II-3) Production et purification de plasmide.

Les stocks de plasmides sont préparés à partir d'une souche *E. coli* DH5α transformée avec le plasmide d'intérêt et étalée sur boîte de Pétri LB-Agar contenant l'antibiotique approprié. Une colonie est sélectionnée pour inoculer 5 mL de milieu LB qui sont ensuite mis en culture sur la nuit à 37°C. Les cellules sont collectées en phase stationnaire (5 min, 5 000 rpm à 4°C) et le kit Bio Basic (EZ-10 spin column Plasmid DNA MiniPreps Kit) est utilisé pour purifier les plasmides. A la fin de la purification, le plasmide est élué dans un volume final de 50 µL et la concentration de la solution est déterminée à partir de l'absorbance à 260 nm.

II-4) Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée utilise la technique d'amplification génétique par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour générer de nombreuses copies d'un plasmide contenant la séquence de la protéine à muter. Cette technique de PCR, qui ne sera pas détaillée ici, nécessite l'utilisation d'amorces d'ADN servant de point de départ pour chaque copie produite. Ce sont grâce à ces amorces que l'on peut introduire de légères modifications dans la séquence d'ADN et par conséquent produire une mutation. Cette technique est réalisée à partir d'un kit commercial de mutagenèse (QuickChange® de Stratagene), la séquence d'ADN à amplifier doit être purifiée et les amorces d'ADN sont synthétisées par une entreprise spécialisée (Eurofins). Une fois les produits PCR obtenus ils sont utilisés pour transformer les cellules compétentes commerciales XL1-Blue résistantes à la tétracycline. Les plasmides sont ensuite produits, purifiés grâce à un kit commercial (Quiagen) et contrôlés par séquençage d'ADN (Eurofins).

Cette technique de mutagenèse dirigée a été utilisée pour produire les différents mutants de l'enzyme RimO de *T. maritima* :

- RimO-S : C'est une forme modifiée de la protéine RimO dont les trois cystéines ligands du centre [4Fe-4S] radical-SAM ont été remplacées par des alanines, C148A / C152A / C155A.

Amorces PCR :

5' CCGACGGGGCTGACAGAGGAGCCACTTTCGCTTCCATACC 3'

5' GGTATGGAAGCGAAAGTGGCTCCTCTGTCAGCCCCGTCGG 3'

- RimO-RS : C'est une forme modifiée de la protéine RimO dont les trois cystéines ligands du centre [4Fe-4S] auxiliaire appelé « site Soufre » ont été remplacées par des alanines, C10A / C46A / C79A.

Amorces PCR :

C10A

5' GGTTCTAGGAGCTCCGAAAAACG 3'

5' CGTTTTTCGGAGCTCCTAGAACC 3'

C46A

5' GTTGGACACCGCTGCTTTCATAG 3'

5' CTATGAAAGCAGCGGTGTCCAAC 3'

C79A

5' GTGAAAGGTGCTCTTGTTTCAG 3'

5' CTGAACAAGAGCACCTTTCAC 3'

- RimO K12A : Simple mutant ayant la lysine 12 remplacée par une alanine.

Amorces PCR :

5' GTTCTAGGATGTCCGGCAAACGAAGCGCATTGC 3'

5' GCAATGCGCTTCGTTTGCGGACATCCTAGAAC 3'

- RimO K161A : Simple mutant ayant la lysine 161 remplacée par une alanine.

Amorces PCR :

5' CCATACCTTCGTTTCGCAGGAAGTCTGAGAAG 3'

5' CTTCTCAGACTTCCTGCGAACGAAGGTATGG 3'

- RimO Q192A : Simple mutant ayant la glutamine 192 remplacée par une alanine.

Amorces PCR :

5' GAAATAATCCTCGTCGCTGCGGACACGACGCCTACGGG 3'

5' CCCGTAGGACGTCGTGTCCGCAGCGACGAGGATATTC 3'

- RimO H229F : Simple mutant ayant la l'histidine 229 remplacée par une phénylalanine (mutant alanine non stable).

Amorces PCR :

5' GTTATGTACCTTTTTCCGGATCATCTG 3'

5' CAGATGATCCGGAAAAAGGTACATAAC 3'

- RimO R268A : Simple mutant ayant l'arginine 268 remplacée par une alanine.

Amorces PCR :

5' GAAACATATGGGAGCAACGAAGAGTTCAG 3'

5' CTGAACTCTTCGTTGCTCCCATTAGTTTC 3'

III) Techniques biochimiques.

III-1) Surproduction des protéines et ARNt.

III-1-a. Surexpression des protéines thermophiles.

La bactérie *E. coli* BL21(DE3) RIL a été utilisée pour surproduire ce type de protéines, cette souche permet de pallier les différences entre organismes thermophiles et mésophiles. Les gènes codants pour les protéines thermophiles MiaB, RimO et TYW1 sont soumis au promoteur *lacZ* et donc leur expression est donc inductible par l'IPTG.

Après avoirensemencé 1 L de milieu LB par 10 mL de pré-culture en phase stationnaire, les cultures sont incubées à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. La température est alors réduite à 30°C pendant 30 min puis la surexpression de la protéine d'intérêt est induite par ajout de 250 µM d'IPTG. Après 2 à 3h d'induction, les cultures sont arrêtées puis les cellules sont centrifugées (4000 rpm, 4°C, 20 min), rincées dans du tampon Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0 et repris dans du tampon de lyse Tris-HCl 50 mM / KCl 250 mM / DTT 5 mM / EDTA 1 mM / PMSF 100 µM pour être finalement stockées à - 80°C.

III-1-b. Surexpression des ARNt-Phe et ARNt-Ser.

Pour les deux ARNt étudié ici, la souche bactérienne *E. coli* TX3346 (*miaB*⁻) est utilisée, ce qui permet donc d'obtenir des ARNt contenant i⁶A, substrat de MiaB. La surexpression de l'ARNt-Phe est inductible par l'IPTG alors que celle de l'ARNt-Ser est inductible à la chaleur (42°C).

Pour l'ARNt-Phe, 1 L de milieu LB par 10 mL de pré-culture en phase stationnaire, les cultures sont incubées à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. La température est alors réduite à 30°C pendant 30 min puis la surexpression de l'ARNt-Phe est induite par ajout de 500 µM d'IPTG. La culture se poursuit sur la nuit à 30°C puis les cellules sont centrifugées (4000 rpm, 4°C, 20 min), rincées dans du tampon Tris-Cl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0 et repris dans du tampon de lyse Tris-HCl 50 mM / KCl 250 mM / DTT 5 mM / EDTA 1 mM / PMSF 100 µM.

Pour l'ARNt-Ser, la culture est réalisée en fermentateur, 6 L de milieu LB par 60 mL de pré-culture en phase stationnaire, la culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. En parallèle, 5 L de milieu LB sont placés à 50°C et sont ajoutés au 6 L de culture ce qui fait instantanément monter la température à 42°C. L'incubation à 42°C est poursuivie pendant 2h, puis les cellules sont centrifugées (4000 rpm, 4°C, 20 min), rincées dans du tampon Tris-Cl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0 et repris dans du tampon de lyse Tris-HCl 50 mM / KCl 250 mM / DTT 5 mM / EDTA 1 mM / PMSF 100 µM.

III-1-c. S12 : le substrat de l'enzyme RimO.

La protéine ribosomale S12 a pu être obtenue par nos collaborateurs de l'Université de Columbia à New York (USA), sous la forme d'une protéine fusion avec un tag protéique MBP. Un peptide mimétique de 20 acides aminés est également utilisé comme substrat pour tous les tests d'activités enzymatiques. La séquence de ce peptide est : LVRGGRVKDLPGVRYKIIRG et a pour masse molaire : 2254,76 g.mol⁻¹ (ProteoGenix, Oberhausbergen, France). Ce peptide est toujours utilisé pour les tests d'activité et l'étude spectroscopique, la protéine S12-MBP n'étant pour l'instant utilisée que pour les études de cristallogénèse.

III-2) Purification des protéines.

III-2-a. Préparation des extraits solubles de protéines.

Les cellules sont décongelées et lysées par sonication dans la glace : 4 pulses de 1 min à 5-6 d'amplitude et 20% de puissance (Sonicateur Misonix). Le lysat est ultracentrifugé pendant 1h30 à 45000 rpm (Beckman LE-806 Ultracentrifuge). Dans le cas des protéines thermophiles, le surnageant est récupéré et chauffé 15 min à 75 °C afin de faire précipiter les protéines d'*E. coli* thermosensibles qui sont ensuite éliminées par centrifugation, 20 min à 7000 g (centrifugeuse Eppendorf). Les protéines solubles sont ensuite précipitées par l'ajout de 65 % de sulfate d'ammonium (430 g.L⁻¹). La solution est centrifugée 20 min à 7000 g puis le culot est récupéré et stocké à -80°C.

III-2-b. Purification sur colonne hydrophobe Butyl-Sépharose.

Cette méthode de purification a été utilisée pour purifier les protéines RimO (sauvage et mutants), MiaB et TYW1. Le culot de protéines, obtenu par ajout de 65% de sulfate d'ammonium, est repris dans un minimum de tampon A (Tris-Cl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0 + 1 M sulfate d'ammonium) puis centrifugé 20 min à 7000 g. Le surnageant est alors chargée sur la colonne hydrophobe Butyl-Sépharose préalablement équilibrée avec le tampon A (conductivité égale à 145 mS.cm⁻¹). La colonne est ensuite lavée par 3 volumes de tampon A puis la protéine est éluée en utilisant un gradient linéaire de 0 à 100 % de tampon B (Tris-Cl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0). La protéine RimO, ses mutants, MiaB et TYW1 sont éluées entre 30 % de tampon B (conductivité de 100 mS.cm⁻¹) et 50 % de tampon B (conductivité de 70 mS.cm⁻¹). Les fractions les plus pures sont rassemblées et concentrées (cellule Amicon, YM30, Diaflo).

III-2-c. Préparation des apoprotéines.

Dans le cas des protéines Fe-S RimO, MiaB et TYW1, il est nécessaire d'effectuer une étape de démétallation pour obtenir un échantillon homogène d'apoprotéine. La solution de protéine purifiée précédemment et mise en présence de 10 mM dithionite et de 25 mM d'EDTA en boîte à gants et incubé toute une nuit à température ambiante. Après incubation, la solution de protéine a perdu sa couleur jaune, elle est alors lavée avec du tampon B par 3 cycles de dilution / concentration.

III-2-d. Purification sur colonne d'exclusion Superdex® 75.

La dernière étape de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion (Superdex 75). L'échantillon de protéine concentrée est chargé sur la colonne, préalablement équilibrée en tampon A (Tris-HCl 50 mM / KCl 250 mM / DTT 5 mM / pH 8,0). Les fractions contenant la forme monomérique de l'enzyme sont rassemblées et concentrées. La concentration en protéine est ensuite déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm et dosage par la méthode de Bradford.

III-2-e. Purification sur colonne d'affinité Ni-NTA.

Les protéines contenant une étiquette poly-histidine, comme la TEV et la T7 RNA polymérase, sont purifiées sur colonne d'affinité Ni-NTA. Après préparation des extraits solubles dans le tampon A (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0) la solution protéique est chargée sur une colonne Ni-NTA (Ni-NTA superflow, Qiagen) préalablement équilibrée dans le tampon A. Après un lavage par 3 volumes de tampon A, la protéine est éluée avec un gradient allant de 0% à 100 % le tampon B (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0 + imidazole 0,5 M). Les fractions pures obtenues sont sélectionnées par analyse sur gel SDS-PAGE 10% puis la solution de protéine est lavée par 3 cycles de dilution / concentration successifs (cellule Amicon, YM30, Diaflo) permettant d'éliminer l'imidazole avant la congélation de la protéine.

III-2-f. Purification sur colonne d'affinité Héparine.

Pour la T7 RNA polymérase, une dernière étape de purification est nécessaire afin d'utiliser cette enzyme pour réaliser la transcription *in vitro*. Une fois que l'extrait protéique est obtenu, il est injecté sur colonne Héparine, préalablement équilibrée en tampon A (Tris-HCl 50 mM / KCl 100 mM / pH 8,0 + 10% glycérol). La colonne est ensuite lavée avec 3 volume de tampon, puis la protéine est éluée en utilisant un gradient de 0% à 100% tampon B (Tris-HCl 50 mM / KCl 2 M / pH 8,0 + 10% glycérol). La pureté des fractions est déterminée par SDS-PAGE 10% et les fractions contenant la protéine pure sont regroupées, lavées par 3 cycles de dilution / concentration (cellule Amicon, YM30, Diaflo) avec du tampon A, et enfin stockées à -80°C.

III-3) Purification des ARN de transferts.

III-3-a. Extraction des ARNt.

Les bactéries qui ont été reprises dans du tampon de lyse sont lysées par voie enzymatique en utilisant du lysozyme à une concentration de 1 mg.mL^{-1} et effectuant 3 cycles de congélation/décongélation, ce traitement permet de libérer le contenu intracellulaire. L'ADN contenu dans le lysat est digéré par ajout de $0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ de solution « DNase / RNase free » commerciale et ajout de 1 mM de CaCl_2 et 10 mM de MgCl_2 . Une première ultracentrifugation est réalisée pendant 20 min à 15 000 rpm (Beckman LE-806 Ultracentrifuge), le surnageant est récupéré puis il est à nouveau ultracentrifugé 2h à 45 000 rpm. Une fois que les débris cellulaires et l'ADN sont éliminés, le surnageant est traité deux fois avec un volume de phénol saturé d'eau pour éliminer les protéines de l'échantillon. Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 min puis centrifugé 10 min à 3000 g à température ambiante pour récupérer la phase aqueuse. Le phénol contenu dans cette phase est extrait par un volume de chloroforme. Les ARNt contenus dans la solution obtenue sont ensuite précipités par l'ajout de $0,3 \text{ M}$ d'acétate de sodium pH 5,2 et 0,7 volume d'isopropanol. Le mélange est incubé au moins 1h30 à 4°C avant d'être centrifugé 20 min à 7000 g. Les culots sont rincés avec de l'éthanol 70% froid (-20°C) et laissés sécher à l'air pendant 10 min. Les ARNt sont ensuite repris dans un minimum d'eau, dosés par mesure d'absorbance à 260 nm ($1 \text{ UA} = 37 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) et stockés à -20°C .

III-3-b. Purification sur colonne d'affinité Nucleobond®.

Les ARNt qui ont été extraits sont dilués dans de l'eau pour atteindre une concentration inférieure à 1 mg.mL^{-1} . La solution est injectée sur la colonne Nucleobond® (Macherey-Nagel) ayant déjà été équilibrée en tampon A (Tris- H_3PO_4 100 mM / KCl 400 mM / pH 6,3 / Ethanol 15%). La colonne est lavée avec 5 volumes de tampon A puis les ARNt sont élués par 100% de tampon B (Tris- H_3PO_4 100 mM / KCl 650 mM / pH 6,3 / Ethanol 15%). Les fractions contenant les ARNt sont alors rassemblées et précipitées par ajout de $0,3 \text{ M}$ d'acétate de sodium pH 5,2 et 0,7 volume d'isopropanol suivies d'une incubation à 4°C pendant 1h30 minimum. Le mélange est ensuite centrifugé 20 min à 7000 g, les culots sont rincés par de l'éthanol 70% froid et laissés sécher 10 min à l'air. Une fois repris dans un minimum d'eau, ils sont dosés par spectroscopie et stockés à -20°C . La colonne Nucleobond

peut être régénérée par lavage avec 5 volumes d'une solution de KCl à 2,5 M suivie de la rééquilibration dans le tampon initial. Une colonne peut être utilisée pour 3 à 4 purifications.

III-3-c. Purification sur colonne d'hydroxyapatite-céramique.

La solution d'ARNt obtenu subit une autre étape de purification sur colonne d'hydroxyapatite-céramique (CHT20-I, BioRad) équilibrée avec 75% de tampon A (phosphate de potassium 10 mM / pH 6,5) et 25% de tampon B (phosphate de potassium 500 mM / pH 6,5). Après chargement, la colonne est lavée avec 3 volumes de ce tampon, un gradient allant de 25% à 50 % de tampon B permet d'éluer les ARNt. Les fractions d'intérêt sont digérées et analysées par HPLC (Agilent 1100) sur colonne C18. La quantité d'⁶A détectée par rapport à la quantité totale d'ARNt injectée permet de calculer l'enrichissement en ARNt^{Phe}. Les fractions enrichies (65-85 %) sont rassemblées et utilisées lors des tests enzymatiques, spectroscopiques et expériences de cristallogénèse.

III-4) Reconstitution des centres [4Fe-4S] de protéines thermophiles.

III-4-a. Réaction de reconstitution en conditions anaérobies.

Les centres [4Fe-4S] des différentes protéines étudiées sont reconstitués en boîte à gants sous atmosphère inerte ($[O_2] < 2$ ppm) à température ambiante. Le milieu réactionnel contient 120 μ M d'apoprotéine dans du tampon (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0). Puis sont ajoutés 2 mM de DTT, 10 équivalents de Fe^{II} (Sel de Möhr : $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), 12 équivalents de L-cystéine et 3 μ M de cystéine désulfurase A (CsdA) d'*E. coli*. La réaction de reconstitution est suivie par spectroscopie UV-visible depuis l'intérieur de la boîte à gants grâce à des fibres optiques reliant la cellule de lecture (trajet optique : 1 mm) à un spectrophotomètre UV-Visible (Uvicon XL, Bio-Tek instruments). Les centres [4Fe-4S] reconstitués par cette méthode se trouvent à l'état oxydé, ils présentent une bande d'absorbance caractéristique à 400 nm (transfert de charge S \rightarrow Fe) qui permet de contrôler leur formation. Lorsque la solution atteint un rapport d'absorbance 400 nm / 280 nm = 0,32-0,33, la réaction est arrêtée et la solution est chargée sur une colonne de dessalage (NAP-25), préalablement équilibrée en tampon. Cette colonne permet d'éliminer les molécules de faible poids moléculaire (cystéine, alanine, DTT, Fe^{II}). La solution protéique de couleur brune est

concentrée par centrifugation sur membrane (30 kDa Vivaspin 500, Sartorius stedim). Les caractéristiques d'absorption UV-visible des enzymes constituant les objets d'étude de ce rapport sont détaillées ci-dessous (Tableau III-4-a).

	ϵ 280 nm apoprotéine ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϵ 280 nm holoprotéine ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϵ 400 holoprotéine ($M^{-1}.cm^{-1}$)
RimO	50 000	100 000	35 000
MiaB	65 000	90 000	35 000
TYW1	50 000	115 000	35 000

Tableau III-4-a : Coefficients d'extinction molaire des bandes d'absorbance caractéristiques de RimO, MiaB et TYW1 sous la forme *apo* et *holo*.

Dans les cas où l'échantillon doit être analysé par spectroscopie Mössbauer, il est nécessaire de réaliser la reconstitution des centres [4Fe-4S] en utilisant l'isotope de Fer ^{57}Fe . Pour préparer la solution de Fer, le ^{57}Fe métal est lavé avec CHCl_3 et dissout dans une solution de H_2SO_4 (2N) par chauffage à 60°C en conditions anaérobies en respectant la stoechiométrie de 5 moles de H_2SO_4 pour 1 mole de ^{57}Fe (Lee et al. 2009). Une fois complètement dissout, le Fer dans la solution est dosé pour déterminer la concentration exacte avant de l'utiliser pour la reconstitution.

III-4-b. Purification des protéines reconstituées.

Les holoprotéines étudiées étant thermophiles, elles ont été chauffées pendant 1h à 65°C dans le tampon de reconstitution (Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, pH 8,0) auquel on a ajouté 10 mM de DTT. Puis elles sont chargées sur colonne de dessalage (NAP-25) avant d'être purifiées par gel filtration sur colonne Superdex 75 ou seul le pic de protéine monomérique est récupéré et concentré par centrifugation sur membrane. L'holoprotéine pure et concentrée est dosée par mesure de l'absorbance à 280 et 400 nm puis elle est congelée et stockée dans l'azote liquide.

III-4-c. Réduction chimique des protéines reconstituées.

Les centres [4Fe-4S] des *holo*-enzymes reconstituées sont réduits par ajout de 10 équivalents de dithionite. La réaction est réalisée dans le même tampon que celui utilisé lors de la reconstitution (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0) à température ambiante. La réduction peut être suivie par spectroscopie UV-visible.

III-5) Dosages biochimiques.

III-5-a. Dosage de protéines.

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique classiquement utilisée pour le dosage des protéines. L'échantillon à doser est dilué 100 fois dans du réactif de Bradford (Biorad) dilué 5 fois. Après une incubation de 5 min à température ambiante, l'absorbance à 595 nm est mesurée. La concentration est ensuite déterminée par comparaison avec une gamme de calibration réalisée avec la protéine BSA (albumine de sérum bovin) Dans le cas de RimO, MiaB et TYW1, il a été observé que le dosage de Bradford donnait une concentration surestimée de 20 à 30% par rapport à la concentration réelle.

III-5-b. Dosage de Fer

La quantité de Fer est dosée par la méthode de Fish (Fish et al. 1988). Pour établir la courbe étalon, une solution commerciale de Fe^{II} (1005 µg/mL, Aldrich) diluée au 36ième permet d'obtenir une solution de référence à 500 µM de Fe^{II} et de réaliser une gamme de référence contenant 0, 2, 4, 6, 8 et 10 nmoles de Fer dans un volume final de 65µL. De la même manière, différentes quantités de protéines, entre 0,5 et 2 nmoles, sont mises en solution dans un volume final de 65 µL. Les solutions sont dénaturées par incubation avec 45 µL d'acide perchlorique 1M pendant 1 h. Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min, 90 µL de solution sont prélevés auxquels sont ajoutés 72 µL de batho-phénanthroline disulfonate (1,7 mg/mL), 36 µL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 µL d'acétate d'ammonium (solution saturée diluée au 1/3). Après 30 min d'incubation à température ambiante la différence d'absorbance DO₅₃₅-DO₆₈₀ est mesurée par spectrophotométrie UV-visible (Shimadzu, UV-1800). Une courbe étalon est générée à partir de la gamme standard de Fer ce qui permet d'obtenir la quantité de Fer par monomère d'enzyme.

III-5-c. Dosage du Soufre.

Le Soufre est dosé par la méthode de Beinert (Beinert et al. 1983). Du sulfure de sodium (Na_2S , $9\text{H}_2\text{O}$, $M = 240 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) est pesé puis dissout à 100 mM dans de la soude 1M. Une solution à 200 μM est obtenue à partir de cette solution stock. Des standards de 0, 2, 4, 6, 8 et 10 nmoles sont préparés dans un volume final de 100 μL . Les mêmes quantités de protéines que celles utilisés pour le dosage du Fer sont préparées dans un volume final de 100 μL . Le protocole consiste à dénaturer pendant 3 h la protéine par l'ajout simultané de 300 μL d'acétate de zinc 1% et de 15 μL de soude 3 M provoquant la précipitation immédiate et simultanée d'hydroxyde et de sulfure de zinc. Après l'étape de dénaturation, les échantillons sont traités par l'ajout simultané de 75 μL de DMPD (1 mg/mL, HCl 5N) et de 16 μL de FeCl_3 (3,75 mg/mL, HCl 1N) conduisant à la formation lente de bleu de méthylène. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance $\text{DO}_{670}\text{-DO}_{850}$ est mesurée par spectrophotométrie UV-visible (Shimadzu, UV-1800). La quantité de Soufre par monomère d'enzyme est obtenue en rapportant l'absorbance à celle de la droite standard générée grâce à la gamme étalon.

III-6) Transcription *in vitro*.

III-6-a. Préparation de l'ADN matrice.

La séquence d'ADN utilisée comme matrice par la T7 RNA polymérase pour réaliser la transcription peut être obtenue de deux manières différentes. La première méthode est d'utiliser un vecteur plasmidique contenant la séquence codante pour l'ARNt voulu et précédée par la séquence promotrice T7. Ce plasmide est produit et purifié en grande quantité grâce à l'utilisation d'un vecteur multi-copie, le plasmide pUC57. Ce dernier, une fois purifié, est linéarisé par digestion enzymatique grâce à un site de restriction placé juste après la séquence codante de l'ARNt, il peut alors être utilisé comme matrice d'ADN lors de la transcription *in vitro*. La seconde méthode consiste à utiliser une séquence matrice synthétique qui est disponible commercialement (Eurogentec). Comme pour le plasmide, cette séquence d'ADN contient une partie codante pour l'ARNt et la séquence de la partie promotrice T7. Pour que le système soit fonctionnel, il faut également disposer de la séquence

complémentaire pour la partie promotrice T7 (Eurofins). La T7 RNA polymérase ne la reconnaît que sous la forme double brin.

III-6-b. Réaction de transcription *in vitro*.

Les transcrits *in vitro* étant très sensibles à la dégradation, ils doivent être manipulés dans des conditions dites « RNases-free » strictes. La réaction de transcription s'effectue dans un volume réactionnel n'excédant pas 500 µL par tube. Ce volume contient un tampon (Tris-HCl 40 mM / MgCl₂ 20 mM / DTT 5 mM / Spermidine 1 mM / TritonX100 0,01% / pH 8,1) et les quatre ribonucléosides triphosphates (NTP) à une concentration de 4 mM. La matrice d'ADN est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 0,6 µM. Puis 10 000 U (8,3 µg) de T7 RNA polymérase sont ajoutés pour démarrer la réaction. Cette dernière est incubée 5h à 37°C sous agitation, et au bout d'environ 1h un précipité blanc de pyrophosphate apparaît au fond du tube, témoin positif de la réaction. A la fin de la réaction, les produits sont contrôlés par une analyse sur gel de polyacrylamide 10% contenant 8 M d'urée, puis les transcrits sont stockés à -20°C.

III-6-c. Purification des transcrits.

Les transcrits *in vitro* néo-synthétisés sont extraits deux fois avec un volume de phénol suivi par une extraction avec un volume de chloroforme. Les ARNt sont précipités par l'ajout de 0,3 M d'acétate de sodium pH 5,2 et d'un volume d'isopropanol puis incubé au moins 1h30 à 4°C. Les transcrits précipités sont centrifugés 20 min à 7000 g, le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans un volume minimum d'eau stérile. Les ARNt sont ensuite renaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min, refroidissement lent, ajout de MgCl₂ 10 mM et incubation de 2h minimum à température ambiante. Cette étape permet aux ARNt de se replier pour obtenir leur structure native. Les ARNt sont purifiés grâce à une colonne Nucléobond, les fractions contenant les transcrits purs sont précipités à l'isopropanol, centrifugés 20 min à 7000 g puis repris dans un minimum d'eau avant d'être une nouvelle fois renaturés. La dernière étape de purification se fait sur colonne de gel filtration Superdex 75 qui permet de sélectionner les ARNt ayant le bon repliement, les fractions pures sont rassemblées et précipitées à l'isopropanol. Les culots obtenus après centrifugation sont enfin repris dans un volume minimum d'eau, les ARNt sont dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 UA = 37 µg.mL⁻¹) et stockés à -20°C.

III-7) Tests d'activités enzymatiques.

III-7-a. Tests d'activités avec RimO, MiaB et TYW1.

Dans le cas des trois protéines thermophiles RimO, MiaB et TYW1 qui contiennent chacune deux centres [4Fe-4S], les tests d'activités sont effectués en boîte à gants sous atmosphère inerte d'azote dans un milieu tamponné (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / pH 8,0). Les conditions réactionnelles relatives à chaque enzyme sont détaillées dans les trois tableaux suivants (Tableaux III-7-a-1, III-7-a-2 et III-7-a-3).

	<i>holo</i> -RimO	Peptide-S12	SAM	Dithionite
Concentrations	1 μ M	15 μ M	150 μ M	2 mM

Tableau III-7-a-1 : Conditions des tests d'activité enzymatique de l'*holo*-enzyme RimO.

	<i>holo</i> -MiaB	ARNt	SAM	Dithionite
Concentrations	1 μ M	30 μ M	150 μ M	2 mM

Tableau III-7-a-2 : Conditions des tests d'activité enzymatique de l'*holo*-enzyme MiaB.

	<i>holo</i> -TYW1	ARNt	SAM	Pyruvate	Dithionite
Concentrations	20 μ M	50 μ M	200 μ M	2 mM	2 mM

Tableau III-7-a-3 : Conditions des tests d'activité enzymatique de l'*holo*-enzyme TYW1.

Dans chacun des cas, le milieu réactionnel est incubé pendant 1h à 65°C, puis la réaction est arrêtée par ajout de 5 μ L d'une solution de formiate 3,5 M pH 4,2. Après 10 min d'incubation le milieu réactionnel est centrifugé 10 min à 7000 g puis analysé par HPLC (Agilent 1100) avec une colonne C18. Dans le cas de MiaB et TYW1 une étape de digestion des ARNt est nécessaire avant d'effectuer l'analyse.

III-7-b. Tests d'activité avec MiaA et TRM5.

Dans le cas de MiaB et TYW1 la modification post-transcriptionnelle qu'elles catalysent a lieu sur un substrat qui a déjà été modifié par une première enzyme. Le substrat qui est reconnu par MiaB contient un groupement isopentényle en position 6, qui est introduit par l'enzyme MiaA (produite et purifiée par le Dr. Fabien Pierrel lors de sa thèse). Pour le substrat modifié par TYW1, il contient un groupement méthyle en position 1, introduit ici par l'enzyme TRM5 (produite et purifiée par le Dr. Phanélie Perche-Letuvée). Lorsque des transcrits *in vitro* sont utilisés pour tester l'activité de MiaB ou TYW1, il est donc indispensable qu'ils soient modifiés pour qu'ils soient reconnus comme substrats. L'enzyme MiaA est issu d'*E. coli* et l'enzyme TRM5 de *P. abyssi*, un organisme thermophile, elles ne nécessitent pas de travailler sous atmosphère contrôlée, mais seulement en milieu tamponné (Tris-HCl 50 mM / KCl 50 mM / DTT 2 mM / MgCl₂ 5 mM / pH 8,0). Comme précédemment, les conditions expérimentales sont détaillées ci-dessous (Tableaux III-7-b-1 et III-7-b-2).

	MiaA	ARNt	DMAPP
Concentrations	5 µM	100 µM	1 mM

Tableau III-7-b-1 : Conditions des tests d'activité enzymatique de l'enzyme MiaA. (DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate).

	TRM5	ARNt	SAM
Concentrations	25 µM	50 µM	500 µM

Tableau III-7-b-1 : Conditions des tests d'activité enzymatique de l'enzyme TRM5.

Une fois le milieu réactionnel préparé, il est mis à incuber pendant une nuit à 37°C pour MiaA ou 55°C pour TRM5 sous agitation. Les ARNt sont ensuite purifiés par deux extractions avec un volume de phénol et une extraction avec un volume de chloroforme, suivies par une précipitation en ajoutant 0,3 M d'AcNa pH 5,2, un volume d'isopropanol et une incubation d'au moins 1h30 à 4°C. Les ARNt sont ensuite isolés par centrifugation pendant 20 min à 7000 g et repris dans de l'eau. Un échantillon est prélevé après chaque test

pour être digéré et analysé par HPLC (Agilent 1100) dans le but d'estimer le rendement de la réaction. Les ARNt modifiés sont enfin stockés à -20°C.

III-7-c. Digestion des ARNt.

La quantité d'ARNt digérée peut varier selon les expériences entre 20 µg et 50 µg d'ARNt contenu dans 100 µL. La première étape de la digestion consiste à ajouter 0,1 mM de Zn(OAc)₂, 2 U de Nucléase P1 et 0,5 U de phosphodiesterase II (ces conditions permettent une digestion complète jusqu'à 100 µg d'ARNt). Les échantillons sont incubés une nuit à 37 °C, puis la solution est amenée à pH basique par l'ajout de 10 µL de tampon alcalin (Tris-HCl 1 M / pH 8,0) et traités pendant 3 h à 37°C par 2 U de phosphatase alcaline et 0,3 U de phosphodiesterase I. Après centrifugation (10 min, 13000 rpm), les nucléosides sont analysés sur colonne C18 par HPLC en utilisant soit le gradient « court » soit le gradient « long » décrit ci-après.

III-7-d. Formation de complexe enzyme/substrat/co-substrat.

Dans le cadre de l'étude de cristallogénèse réalisée en collaboration avec le Dr. Farhad Forouhar et le Pr. John Hunt à l'Université de Columbia (USA), des complexes enzyme/substrat/co-substrat ont été produits avec les *holo*-enzymes RimO et MiaB. Dans les deux cas la phase de complexation est faite dans les mêmes conditions, 15 µM d'enzyme sont incubés avec 1,2 équivalent molaire de substrat et 10 équivalents molaires de co-substrat SAM dans une solution tamponnée (Tris-HCl 10 mM / KCl 10 mM / pH 8,0). L'incubation dure entre 15 et 17 h à 37°C en boîte à gants sous atmosphère inerte. Les complexes formés sont ensuite concentrés sur membrane et purifiés par chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex 75, puis à nouveau concentrés. Dans le cas de RimO, une étape supplémentaire est nécessaire car le substrat utilisé contient une étiquette MBP. Le complexe RimO/MBP-S12D89/SAM est dilué pour obtenir une concentration de 15 µM, 2 mM de DTT et 10% (w/w) de TEV sont ajoutés puis la solution est incubée pendant une nuit à température ambiante. Le clivage par la TEV est contrôlé par gel SDS-PAGE 10%. Une fois la réaction terminée, le complexe est à nouveau purifié sur colonne Superdex 75 et concentré. Les complexes enzyme/substrat/co-substrat ainsi produits sont stockés dans l'azote liquide.

IV – Techniques analytiques.

IV-1) Chromatographie liquide haute performance (HPLC).

IV-1-a. Analyse HPLC du peptide-S12.

Le peptide mimétique utilisé comme substrat de l'enzyme RimO peut être directement analysé par injection sur colonne C3 en HPLC couplé à la détection UV-visible. Les conditions d'analyse ont été déterminées par les Dr. Thierry Douki et Simon Arragain. La colonne C3 est équilibrée avec 0,1% d'acide formique, après l'injection de l'échantillon, un gradient de 0% à 30% d'acétonitrile-acide formique 0,1% en 30 minutes est appliqué suivi d'un lavage isocratique à 60% d'acétonitrile-acide formique 0,1% pendant 5 min. Le substrat et le produit thiométhylé sont alors séparés lors de l'élution et détectés par suivi de l'absorbance à 232 nm (temps de rétention respectifs : substrat 17,0 min et produit 17,4 min). Les quantités de produit et de substrat présents dans l'échantillon après réaction sont déterminées grâce à l'utilisation d'une gamme étalon établie avec le peptide-S12 non modifié (Figure IV-1-a).

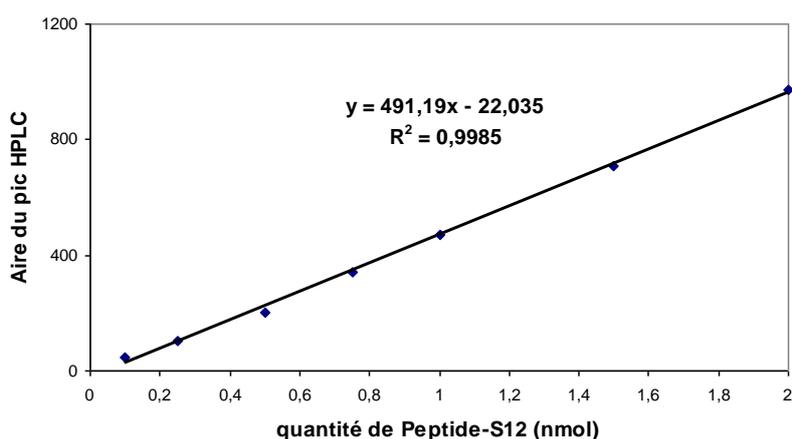


Figure IV-1-a : Courbe d'étalonnage HPLC pour la quantification du peptide-S12. La gamme standard utilisée a été obtenue en utilisant une solution de départ contenant 1 mM de peptide-S12 commercial. Détermination du facteur de réponse UV-visible à 232 nm (Aire du pic détecté) en fonction de la quantité de peptide-12.

IV-1-b. Analyses HPLC des ARNt.

Les paramètres d'une analyse très résolutive des modifications d'acides nucléiques ont été publiés (Gehrke et al. 1989). Trois tampons sont nécessaires pour séparer correctement les différents nucléosides modifiés présents dans les ARNt : le tampon A (2,5% Méthanol, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 5,3), le tampon B (20% Méthanol, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 5,1) et le tampon C (35% Acétonitrile, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 4,6). Le pH des solutions aqueuses est contrôlé (HI9321 Microprocessor pH meter, HANNA Instruments) et ajusté par ajout de quelques gouttes de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (100 mM, pH 7,8). Les solvants (méthanol ou acétonitrile) sont ajoutés après filtration des solutions aqueuses (membrane de 0,2 μm). Deux types de gradients sont décrits dans l'article de Gehrke et al. Le premier appelé « court » (75 min) permet l'analyse des nucléosides modifiés sur colonne Zorbax SBC18 (5 μm , 4,6 x 250 mm). Ce gradient « court » est utilisé pour l'analyse des tests enzymatiques *in vitro* de MiaB. Les deux nucléosides modifiés $i^6\text{A}$ et $ms^2i^6\text{A}$ sont élués tardivement (48 min et de 56 min respectivement). Pour le gradient dit « long » (95 min), les nucléosides $i^6\text{A}$ et $ms^2i^6\text{A}$ sont élués à 71 min et 85 min respectivement. La quantification se fait grâce à une courbe de calibration (effectuée par le Dr. Etienne Mulliez) qui permet de relier l'aire des pics d'absorbance à 260 nm à la quantité injectée (Tableau IV-1-b-1).

Nucléotide	Facteur de réponse
$i^6\text{A}$	$n_{i^6\text{A}} \text{ (nmol)} = (1,24 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire} + 5,27 \cdot 10^{-3}$
$ms^2i^6\text{A}$	$n_{ms^2i^6\text{A}} \text{ (nmol)} = (1,52 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire}$

Tableau IV-1-b-1 : Facteurs de réponse de détection UV-visible à 260 nm pour l'analyse HPLC des nucléotides $i^6\text{A}$ et $ms^2i^6\text{A}$.

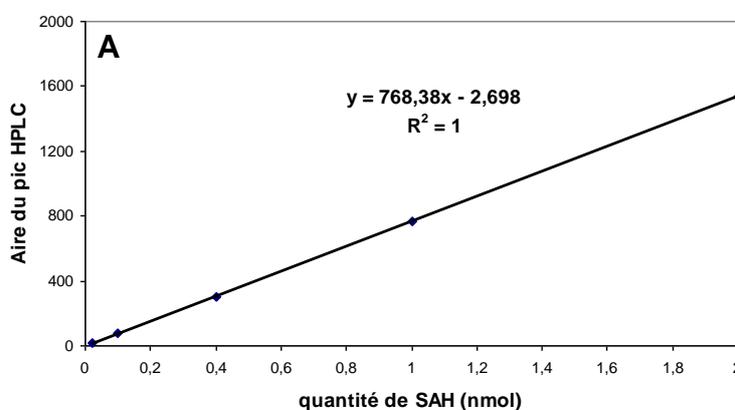
Dans le cas des transcrits *in vitro*, l'analyse HPLC permet également de vérifier la composition des ARNt. Les nucléotides sont élués selon l'ordre suivant C, U, G et A à des temps de rétention respectivement de 7 min, 10 min, 19 min et 25 min pour le gradient court, ou 8 min, 13 min, 28 min et 38 min pour le gradient long. La quantification est faite grâce à un étalonnage de la détection UV-visible (Tableau IV-1-b-2).

Nucléotide	Facteur de réponse
Cytosine	$n_C \text{ (nmol)} = (2,67 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire} - 0,529$
Uracile	$n_U \text{ (nmol)} = (1,97 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire} + 0,073$
Guanine	$n_G \text{ (nmol)} = (1,67 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire} - (4,84 \cdot 10^{-3})$
Adénine	$n_A \text{ (nmol)} = (1,14 \cdot 10^{-3}) \times \text{Aire} + 0,217$

Tableau IV-1-b-2 : Facteurs de réponse de détection UV-visible à 260 nm pour l'analyse HPLC des nucléotides C, U, G et A.

IV-1-c. Analyses HPLC des sous-produits de réaction.

Les réactions étudiées ici donnent lieu à la formation de deux sous-produits réactionnels, la S-adénosyl-homocystéine (SAH) et le 5'-désoxyadénosine (AdoH), issus de l'utilisation de la SAM. Ces composés peuvent être directement analysés par injection sur colonne C18 en HPLC couplée à la détection UV-visible. Les conditions d'analyse ont été déterminées par les Dr. Etienne Mulliez et Simon Arragain. La colonne C18 est équilibrée avec 0,1% TFA, après l'injection de l'échantillon, un gradient de 0% à 10% d'acétonitrile-TFA 0,1% en 15 min est appliqué suivi d'un autre gradient de 10% à 100% d'acétonitrile-TFA 0,1% en 5 min avant un lavage isocratique à 100% d'acétonitrile-TFA 0,1% pendant 5 min. La quantification est basée sur l'utilisation de gammes d'étalonnage reliant l'aire du pic d'absorbance à 260 nm à la quantité en nmoles injectée (Figure IV-1-c).



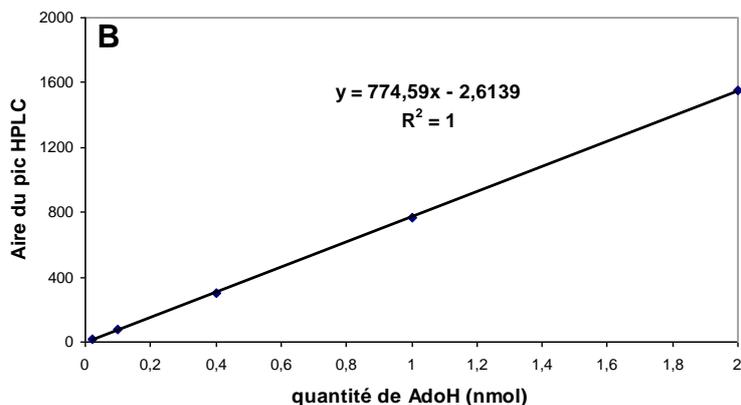


Figure IV-1-c : Courbes d'étalonnages HPLC pour la quantification de SAH (A) et AdoH (B). La gamme standard utilisée a été obtenue en utilisant des produits commerciaux. Détermination du facteur de réponse UV-visible à 260 nm (Aire du pic détecté) en fonction de la quantité de SAH ou AdoH.

IV-2) Spectrométrie de masse.

IV-2-a. Analyses du peptide mimétique S12.

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'analyse HPLC couplée à la détection UV-Visible, les échantillons sont également injectés en spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap XL Thermo Fischer scientifique). Ces analyses LC-MS/MS sont réalisées en collaboration avec Sylvie Kieffer-Jaquinot (Laboratoire EdyP). Cette technique utilise une ionisation par spray d'électron (ESI) et une détection orbitrap permet d'estimer aussi la quantité de produit détecté grâce à l'utilisation d'un étalon interne.

IV-2-b. Analyses des nucléotides.

Après digestion les ARNt peuvent être analysés par HPLC (Agilent) couplée à la spectrométrie de masse MS/MS (API 3000, PerkinElmer Life Sciences). L'ionisation se fait par ESI et la détection par triple quadripôle. Ces analyses sont effectuées en collaboration avec le Dr. Jean-Luc Ravanat (INAC, CEA-Grenoble). Elles sont notamment utilisées pour la détection de nucléotides ayant été marqués par différents isotopes.

V – Techniques spectroscopiques.

V-1) La spectroscopie UV-visible.

La spectroscopie UV-visible est basée sur le principe d'absorption d'un photon d'une énergie définie par une espèce qui passe d'un état électronique fondamental S_0 à un état excité S_1 . L'énergie d'une onde lumineuse dépend de sa fréquence ν et peut être calculée en multipliant la fréquence par la constante de Planck h ($E = h\nu$). Pour qu'il y ait absorption d'un photon il faut que son énergie corresponde à l'écart d'énergie qui existe entre les deux états électroniques S_0 et S_1 de l'espèce qui absorbe. Cette transition électronique peut se produire sur un atome seul, comme les transitions $d \rightarrow d$, $\pi \rightarrow \pi^*$ et $\sigma \rightarrow \sigma^*$, ou bien concerner deux atomes liés, c'est notamment le cas des transferts de charge ligand-métal et métal-ligand. L'absorption d'un échantillon donné permet de calculer sa concentration grâce à la loi de Beer-Lambert : $A = \log(I_0/I) = \epsilon lc$ (avec I_0 : l'intensité de l'onde incidente, I : l'intensité de l'onde en sortie, ϵ : le coefficient d'extinction molaire, l : la longueur du trajet optique de l'échantillon et c : la concentration de l'espèce absorbante). Dans le cas des protéines, l'absorption observée à 280 nm correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Pour les centres Fe-S, le transfert de charge du Soufre vers le Fer provoque une absorption comprise entre 300 et 650 nm, valeur qui varie en fonction de la nature du centre Fe-S.

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique avec un spectrophotomètre UV-Visible Shimadzu UV-1800 en aérobiose et par un spectrophotomètre UV-visible Bio-Tek Uvikon XL en boîte à gant sous atmosphère contrôlée d'azote.

V-2) La spectroscopie RPE en onde continue (CW).

La résonance paramagnétique électronique est une technique spectroscopique d'absorption d'une onde électromagnétique par une espèce paramagnétique qui est soumise à un champ magnétique. L'électron possède un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par un nombre quantique de spin dont les valeurs propres $\pm 1/2$ correspondent aux deux orientations qu'il peut prendre dans un champ magnétique, l'une parallèle, l'autre antiparallèle

au champ. Deux niveaux énergétiques en résultent, niveaux entre lesquels des transitions peuvent être induites. La séparation en deux niveaux d'énergie lorsqu'un champ magnétique est appliqué s'appelle l'effet Zeeman. Le but de la résonance paramagnétique électronique RPE est précisément d'étudier ces transitions. Classiquement, l'onde électromagnétique utilisée pour réaliser ces transitions est en bande X (autour de 9,4 GHz). Pour enregistrer un spectre RPE, l'onde est fixée et on fait varier l'intensité du champ magnétique, ce qui provoque une variation de l'écart entre les niveaux d'énergie de l'électron. En fonction de la valeur du champ pour lequel on a absorption de l'onde, on peut déterminer des valeurs tensorielles g_x , g_y et g_z qui sont caractéristiques de chaque système. L'onde de fréquence fixe est réglée pour stationner dans la cavité dans laquelle se trouve l'échantillon. Dès que le champ atteint une intensité permettant à l'échantillon d'absorber une partie de l'onde le régime stationnaire est perturbé ce qui entraîne une transmission partielle de l'onde présent dans la cavité et donc qui peut être détectée (Figure V-2).

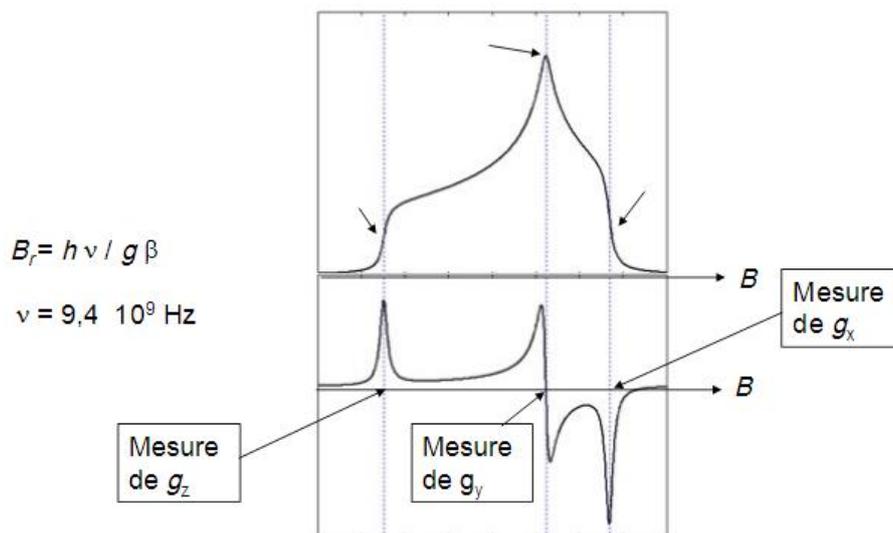


Figure V-2 : Signal d'absorption RPE CW en bande X avec visualisation des valeurs tensorielles de g . Représenté en haut : le signal de l'onde détecté à la sortie de la cavité, en bas : le spectre dérivé du premier signal RPE.

Pour l'étude des centres Fe-S cette technique est utilisée pour analyser les centres à l'état réduit, elle renseigne sur le type de centre, son état de spin, la symétrie et la composition du système ou encore le taux de réduction.

Au laboratoire, les expériences de RPE sont réalisées en collaboration avec le Dr. Serge Gambarelli sur des échantillons contenant 80 μL à une concentration supérieure ou égale à 150 μM . Les spectres RPE sont enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP 300E équipé d'un cryostat à hélium liquide (Oxford instrument) pour descendre en température (jusqu'à 4K environ). Les échantillons à analyser sont préparés sous atmosphère inerte d'azote avant d'être congelés, puis ils sont mis sous atmosphère d'hélium avant l'analyse. Les quantifications de spin sont réalisées à l'aide d'une référence d'un volume de 80 μL contenant CuSO_4 1 mM, EDTA 10 mM et du tampon (Tris-HCl 100 mM / pH 8,0). Pour les protéines [4Fe-4S] les spectres sont enregistrés à 10K, dans des conditions non saturantes avec un balayage en champ de 2500 G à 4500 G.

V-3) La spectroscopie RPE en onde pulsée HYSCORE.

La spectroscopie RPE HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation) permet de visualiser les couplages hyperfins entre un centre métallique $[4\text{Fe-4S}]^+$ paramagnétique et des espèces proches possédant un spin nucléaire non nul, comme par exemple : ^1H , ^2N , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N ou encore ^{77}Se . Le détail du fonctionnement de la spectroscopie HYSCORE est décrit dans l'article. Cette technique est basée sur l'analyse du retour à l'équilibre du spin électronique de l'espèce paramagnétique étudiée après une perturbation. Cette espèce est d'abord placée dans un champ magnétique défini (classiquement, pour une espèce ayant un spin $\frac{1}{2}$ on applique le champ pour lequel on observe la réponse maximale par RPE en onde continue). Le système est alors soumis à une série d'impulsions d'une onde électromagnétique de très forte puissance qui va perturber l'orientation du spin électronique de l'espèce analysée. Puis c'est le retour à l'équilibre qui va être enregistré et analysé après transformée de Fourier 2D ce qui permet de visualiser les couplages hyperfins entre le spin électronique et les éventuelles espèces possédant un spin nucléaire non nul se trouvant à proximité. La spectroscopie HYSCORE permet donc de mettre en évidence la présence d'un ligand en interaction faible avec le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ qui apparaît dans le cadran noté (+,+) (Figure V-3(a)) ou un ligand en interaction forte avec le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ dans le cadran noté (-,+) (Figure V-3(b)). La séquence d'impulsions HYSCORE est détaillée ci-dessous (Figure V-3(c)) ainsi que les diagrammes des différents niveaux d'énergie associés respectivement à un couplage faible et à un couplage fort (Figures V-3(d) et V-3(f)).

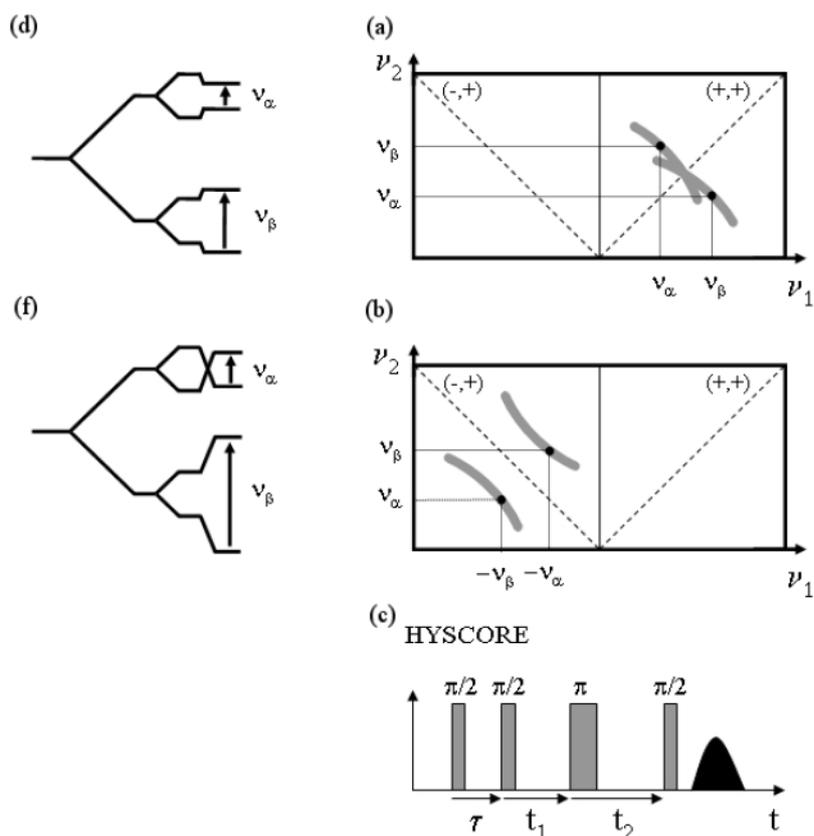


Figure V-3 : Spectroscopie RPE HYSCORE (système $I = 1/2$ et $S = 1/2$). Un couplage faible (a) est observé dans le cadran (+,+) avec son diagramme de niveau d'énergie correspondant (d). Un couplage fort (b) est observé dans le cadran (-,+) avec son diagramme de niveau d'énergie correspondant (f). La séquence HYSCORE utilisée est représentée schématiquement en (c).

V-2) La spectroscopie Mössbauer.

La spectroscopie Mössbauer a été réalisée en collaboration avec les Dr. Ricardo Garcia et Martin Clemancey de la même équipe PMB du laboratoire CBM. La spectroscopie Mössbauer est une spectroscopie d'absorption des rayons γ entre noyaux possédant le même nombre de masse (^{57}Fe , ^{57}Co). Elle repose sur l'effet Zeeman qui induit la formation de plusieurs états d'énergie différente lorsqu'on applique un champ magnétique. Cette technique permet la détection des différents états de spin du ^{57}Fe dans un échantillon biologique grâce à l'utilisation d'une source radioactive de ^{57}Co . Cette analyse spectroscopique a été utilisée pour caractériser les centres [Fe-S] présents dans l'*holo*-enzyme RimO. Lors de l'expérience, l'échantillon est soumis à un champ magnétique intense et l'on observe pour l'état excité une

levée de dégénérescence dont la valeur correspond à l'éclatement quadripolaire ΔE_Q exprimé en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. L'autre paramètre obtenu est le déplacement isomérique, noté δ , qui s'exprime en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et est corrélé au degré d'oxydation du Fer présent dans l'échantillon (Figure V-4). Pour le déplacement isomérique au sein des centres [4Fe-4S], les valeurs classiquement obtenues sont : $\delta\text{Fe}^{2+} = 0,81 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ / $\delta\text{Fe}^{2,5+} = 0,53 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ / $\delta\text{Fe}^{3+} = 0,35 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

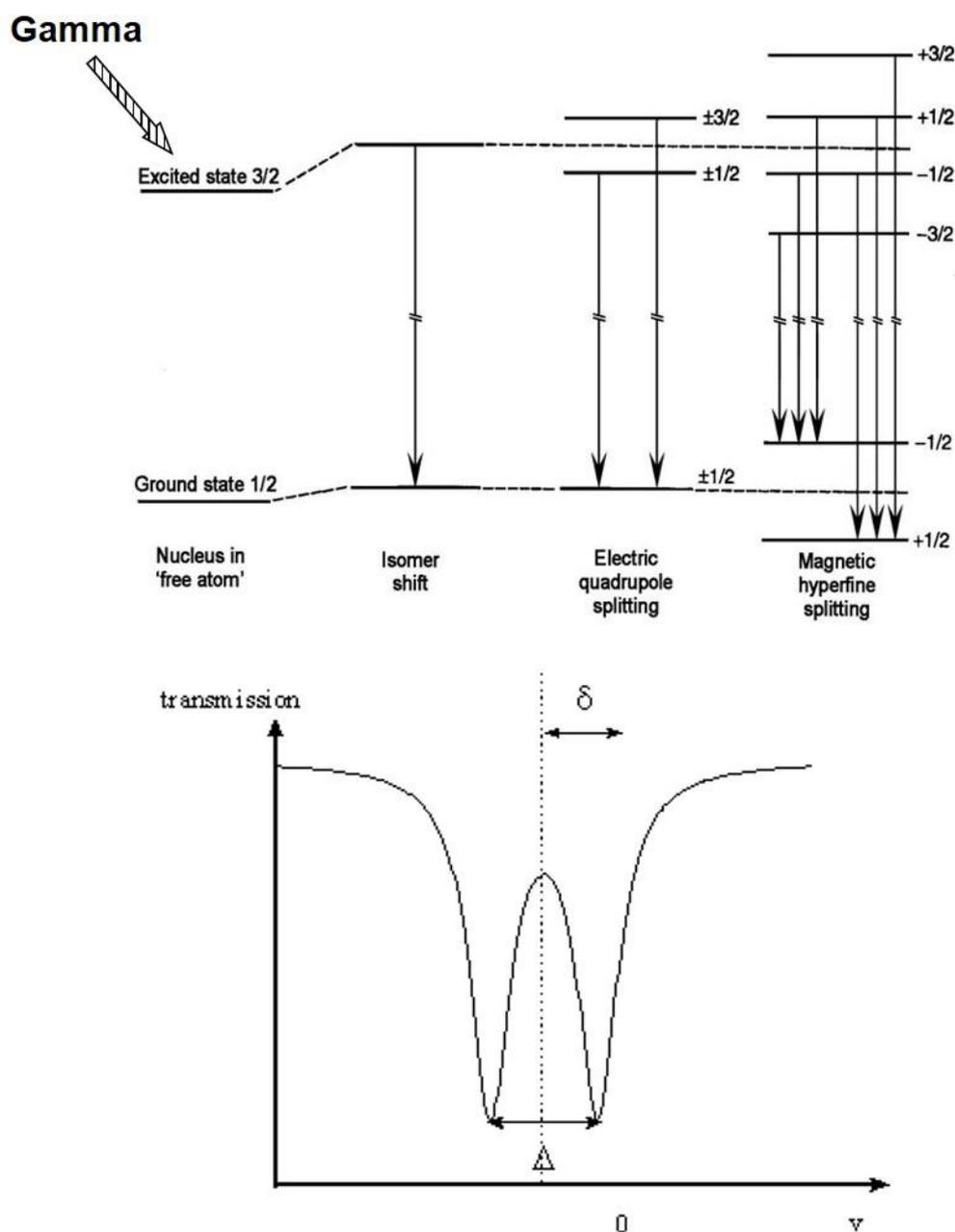


Figure V-4 : Spectroscopie Mössbauer. Représentation des différents états de spin et d'énergie du ^{57}Fe en présence d'un champ magnétique. Visualisation de transitions énergétiques enregistrées par spectroscopie Mössbauer.

VI – Synthèses bio-organiques et organiques.

VI-1) Biosynthèse et purification de la SAM.

La biosynthèse de la SAM est réalisée grâce à l'utilisation de la SAM-synthétase. Après surexpression dans *E. coli*, les extraits bruts de protéine sont isolés et peuvent être utilisés directement, sans purification, pour réaliser la biosynthèse. La réaction est effectuée dans un volume de 50 mL tamponné (Tris-HCL 100 mM / KCl 50 mM / MgCl₂ 30 mM / 2-mercaptoéthanol 8% / pH 8,7) contenant 750 μmol d'ATP, 500 μmol de méthionine, 15 mg de SAM-synthétase et 100 U de pyrophosphatase (Sigma-Aldrich). La réaction est incubée à 4°C sous agitation et suivi par mesure HPLC (Figure VI-1).

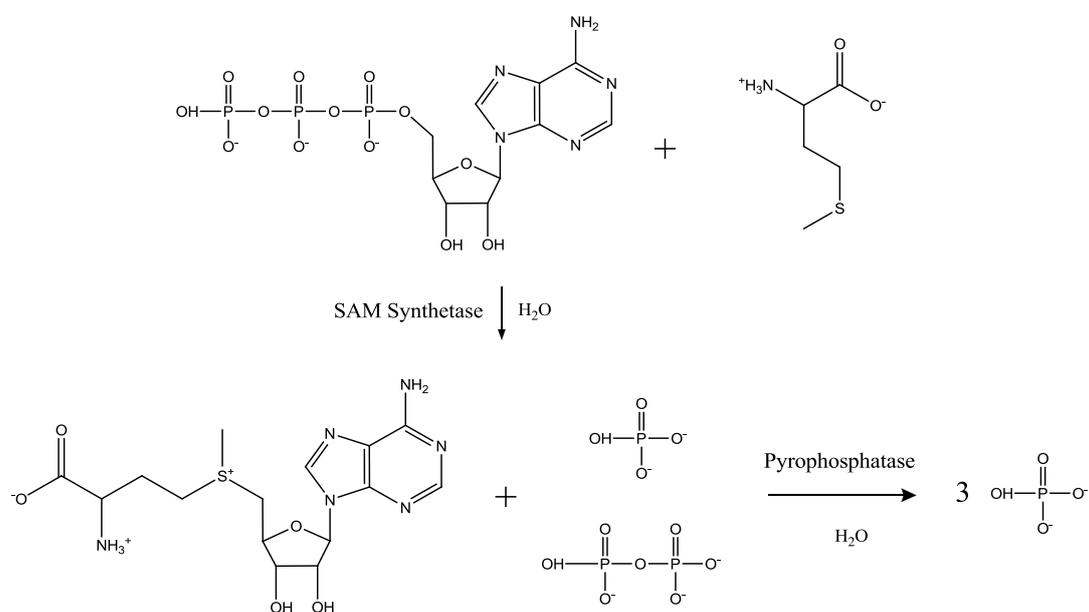


Figure VI-1 : Schéma réactionnel de biosynthèse de la SAM (S-Adénosyl-Méthionine) catalysée par la SAM-synthétase.

Après 5-7 h de réaction, le milieu réactionnel est acidifié à pH 5-6 par ajout de HCl 1M, centrifugé 10 min à 7000 g et le surnageant est dilué dans 500 mL d'une solution contenant 1 mM de tampon acétate pH 5,0. La SAM est purifiée sur colonne échangeuse de cation CM-52 équilibrée avec du tampon acétate 1 mM pH 5,0. Après lavage de la colonne par 10 volumes de tampon acétate la SAM est éluée par une solution de H₂SO₄ 40 mM. Les fractions sont analysées par HPLC et celles contenant la SAM sont regroupées et le pH est

ajusté entre 6 et 7. La SAM est ensuite concentrée par lyophilisation et reprise dans un volume minimum d'eau avant d'être dosée par mesure de l'absorbance à 260 nm ($\epsilon = 15400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La SAM est alors aliquotée et stockée à -80°C .

VI-2) Synthèse et purification d'aspartates deutérés R et S en position β .

Pour obtenir les deux stéréoisomères de l'aspartate marqué en position β par un deutérium, l'enzyme aspartate ammonia lyase issu de *B. subtilis*, appelée aussi aspartase ou AspB, a été utilisée (plasmide de surproduction généreusement donné par le Dr. G. J. Poelarends, Pays-Bas). Cette enzyme est capable de transformer de manière réversible et stéréospécifique le fumarate en aspartate. AspB catalyse la cis-addition d'un NH_3 et d'un H sur le fumarate pour former le L-aspartate. L'enzyme est surproduite et purifiée sur colonne Ni-NTA avant d'être utilisée pour réaliser la réaction. Cette dernière est effectuée dans un milieu tamponné (Tris-HCl 50 mM / MgCl_2 2 mM / pH 9,0) auquel sont ajoutés 100 mM de NH_4Cl , 10 mM de fumarate et 2 μM d'AspB. La réaction est incubée 30 min à température ambiante et peut être suivie par variation de l'absorbance à 293 nm ($\epsilon = 82 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Pour synthétiser l'aspartate marqué en R, le fumarate deutérié est utilisé comme substrat et la réaction est réalisée dans H_2O (Figure VI-2-1). A l'inverse, pour synthétiser l'aspartate marqué en S, la réaction est faite dans D_2O avec le substrat fumarate classique, non deutérié (Figure VI-2-2).

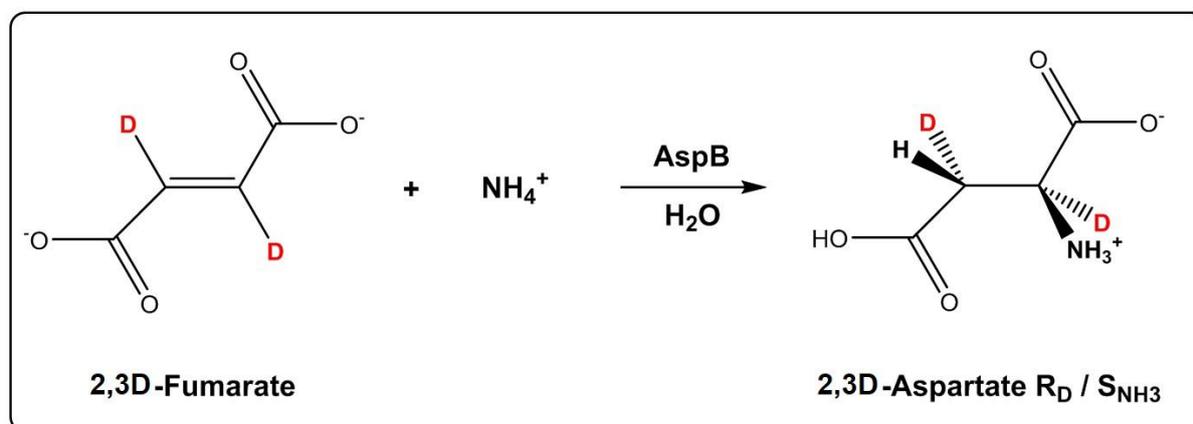


Figure VI-2-1 : Biosynthèse de l'aspartate deutéré R en position β

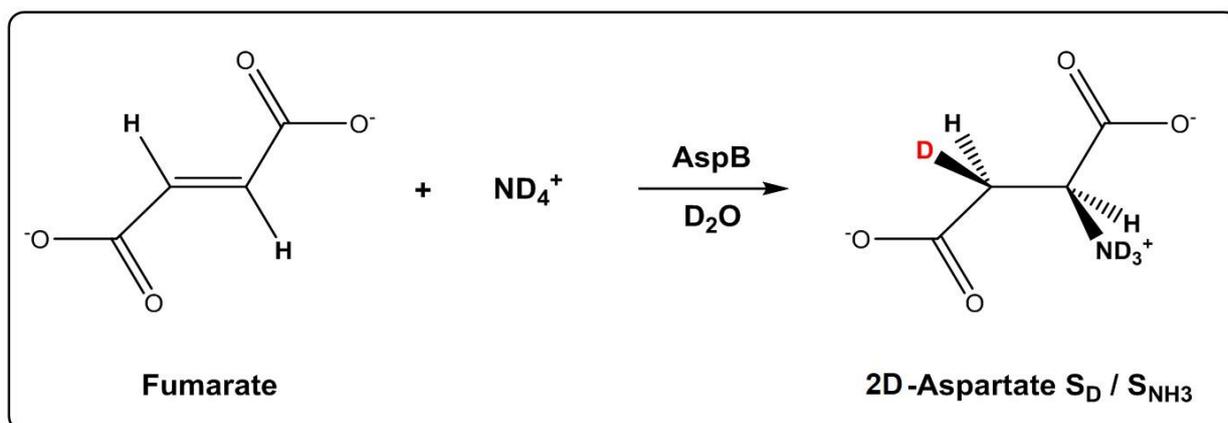


Figure VI-2-1 : Biosynthèse de l'aspartate deutéré S en position β

Une fois la réaction terminée, la solution est chauffée 20 min à 75°C pour précipiter AspB, puis elle est lyophilisée. Ensuite l'aspartate marqué est repris dans un minimum d'eau et purifié sur colonne échangeuse de cation Dowex® (Biorad). Avant chargement, la colonne est traitée par HCl 4 M puis équilibré en eau. L'élution se fait avec solution basique contenant 0,2 M de NaOH. Les fractions contenant l'aspartate sont repérées par révélation à la ninhydrine (Sigma-Aldrich), quelques gouttes de chaque fraction sont déposées sur plaque de silice qui est trempée dans une solution d'éthanol contenant 2% de ninhydrine, puis la plaque est chauffée, la présence d'aspartate est alors révélée par l'apparition d'une couleur rouge-violet. Les fractions contenant l'aspartate sont rassemblées, lyophilisées et stockées à -80°C. Grâce à une analyse RMN (réalisée en collaboration avec le Dr. Didier Boturyn, DCM Grenoble) la pureté et la quantité des produits obtenus peuvent être déterminées.

VI-3) Synthèse de mime peptidique à partir des aspartates deutérés.

Cette synthèse est également réalisée en collaboration avec le Dr. Didier Boturyn du DCM à Grenoble. Avant d'être intégrés à une synthèse peptidique sur synthétiseur automatique, les aspartates obtenus doivent être protégés. L'aspartate est d'abord dilué dans le THF (Sigma-Aldrich) pour obtenir 10 mM de concentration final, la solution est mise sous agitation à température ambiante jusqu'à dissolution complète de l'aspartate, puis 3,5 équivalents molaire de BF_3/EtO_2 (Sigma-Aldrich) sont ajoutés et la solution est incubée durant une nuit. La solution est portée à 50°C pendant 3h (suivi par migration sur plaque de silice, éluant : n-BuOH / AcOH / EtOAc / H_2O 1/1/1/1). Un précipité blanc apparait (sel avec le BF_4^- et un cation). La solution est filtrée et le THF est éliminé par évaporation sous vide sur

évaporateur rotatif. Le solide obtenu est repris dans du dioxane (Sigma-Aldrich) dans lequel on fait buller de l'isobutène (Sigma-Aldrich) en utilisant un réfrigérant à -12°C pour le recycler. La réaction est catalysée par l'ajout de 0,2 mL d' H_2SO_4 et incubée 5 h à température ambiante sous agitation. Le dioxane est ensuite évaporé et le solide est repris dans une solution aqueuse contenant 1 M de NaHCO_3 , incubé 30 min à température ambiante et l'eau est évaporée. Le solide obtenu est repris dans le DMF (Fisher), ajouter 1,2 équivalent molaire de DIEA (Sigma-Aldrich) et 1 équivalent molaire de Fmoc-OSu, puis incubé 1 h à température ambiante (Figure VI-3).

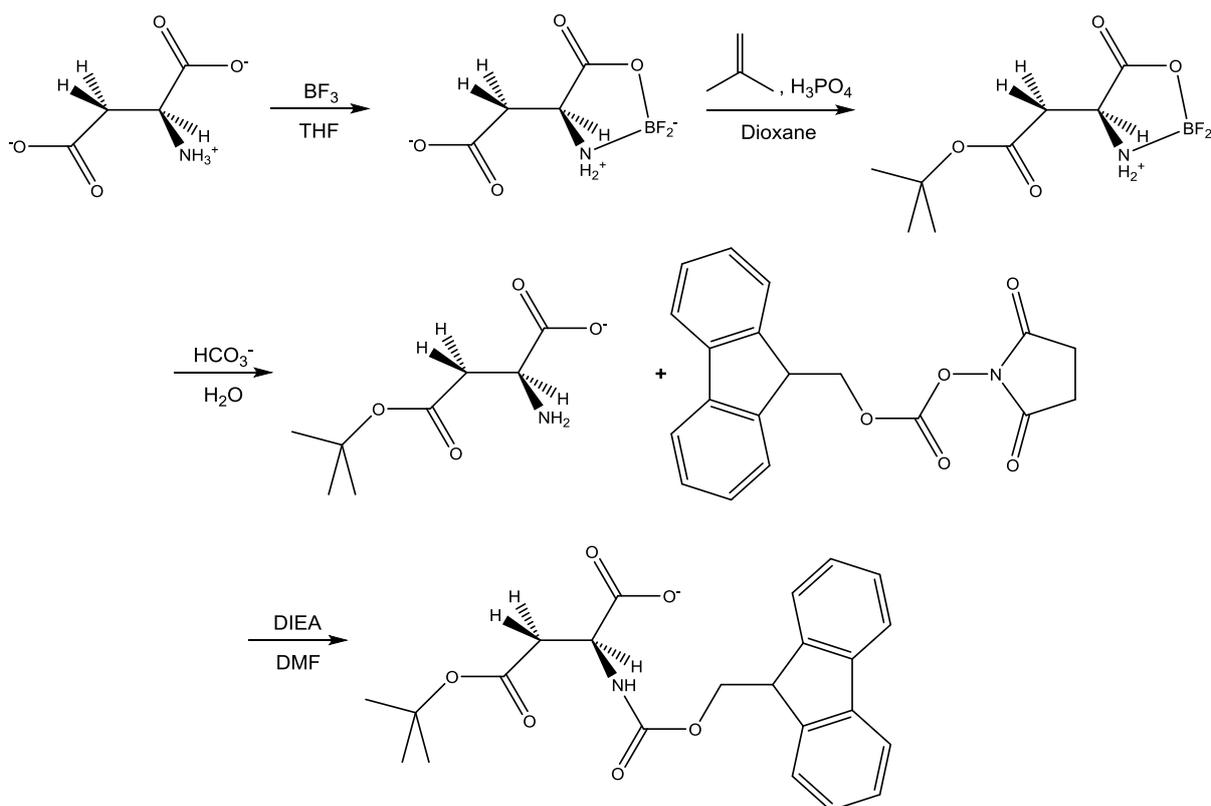


Figure VI-3 : Réaction de protection de l'aspartate en vue d'une intégration dans une synthèse peptidique en stratégie Fmoc/tBu.

Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse avant d'être purifié sur colonne de silice puis intégré à la chaîne de synthèse sur synthétiseur automatique.

VII – Electrochimie des protéines.

L'électrochimie des protéines [4Fe-4S] a été réalisée en collaboration avec le Dr. Nicolas Duraffourg de l'équipe AFFOND du laboratoire CBM. Les mesures ont été faites en boîte à gants sous atmosphère inerte d'azote, en utilisant deux techniques : la voltamétrie cyclique et la voltamétrie à base carrée (« square wave »). L'échantillon d'holoprotéine à analyser est déposé sous la forme d'une goutte de 10 à 20 μL directement sur une électrode d'or (Radiometer Analysis). La contre électrode de platine (KO266 EG&G instrument) et l'électrode de référence (Ag/AgCl) sont mises en contact avec la goutte contenant la protéine. Les trois électrodes sont ensuite connectées à un potentiostat (modèle 273, EG&G instrument).

La voltamétrie cyclique (CV : cyclic voltammetry) est basée sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant ainsi la mesure des courbes $i = f(E)$ pour l'oxydation et la réduction des éléments redox de l'échantillon analysé. Cette technique permet de mesurer des potentiels redox, la réversibilité et la cinétique des processus d'oxydation et de réduction d'une même espèce ou encore de calculer des coefficients de diffusion des composés électro-actifs en solution.

La voltamétrie à onde carrée (SWV : square wave voltammetry) est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude avec une rampe en escalier. Le signal mesuré est la différence entre les courants mesurés à la fin de chaque pulse montant et descendant de l'onde carrée. Le principal avantage de la SWV, par rapport à la CV, est qu'elle permet de varier le potentiel à des vitesses beaucoup plus élevées, et ainsi d'améliorer la sensibilité grâce à une augmentation du rapport courant faradique/courant capacitif.

RESULTATS & DISCUSSIONS

CHAPITRE I

Caractérisation biochimique et spectroscopique de RimO

Ce chapitre expose les caractéristiques biochimiques et spectroscopiques connues de l'enzyme RimO de *Thermotoga maritima* et les études pour élucider l'origine des particularités spectroscopiques propres à cette protéine.

I-1) L'enzyme RimO sauvage de *T. maritima*.

I-1-a. Caractéristiques biochimiques.

L'enzyme RimO de *T. maritima* est une protéine thermophile contenant deux centres [4Fe-4S] séparés de 8 Å dont le premier est appelé centre RS pour « Radical-SAM » et le second centre S pour « Soufre ». Dans le travail décrit ici, RimO est surproduite de manière hétérologue chez *E. coli* et purifiée en conditions aérobies, ce qui conduit majoritairement à l'obtention de la forme apoprotéine de l'enzyme. En présence d'un sel de Fer, de DTT et d'une source de sulfure l'*apo*-RimO intègre sous atmosphère inerte les deux centres [4Fe-4S] nécessaires à son activité. Cette réaction de reconstitution biochimique de l'enzyme est contrôlée par spectroscopie UV-visible. Le Fer et le Soufre introduits sont quantifiés par dosages colorimétriques et les valeurs obtenues rapportées par monomère. L'enzyme active catalyse en présence d'un réducteur chimique la réaction de transfert d'un groupement thiométhyle sur la position β de l'aspartate 89 de la protéine ribosomale S12. (Figure I-1-a-1).

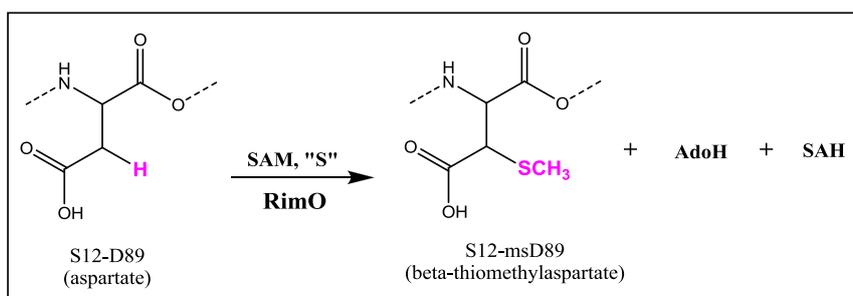


Figure I-1-a-1 : Réaction bilan catalysée par l'enzyme RimO. L'insertion d'un groupement thiométhyle dans le substrat utilise deux molécules de S-Adénosyle-Méthionine (SAM) conduisant aux deux sous-produits de réaction, le 5'-déoxy-Adénosine (AdoH) et la S-Adénosyle-Homocystéine (SAH).

Les données physico-chimiques et biochimiques obtenues à partir de la reconstitution de l'enzyme RimO sauvage (appelée aussi « wt ») sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau I-1-a-2).

$\epsilon(280\text{nm})$ apo-RimO wt ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	$\epsilon(280\text{nm})$ holo-RimO wt ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	$\epsilon(400\text{nm})$ Holo-RimO wt ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Dosage de Fe (Fe/monomère)	Dosage de S (S/monomère)
50 000	100 000	35 000	7 à 8	11 à 12

Tableau I-1-a-2 : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques de la protéine RimO de *Thermotoga maritima*. Les propriétés physico-chimiques données regroupent les différents coefficients d'extinction molaire expérimentaux à 280nm et 400nm pour les formes *apo* et *holo*. Les données biochimiques décrites ici donnent les valeurs de dosages en Fer et en Soufre contenu dans l'holoprotéine RimO reconstituée.

Les coefficients d'extinction molaire présentés ci-dessus ont été obtenus en corroborant les données de spectroscopie UV-visible avec un dosage des acides aminés. Les valeurs données sont valables pour la protéine *holo*-RimO sauvage à l'état oxydé uniquement, les centres [4Fe-4S] n'absorbant pas de la même façon à l'état réduit, que ce soit à 280 ou 400nm. Les quantités de Soufre et de Fer contenues dans la protéine sont déterminées par la méthode de Beinert pour le dosage du Soufre (Beinert et al. 1983) et par une modification de la méthode de Fish pour celui du Fer (Fish et al. 1988). La protéine reconstituée contient 7 à 8 atomes de Fer par monomère, en accord avec la présence de deux centres [4Fe-4S]. Par contre elle contient 11-12 atomes de Soufre par monomère, soit un excès d'environ 3 à 5 soufres par rapport au Fer. Cela peut s'expliquer d'après les données structurales connues qui montrent

que les deux centres [4Fe-4S] sont reliés par une chaîne de 5 atomes de Soufre dont les extrémités occupent le site vacant de chaque cluster (Forouhar et al. 2013).

Les spectres UV-visible avant et après reconstitution chimique de l'enzyme sont présentés ci-dessous (Figure I-1-a-3).

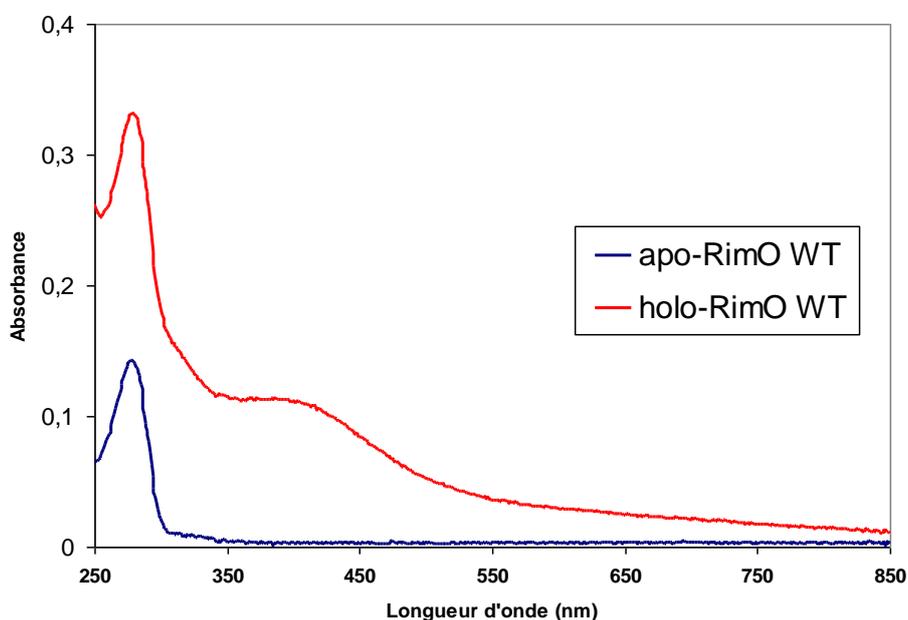


Figure I-1-a-3 : Reconstitution de RimO sauvage (wt) de *T. maritima*. Spectres initial (en bleu) et final (en rouge) de la reconstitution chimique des centres [4Fe-4S] de RimO à température ambiante et sous atmosphère inerte (mesures sur échantillon dilué 50 fois). Le milieu réactionnel contient 120 μM de protéine, 10 équivalents de Fe^{II} (sel de Möhr), 12 équivalents de cystéine, 3 μM de Cystéine désulfurase A (CsdA) et 2 mM de DTT.

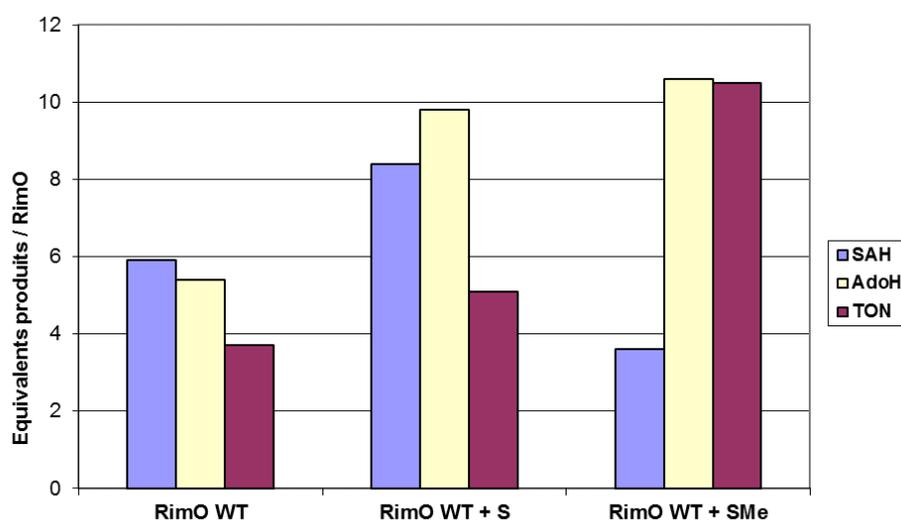
La réaction de reconstitution des deux centres Fer-soufres (Fe-S) de l'enzyme est suivie par spectrophotométrie UV-visible. La formation de ces centres provoque une augmentation de l'absorbance à 280 nm et 400 nm. La réaction est arrêtée par dessalage sur colonne dès que le rapport d'absorbance $R(400/280)$ atteint 0,33-0,34. L'enzyme reconstituée est ensuite purifiée sur colonne d'exclusion sous atmosphère inerte.

L'enzyme RimO sauvage possède trois activités différentes. La première est l'activité méthylthiotransférase décrite en Figure I-1-a-1. Cette activité est la résultante de deux autres, une activité méthyltransférase qui utilise la molécule de SAM comme donneur de méthyle, à l'origine de la production de S-Adénosyl-Homocystéine (SAH) et une activité SAM-

réductase, qui utilise la SAM comme précurseur du radical 5'-deoxyadenosyle, à l'origine de la production de 5'-deoxyAdénosine (AdoH) (Tableau I-1-a-4 et Histogramme I-1-a-5).

	Activité Méthylthiotransférase ms^β-D89 / RimO	Activité méthyltransférase SAH / RimO (SAH / ms ^β -D89)	Activité SAM-réductase AdoH / RimO (AdoH / ms ^β -D89)
RimO seul	3 - 4	5 - 7 (1,5 - 2.3)	5 - 6 (1,5-2)
RimO + Na ₂ S	5 - 6	7 - 9 (1,2- 1.8)	9 - 11 (1,5-2.2)
RimO + NaSMe	10 - 12	2 - 4 (0,1-0.4)	10 - 12 (0.9-1.2)

Tableau I-1-a-4 : Activités enzymatiques de l'enzyme RimO sauvage de *T. maritima*. Les activités sont données en nombre de cycles catalytiques totaux et en nombre de cycles rapportés à l'activité MTTase (entre parenthèses). Milieu réactionnel : *holo*-RimO (1 μM), peptide substrat (15 μM), SAM (150 μM) et réducteur dithionite (2 mM) en présence ou en absence de Na₂S (2 mM) ou de NaSMe (2 mM). Le milieu réactionnel est alors incubé à 65°C pendant 30 minutes puis les différentes activités sont quantifiées par HPLC couplée à une détection UV-visible.



Histogramme I-1-a-5 : Représentation graphique des résultats d'activité enzymatique de l'holo-enzyme RimO sauvage (nommé « WT »). Les trois conditions différentes sont présentées de gauche à droite avec l'enzyme seule, l'enzyme avec un excès de sulfure et l'enzyme avec un excès de méthylsulfure. La production de SAH est représenté en bleu, celle de AdoH en beige et le nombre de cycle catlytique (TON) en violet.

L'enzyme seule est capable de réaliser de 3 à 4 cycles catalytiques, avec un léger découplage des activités méthyltransférase (1,5-2,3 SAH/ms^β-D89) et SAM-réductase (1,5-2 AdoH/ms^β-D89). L'activité MTTase est stimulée en présence de sulfure inorganique ajouté en excès (5-6 ms^β-D89/monomère) mais le découplage ne varie pas. La stimulation est encore plus forte avec l'ajout d'un excès de méthylsulfure (10-12 ms^β-D89/monomère), il n'y a quasiment plus de découplage avec l'activité SAM-réductase (0,9-1,2 AdoH/ms^β-D89) et l'activité méthyltransférase est très inférieure à l'activité MTTase de l'enzyme (0,1-0,4 SAH/ms^β-D89). Ce tableau confirme les résultats obtenus précédemment au laboratoire (Forouhar et al. 2013).

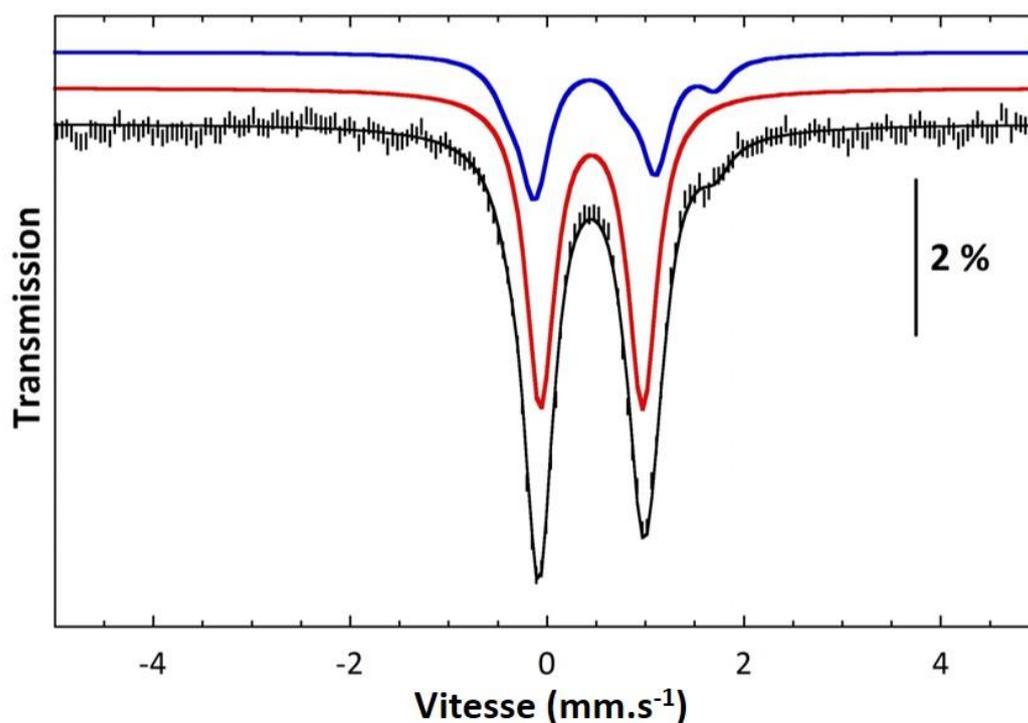
En résumé, RimO catalyse plusieurs cycles de méthylthiolation d'un peptide mimant le substrat physiologique S12. L'enzyme peut utiliser indifféremment du sulfure ou du méthylsulfure ajouté à forte concentration. Le fait que, dans ce dernier cas, l'enzyme s'avère plus efficace et que le découplage entre activité MTTase et SAM réductase soit pratiquement inexistant suggère que l'efficacité et le contrôle de la réaction de méthylation du sulfure est un facteur important dans l'activité MTTase de RimO.

I-1-b. Caractérisation de RimO par spectroscopie Mössbauer.

Une des techniques de prédilection utilisée pour l'étude des centres Fe-S est la spectroscopie Mössbauer. C'est une spectroscopie d'absorption de rayons γ par un isotope du Fer, le ⁵⁷Fe, placé dans un champ magnétique conduisant à un spectre se présentant sous la forme d'un doublet (pour une espèce diamagnétique) ou de six doublets (pour une espèce paramagnétique). Ces doublets correspondent à deux transitions énergétiques obtenues à deux vitesses différentes de la source par rapport à l'échantillon (voir Matériels & Méthodes V-2). Pour réaliser ces spectres Mössbauer, l'apoprotéine RimO est reconstituée en utilisant le ⁵⁷Fe. Cette technique permet de caractériser tous les atomes de Fer présents dans l'échantillon et les paramètres obtenus à partir des doublets renseignent sur les degrés d'oxydation ainsi que sur la symétrie de charge de ces atomes de Fer. Les enregistrements sont réalisés à l'état oxydé et/ou réduit puis le traitement des signaux est effectué grâce à des simulations informatiques permettant leur interprétation. Trois paramètres principaux peuvent être extraits, tout d'abord le déplacement isomérique δ (en mm.s⁻¹) correspondant au barycentre du doublet, nous informe sur l'état d'oxydation des atomes de Fer de l'échantillon. L'éclatement quadripolaire, ΔE_q (en mm.s⁻¹), correspond, lui, à l'écartement entre les deux pics d'un doublet et sa valeur

dépend de la symétrie de charge des différentes espèces observées. Enfin la valeur du Γ nous donne la largeur à mi-hauteur de chaque pic et informe sur l'homogénéité de l'échantillon analysé. Plus le degré d'oxydation du Fer sera bas, plus le δ et le ΔE_Q seront élevés.

L'*holo*-enzyme RimO contenant ses deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ a été obtenue en boîte à gants à partir de la forme *apo* en présence de ^{57}Fe puis purifiée par filtration sur gel et analysée directement (Figure I-1-b-1).



RimO ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Ratio	Aire (%)
$[4\text{Fe4S}]^{2+}$	0.45	1.04	0.36		68 %
$[4\text{Fe4S}]^{2+}$	0.49	1.22	0.36	2	
site diff	0.31	0.97	0.36	1	32 %
	0.65	2.11	0.36	1	

Figure I-1-b-1 : Spectres Mössbauer expérimental et simulés de l'*holo*-enzyme RimO de *T. maritima* à l'état oxydé. L'échantillon analysé contient 400 μL à 300 μM d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre expérimental obtenu (en hachures noires) est la somme de deux spectres correspondant chacun à un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Cet enregistrement est simulé (en noir) par un spectre composé de deux signaux. Le premier (en rouge) correspond à un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dit « typique », c'est-à-dire qu'il possède deux paires de fers à valence mixte (formellement $\text{Fe}^{2,5+}$). Dans le cas de RimO, le site typique représente 68% des centres $[4\text{Fe-4S}]$ et possède des paramètres $\delta = 0,45 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta\text{Eq} = 1,04 \text{ mm.s}^{-1}$ caractéristiques de deux paires de Fer à valence mixte. Le second (en bleu) est plus complexe et est considéré comme « atypique » car il possède une paire de fers à valence mixte et une autre paire à valence localisée $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$. Ce site représente 32% du Fer des centres $[4\text{Fe-4S}]$ de l'échantillon. La moitié de ces 32% correspond, là encore, à une paire de Fer délocalisée ($\text{Fe}^{2,5+}$) possédant les mêmes paramètres que ceux du site typique ($\delta = 0,49 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta\text{Eq} = 1,22 \text{ mm.s}^{-1}$). La seconde moitié est composée d'une paire localisée avec un premier jeu de paramètres ($\delta = 0,65 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta\text{Eq} = 2,11 \text{ mm.s}^{-1}$) caractéristiques d'une espèce Fe^{II} et un second jeu ($\delta = 0,31 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta\text{Eq} = 0,97 \text{ mm.s}^{-1}$) caractéristique d'une espèce Fe^{III} . Ces particularités nous permettent de conclure que RimO contient à l'état oxydé un cluster présentant un site différencié, par contre il n'est pas possible en l'état de déterminer lequel des deux centres est concerné.

Pour compléter l'étude de l'échantillon reconstitué, une réduction chimique de l'holoprotéine a été réalisée par incubation avec un excès de dithionite de sodium. La réaction de réduction est suivie en UV-visible par la décroissance de la bande de transfert de charge $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ainsi que par la stabilisation de la bande d'absorption du dithionite à 314 nm en fin de réaction (Figure I-1-b-2).

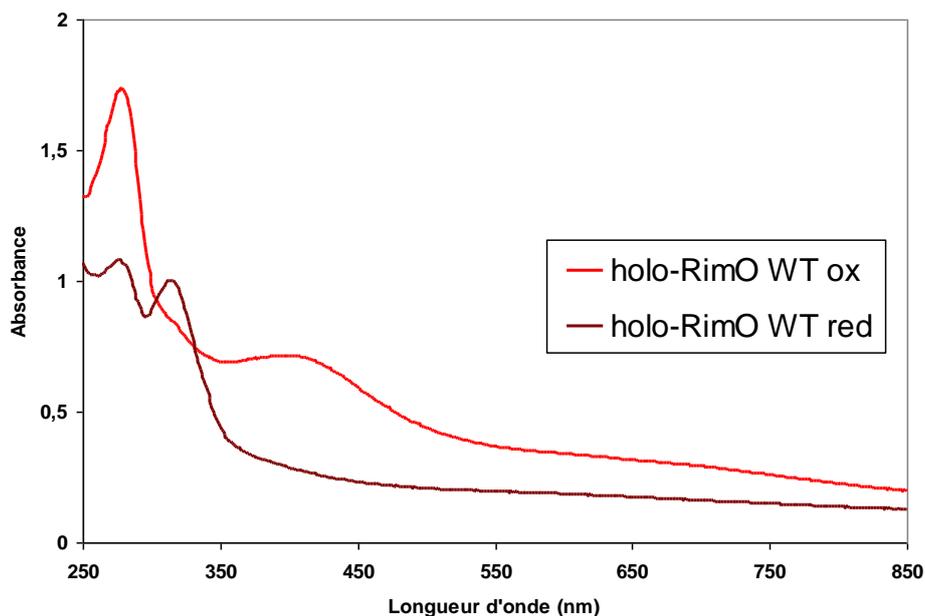
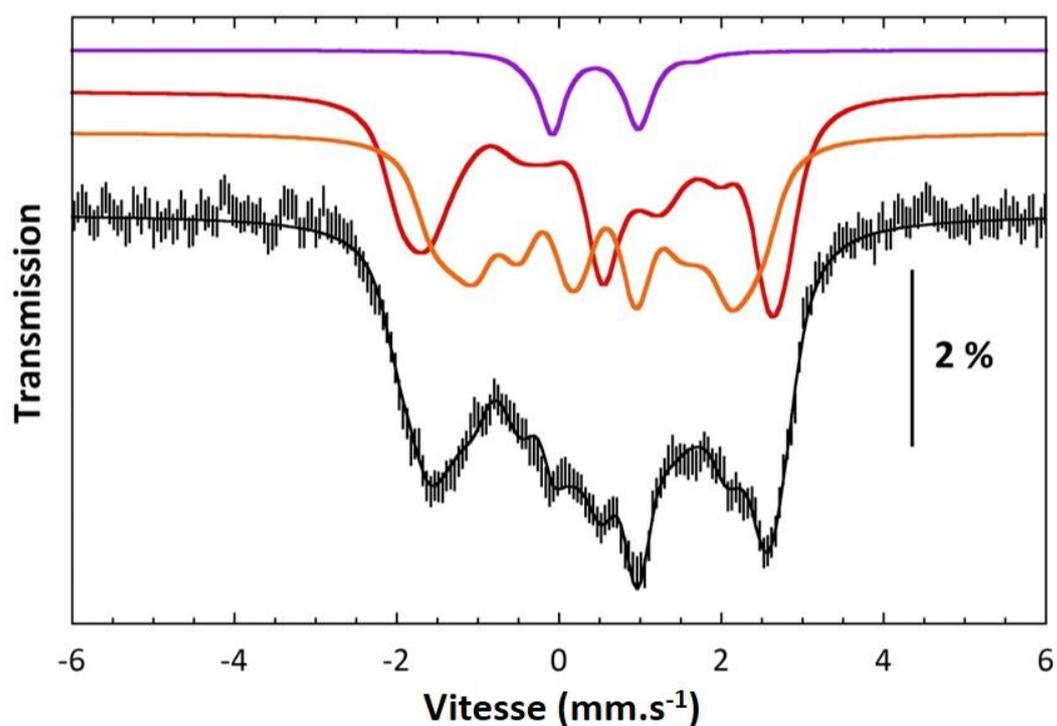


Figure I-1-b-2 : Suivi spectroscopique de la réduction par le dithionite de l'holo-enzyme RimO. Spectres initial (marron) et final (rouge) de la réduction chimique des centres [4Fe-4S] de l'enzyme RimO (mesures sur échantillon dilué 50 fois). L'enzyme reconstituée et purifiée est réduite par incubation avec 10 équivalents molaire de dithionite. La réaction est réalisée à température ambiante sous atmosphère contrôlée d'azote.

L'échantillon réduit a été ensuite analysé en spectroscopie Mössbauer dans les mêmes conditions que celle utilisées pour l'échantillon oxydé (Figure I-1-b-3).



RimO red	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S]¹⁺	0.63	1.88	0.43	86 %
	0.53	1.44	0.43	
[4Fe-4S]²⁺	0.45	1.04	0.36	14%

Figure I-1-b-3 : Spectres Mössbauer expérimental et simulé de l'holo-enzyme RimO de *T. maritima* à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 280 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Comme dans le cas du spectre précédent, le spectre expérimental obtenu est représenté en hachures noires. Dans ces conditions, les deux centres ne sont pas différenciables. La simulation du spectre montre que la protéine est réduite à 86% et qu'elle contient deux types de paires de Fer différentes. Le premier type est une paire Fe^{II}-Fe^{II} (en rouge) avec des paramètres typiques de cet état d'oxydation ($\delta = 0,63$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,88$ mm.s⁻¹). Le second type représente une paire Fe^{II}-Fe^{III} délocalisée avec des paramètres montrant une valence mixte ($\delta = 0,53$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,44$ mm.s⁻¹).

Pour compléter l'étude de l'état réduit de RimO nous avons utilisé la résonance paramagnétique électronique en onde continu (RPE CW) et en onde pulsée (RPE-HYSCORE). Ces deux techniques sont complémentaires et particulièrement utiles pour la compréhension des systèmes qui nous intéressent.

I-1-c. Caractérisation de RimO par spectroscopie RPE CW et RPE-HYSCORE.

L'analyse de la protéine réduite par RPE CW permet de déterminer les valeurs de g reliées à l'état de spin et à la rhombicité du système. Elle permet également de quantifier le nombre de centre Fer-Soufre réduit par protéine et la nature des centres composants l'échantillon grâce à des simulations informatiques. La spectroscopie RPE-HYSCORE, quant à elle, permet la détection d'éventuels ligands des centres [4Fe-4S], si ces ligands possèdent un spin nucléaire non nul (¹⁴N, ¹⁵N, ¹³C, ¹⁷O...) grâce au couplage hyperfin avec le site paramagnétique (Voir Matériels & Méthodes V-3).

L'*holo*-enzyme RimO a donc été analysée par ces deux techniques pour obtenir des informations supplémentaires à celles obtenues par spectroscopie UV-visible, par exemple quantifier la quantité de spin ou détecter d'éventuelles interactions magnétiques. Pour commencer, l'enregistrement du spectre RPE CW a été effectué dans des conditions bien connues et bien définies par des travaux antérieurs (Figure I-1-c-1).

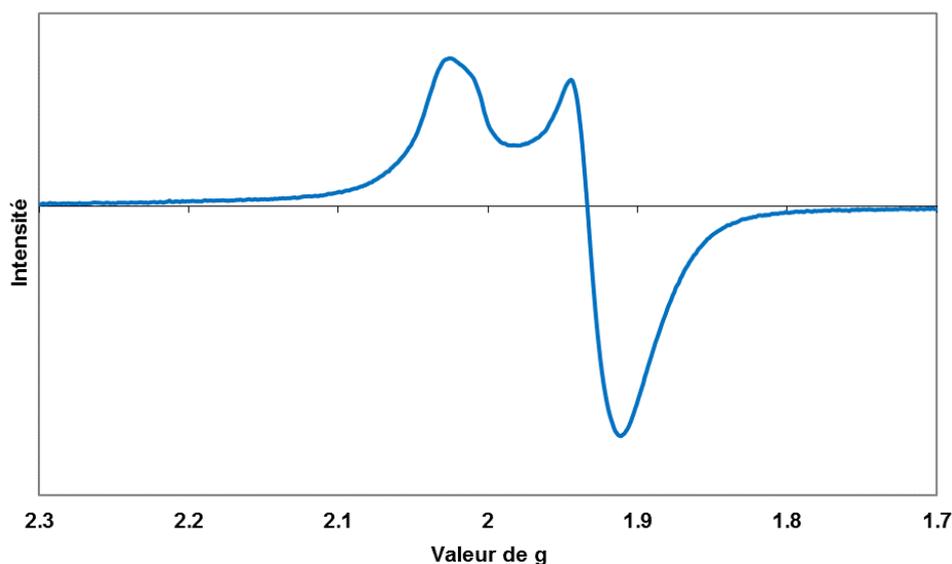


Figure I-1-c-1 : Spectre RPE CW en bande X de RimO Tm à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μ L à 235 μ M d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Le signal observé est caractéristique d'un système pseudo-axial avec des valeurs de g dans la région $g = 2$, qui correspond à un spin $S = 1/2$. La quantité de spin obtenue est évaluée de manière relative en utilisant un complexe de Cu(II)-EDTA de concentration connue. Dans le cas de RimO sauvage on obtient environ 1,2 spin par monomère. La simulation du spectre n'est possible qu'avec deux jeux de paramètres légèrement différents suggérant la présence de deux centres [4Fe-4S] non identiques dans un rapport 51 :49 ($g_{1x}=1.902$, $g_{1y}= 1.930$, $g_{1z}= 2.030$ et $g_{2x}=1.879$, $g_{2y}= 1.940$, $g_{2z}= 2.042$). La différence significative entre le taux de réduction évalué en RPE et celui obtenu en Mössbauer peut éventuellement s'expliquer par la présence d'une partie des centres [4Fe-4S] sous forme de spin $S = 3/2$, qui n'est pas visible sur cet enregistrement (réalisé à faible puissance) mais bien présente. Ces états de spin étant difficilement quantifiables, la quantité de centre réduit par protéine déterminée par la seule quantification du spin $1/2$, est très certainement sous-estimée. En résumé, la RPE CW montre

que RimO sauvage, à l'état réduit, contient deux centres [4Fe-4S] non équivalents qui sont au moins partiellement réduits.

Ce même échantillon a été analysé par RPE-HYSCORE pour compléter les informations obtenues par la RPE CW (Figure I-1-c-2).

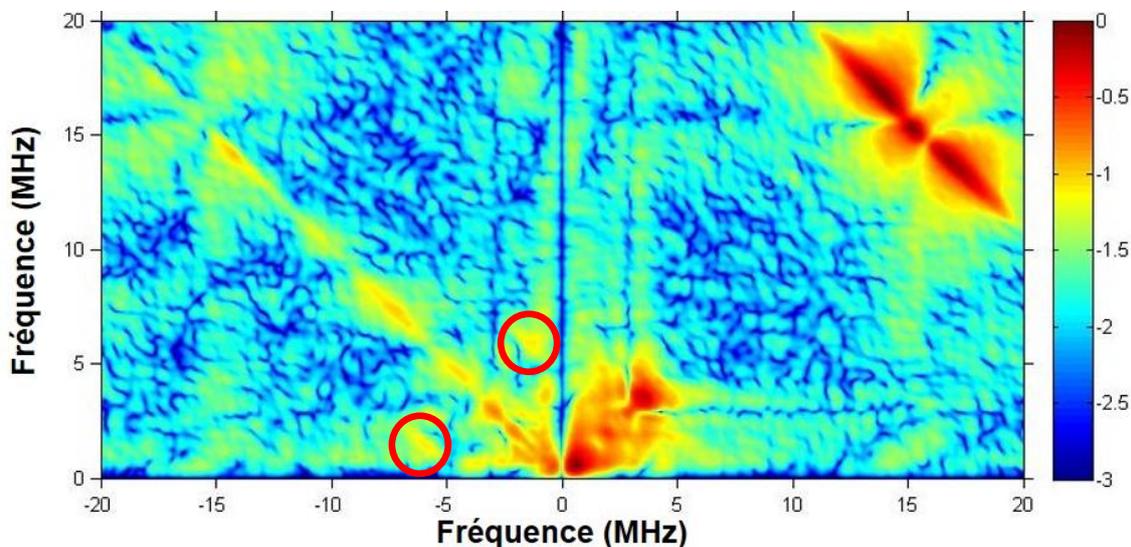


Figure I-1-c-2 : Spectre RPE HYSCORE de l'enzyme RimO *Tm* à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μ L à 235 μ M d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

Dans cette figure, le quadrant (+,+) de droite est relatif aux faibles couplages entre spins nucléaires et le spin du cluster proche tandis que le quadrant (+,-) de gauche est relatif aux forts couplages entre ces partenaires. La figure ci-dessus montre la présence de plusieurs taches de corrélation dans le quadrant (+,-) indiquant la présence de couplages hyperfins forts entre un des centres [4Fe-4S] réduit et un atome possédant un spin nucléaire non nul. Les taches de corrélation entourées en rouge correspondent à un couplage de 7 à 8 MHz et sont attribuées à des transitions dq-dq caractéristiques d'un azote ^{14}N possédant un moment quadripolaire (Hubrich et al. 1996 ; Gambarelli et al. 2005). L'amplitude de ce couplage indique que cet azote est probablement lié au centre Fe-S. Les autres taches de corrélations visibles dans le quadrant de gauche correspondent également à des azotes mais plus distants. Le quadrant (+,+) présente un ensemble de taches complexes en bas à gauche attribuées à des couplages faibles spin- ^{14}N et spin- ^{13}C . Dans la partie haute de ce quadrant les taches de corrélations proviennent de couplages spin-protons.

I-2) Questions et hypothèses de travail.

En résumé, l'enzyme RimO sauvage de *T. maritima* présente deux caractéristiques spectroscopiques bien particulières. La première, visible par spectroscopie Mössbauer, montre qu'à l'état oxydé, un des deux centres [4Fe-4S] est « atypique », c'est-à-dire qu'il possède une paire localisée Fe^{II}-Fe^{III}. La seconde, observable en spectroscopie RPE HYSCORE, est la présence, à l'état réduit, d'un azote très fortement couplé et probablement ligand d'un des deux centres [4Fe-4S]. A partir de ces observations, le premier objectif a été de savoir si chacune de ces caractéristiques étaient portées par un seul des deux centres et dans ce cas d'identifier lequel. L'hypothèse de départ étant que si ces deux particularités étaient liées l'une à l'autre elles pourraient avoir un lien avec le mécanisme de la réaction, notamment au niveau de la double utilisation de SAM. L'approche a été de générer des mutants ne contenant qu'un seul centre et de les analyser par spectroscopie Mössbauer à l'état oxydé, et par RPE CW et HYSCORE à l'état réduit.

I-3) Etude du triple mutant RimO-S (contenant le seul centre S).

Ce mutant a été généré en substituant par mutagenèse dirigée les cystéines du motif CX₃CX₂C coordonnant le cluster RS de RimO par des alanines. Cette protéine, une fois reconstituée, ne contient que le centre auxiliaire appelé « S » (Figure I-3-a).

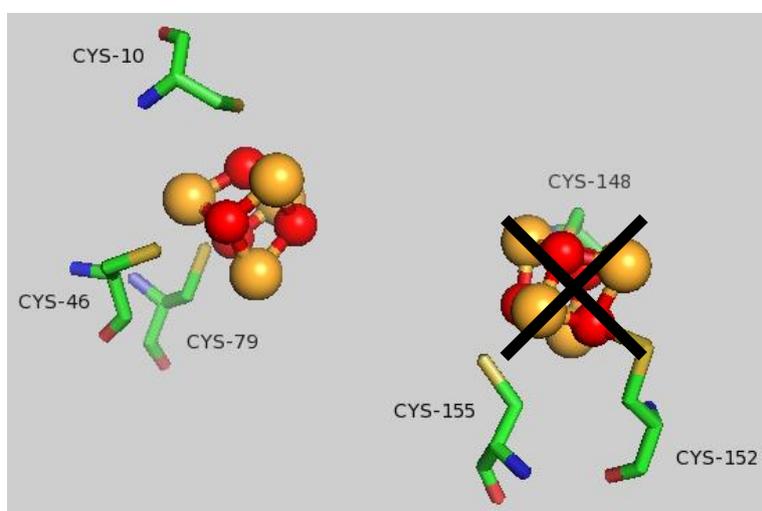


Figure I-3-a : Représentation structurale de l'enzyme RimO-S. Cette image est extraite de la structure de RimO sauvage de *T. maritima* (pdb 4JC0). Le centre [4Fe-4S] radical-SAM (à droite) a été retiré par mutagenèse et seul reste le centre Soufre.

I-3-a. Etude Biochimique du mutant RimO-S.

Le mutant RimO-S a été produit, purifié et reconstitué de la même façon que la protéine sauvage (voir Matériels & Méthodes III-1 / III-2 / III-4), en s'adaptant au fait qu'il ne contient qu'un seul centre [4Fe-4S]. Dans ce cas le rapport d'absorbance 400 /280 est compris entre 0,21 et 0,22 (Figure I-3-b).

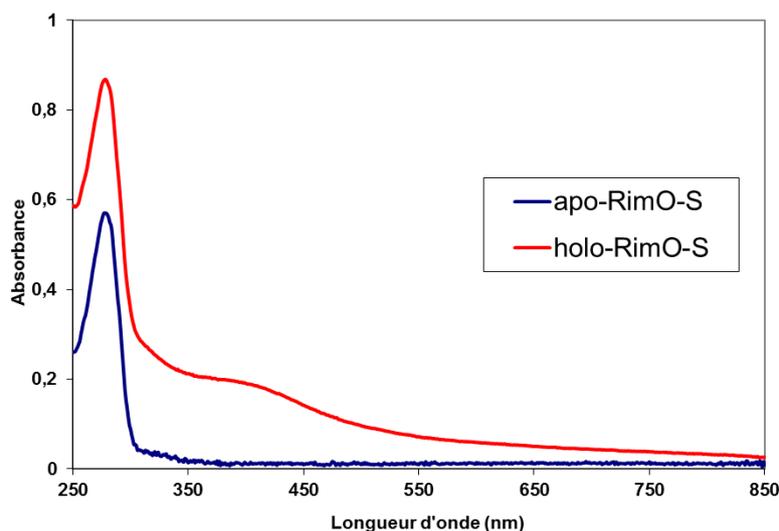


Figure I-3-b : Reconstitution du triple mutant RimO-S. Spectres initial (en bleu) et final (en rouge) de la reconstitution chimique du centre [4Fe-4S] du mutant RimO S à température ambiante et sous atmosphère inerte (mesures sur échantillon dilué 50 fois). Le milieu réactionnel contient 120 μM de protéine, 10 équivalents de Fe^{II} (sel de Möhr), 12 équivalents de cystéine, 3 μM de Cystéine désulfurase A (CsdA) et 2 mM de DTT.

L'holoprotéine reconstituée est dessalée (NAP-25) et chauffée 2h à 65°C en présence de 10 mM DTT. Ce traitement permet de diminuer la proportion de formes oligomériques au profit de la forme monomérique (qui est la forme active pour l'enzyme RimO sauvage). La protéine reconstituée est ensuite purifiée en anaérobiose par filtration sur gel (Superdex 75) avant d'être concentrée. Les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du mutant RimO-S sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau I-3-b).

$\epsilon(280\text{nm})$ <i>apo</i> -RimO-S ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	$\epsilon(280\text{nm})$ <i>holo</i> -RimO-S ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	$\epsilon(400\text{nm})$ <i>holo</i> -RimO-S ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Dosage de Fe (Fe/monomère)	Dosage de S (S/monomère)
50 000	80 000	17 000	4 - 5	4 - 5

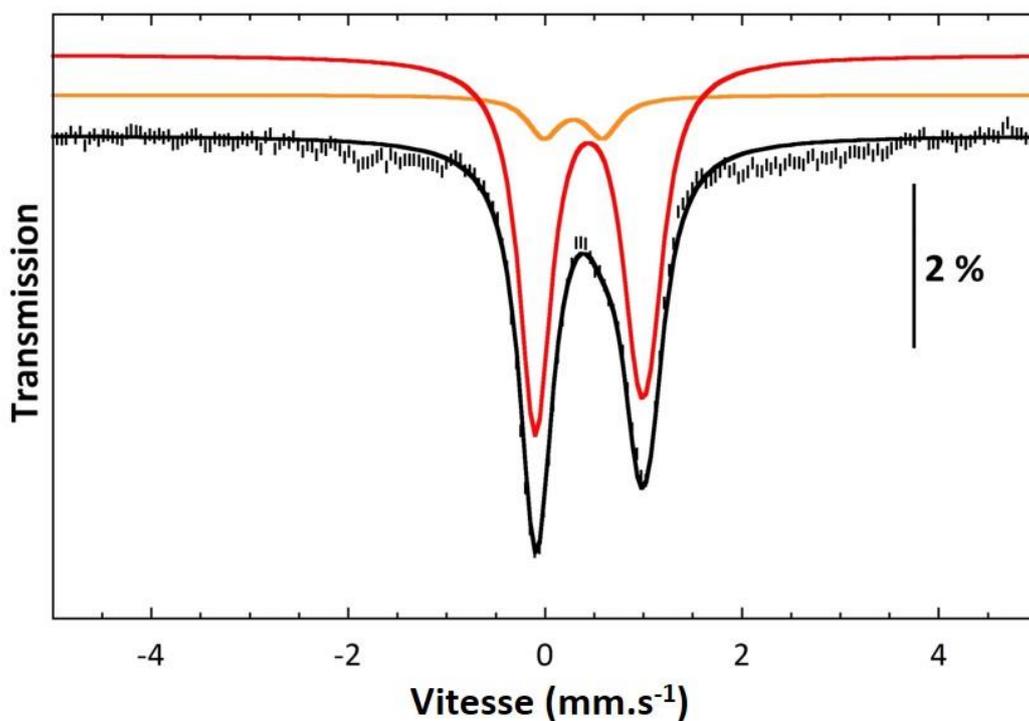
Tableau I-3-b : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du mutant RimO-S. Les différents coefficients d'extinction molaires expérimentaux sont donnés à 280nm et 400nm pour les formes apoprotéine et holoprotéine. Les quantités de Fer et de Soufre contenu dans l'holoprotéine RimO reconstituée sont déterminées par les dosages de Fish et de Beinert respectivement.

Les coefficients d'extinction molaire obtenus suivent la même tendance que celle observée avec RimO sauvage, à savoir : une augmentation des absorbances à 280 nm et 400 nm due à la présence du centre Fe-S. Les quantités de Fer et de Soufre mesurées sont en accord avec la présence d'un seul centre [4Fe-4S], sans excès de Soufre contrairement à l'*holo*-RimO sauvage.

Ce mutant ne présente aucune activité enzymatique (MTTase, MTase, SAM réductase). Ceci est probablement dû à l'absence du deuxième centre Fe-S car, étant très proche l'un de l'autre (8Å), il est concevable que le site actif en soit fortement perturbé. Ces résultats sont en accord avec les études *in vivo* montrant que les trois cystéines mutées sont absolument nécessaires à l'activité.

I-3-c. Spectroscopie Mössbauer.

Le mutant RimO-S a été reconstitué avec du ^{57}Fe , puis purifié et analysé par spectroscopie Mössbauer sous son état oxydé. (Figure I-3-c).



RimO-S ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S]²⁺	0.41	1.03	0.4	83 %
	0.48	1.16	0.4	
[2Fe2S]²⁺	0.28	0.6	0.4	9 %

Figure I-3-c : Spectres Mössbauer expérimental et simulés du mutant RimO-S à l'état oxydé. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 610 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre expérimental obtenu (hachures noires) en haut de la Figure I-3-c montre la présence d'un doublet représentant 91% du Fer total de l'échantillon. Ce doublet peut être simulé avec un seul jeu de paramètres ($\delta = 0,41$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,03$ mm.s⁻¹; $\delta = 0,48$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,16$ mm.s⁻¹) représentant 83% de paires de fers totalement délocalisées (formellement Fe^{2,5+}). Le second doublet de la Figure I-3-c (9% du signal) correspond à un centre [2Fe-2S] qui est certainement dû à un artefact de reconstitution. Ainsi, d'après cette analyse, il apparaît que le site S du mutant RimO-S contient un centre [4Fe-4S]²⁺ typique.

I-3-d. Spectroscopie RPE et RPE-HYSCORE.

Le mutant RimO-S a été réduit de la même façon que RimO sauvage, et a ensuite été analysé par RPE CW en bande X (Figure I-3-d-1).

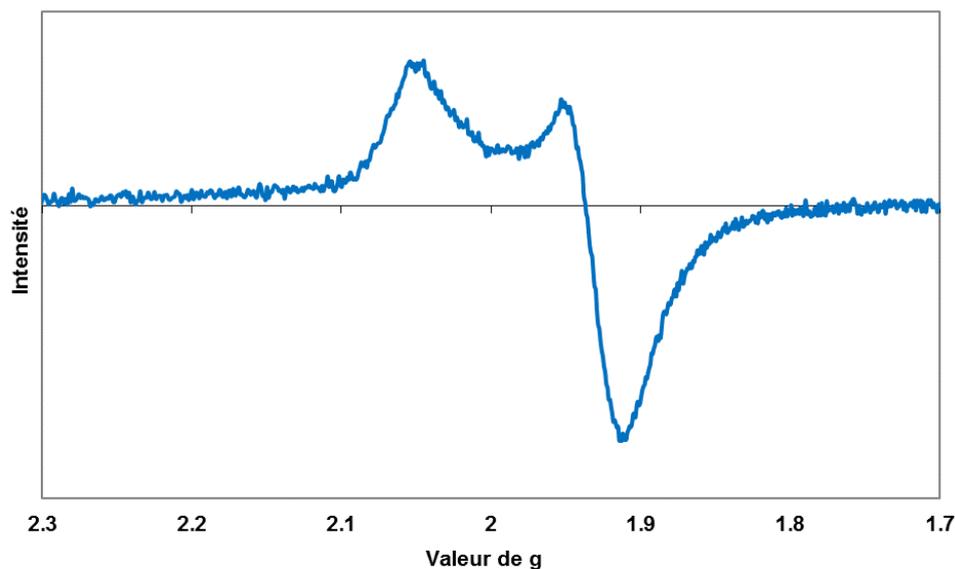


Figure I-3-d-1 : Spectre RPE CW en bande X du mutant *holo-RimO-S* à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μ L à 575 μ M d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Le signal observé en RPE CW présente une forme différente de celle obtenue avec RimO sauvage mais reste typique d'un système pseudo-axial de spin $\frac{1}{2}$ avec des valeurs de g vers 2. La quantification de spin montre que l'échantillon contient environ 0,4 spin par monomère suggérant que, comme pour le sauvage, ce mutant n'est que partiellement réduit.

Ce même échantillon a ensuite été analysé par RPE HYSCORE et le spectre obtenu est présenté ci-dessous (Figure I-3-d-2).

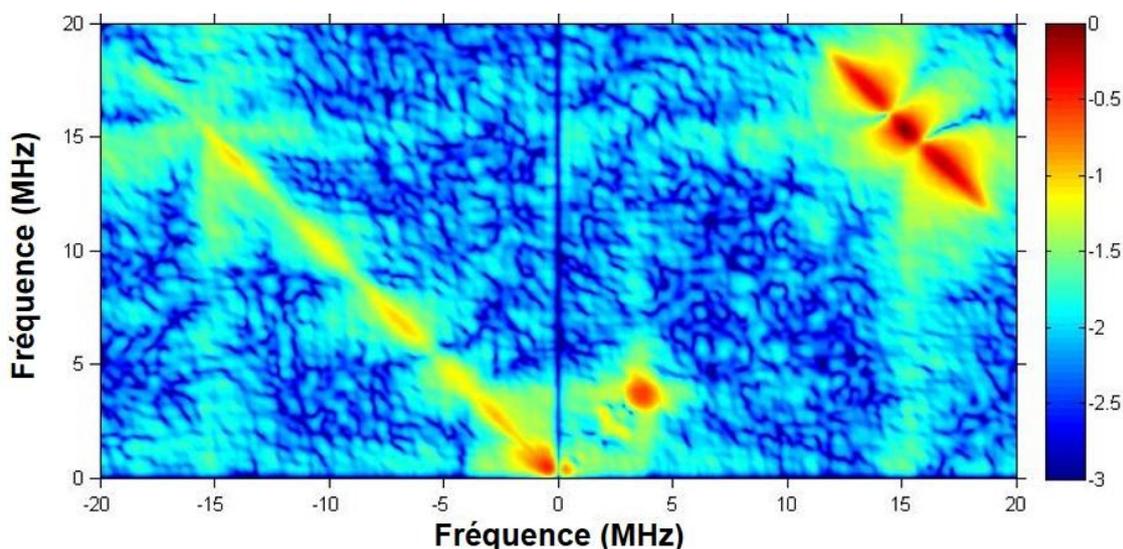


Figure I-3-d-2 : Spectre RPE HSCORE du mutant RimO-S. L'échantillon analysé contient 80 μL à 575 μM d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

Contrairement à l'*holo*-enzyme RimO sauvage, le mutant RimO-S ne présente pas de tache de corrélation dans le quadrant (+,-). Ce résultat sous-entend que les deux particularités spectroscopiques de RimO sont localisées sur le même centre Fe-S et suggèrent donc qu'elles pourraient être liées.

En résumé, l'ensemble des résultats obtenus avec le mutant RimO-S montre que le site atypique $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ et le couplage spin-azote n'appartiennent pas au centre S. *A contrario*, cela suggère que ces caractéristiques proviennent du centre RS. Afin de valider cette hypothèse, le mutant RimO-RS, ne contenant que le seul site Radical-SAM, a été étudié de la même façon.

I-4) Etude du triple mutant RimO-RS.

I-4-a. Présentation de RimO-RS.

Ce mutant a été généré en substituant par mutagenèse dirigée les cystéines C10A-C46A-C79A coordonnant le centre auxiliaire S de RimO par des alanines. Il ne contient que le seul centre $[4\text{Fe-4S}]$ caractéristique des enzymes Radical SAM (centre RS) (Figure I-4-a).

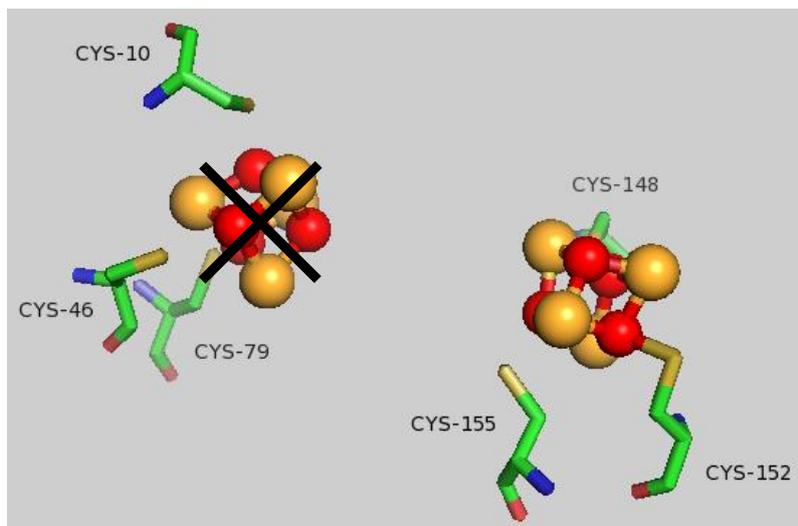


Figure I-4-a : Représentation structurale de l'enzyme RimO-RS. Cette image est extraite de la structure de RimO wt de *T. maritima* (pdb 4JC0). Seul le centre RS de droite est présent, le centre S a été retiré par mutagenèse dirigée sur les trois cystéines C10, C46 et C79.

I-4-b. Etude biochimique du mutant RimO-RS.

Le mutant a été préparé sous forme *holo* en suivant en tout point le protocole déjà décrit. Le rapport d'absorbance 400/280 nm (0,21-0,23) est quasi identique à celui du mutant RimO-S (Figure I-4-b).

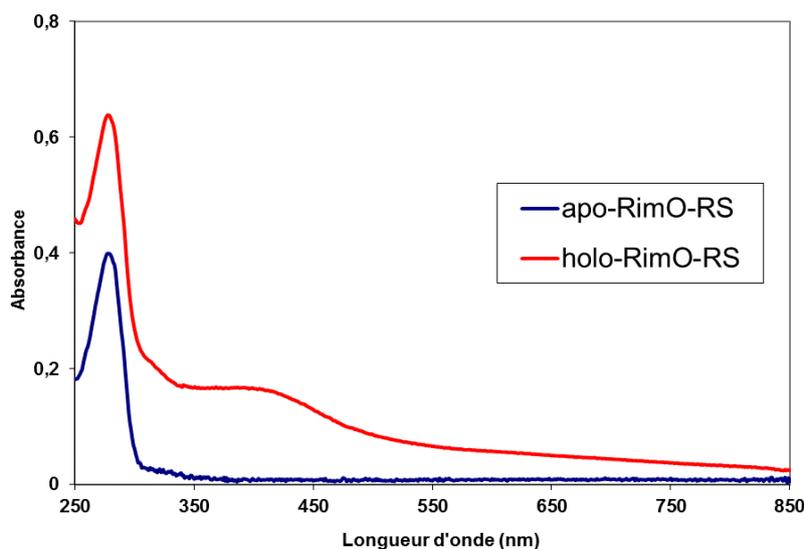


Figure I-4-b : Reconstitution du triple mutant RimO-RS (contenant le seul site radical-SAM). Spectres initial et final de la reconstitution chimique du centre [4Fe-4S] du mutant RS à température ambiante et sous atmosphère inerte (mesures sur échantillon dilué 50 fois). Le milieu réactionnel contient 120 μ M de protéine, 10

équivalents de Fe^{II} (sel de Möhr), 12 équivalents de cystéine, 3 µM de Cystéine désulfurase A (CsdA) et 2 mM de DTT.

Les résultats des mesures physico-chimiques et dosages biochimiques effectuées sur la protéine *holo-RimO-RS* ont été regroupés dans le tableau suivant (Tableau I-4-b).

$\epsilon(280\text{nm})$ <i>apo-RimO RS</i> (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\epsilon(280\text{nm})$ <i>holo-RimO RS</i> (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\epsilon(400\text{nm})$ <i>holo-RimO RS</i> (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Dosage de Fe (atomes de Fe / RimO RS)	Dosage de S (atomes de S / RimO RS)
50 000	75 000	17 000	4 - 5	4 - 5

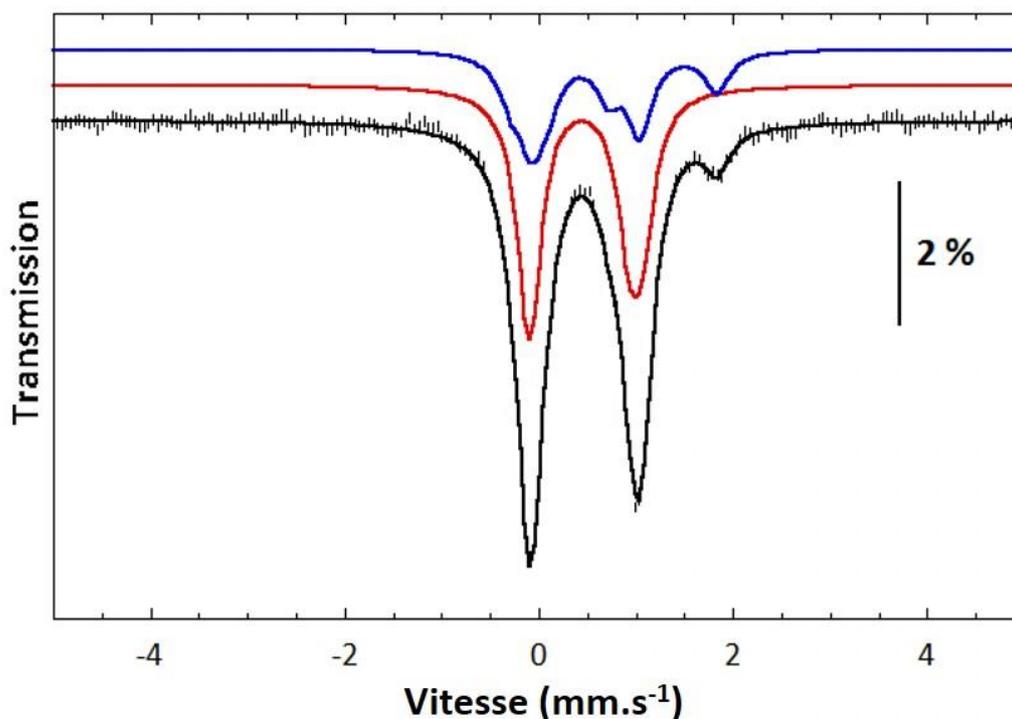
Tableau I-4-b : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du mutant RimO-RS. Les différents coefficients d'extinction molaires expérimentaux sont donnés à 280nm et 400nm pour les formes apoprotéine et holoprotéine. Les quantités de Fer et de Soufre contenu dans l'holoprotéine RimO reconstituée sont déterminées par les dosages de Fish et de Beinert respectivement.

Les données obtenues sont tout à fait semblables à celles obtenues pour le mutant S. Les dosages du Fer et du Soufre contenus dans l'enzyme (4-5 Fe et S par monomère) indiquent que ce mutant contient un seul centre [4Fe-4S] et probablement aucun polysulfure.

De même qu'avec le mutant RimO-S, aucune activité enzymatique de RimO n'est détectable avec le mutant RimO-RS en accord, là aussi, avec les études *in vivo* montrant l'importance de ces cystéines pour l'activité de l'enzyme.

I-4-c. Spectroscopie Mössbauer.

Un échantillon du mutant RS reconstitué avec un sel de ⁵⁷Fe a été préparé comme décrit précédemment et analysé à l'état oxydé par spectroscopie Mössbauer (Figure I-4-c).



RimO-RS ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Ratio	Aire (%)
[4Fe4S]²⁺	0.41	1.03	0.31		61 %
	0.48	1.16	0.31		
[4Fe4S]²⁺	0.48	1.11	0.31	<i>2</i>	39 %
	0.40	0.63	0.31	<i>1</i>	
Différencié	0.77	2.12	0.31	<i>1</i>	

Figure I-4-c : Spectres Mössbauer expérimental et simulé du mutant RimO-RS à l'état oxydé. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 445 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre expérimental (hachures noires) peut être simulé en utilisant deux jeux de paramètres différents. Le premier, représentant 61% de l'échantillon, correspond à un site typique possédant deux paires de fers à valence mixte ($\delta = 0,41$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,03$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,48$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,16$ mm.s⁻¹). Le second, représentant 39% de l'échantillon, correspond à un site atypique. La moitié de ces 39% est une paire de Fer délocalisée, Fe^{2,5+} ($\delta = 0,48$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,11$ mm.s⁻¹) et l'autre moitié est composée d'une paire localisée Fe^{II}-Fe^{III} ($\delta = 0,77$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 2,12$ mm.s⁻¹) pour le Fe^{II} et ($\delta = 0,40$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 0,63$ mm.s⁻¹) pour le Fe^{III}. Ce triple mutant montre bien la présence d'un site atypique, mais plus surprenant il contient également un site typique dans une proportion importante.

I-4-d. Spectroscopie RPE CW et HYSCORE.

Le mutant RimO-RS a été réduit chimiquement par le dithionite de sodium et analysé par RPE CW et HYSCORE (Figure I-4-d).

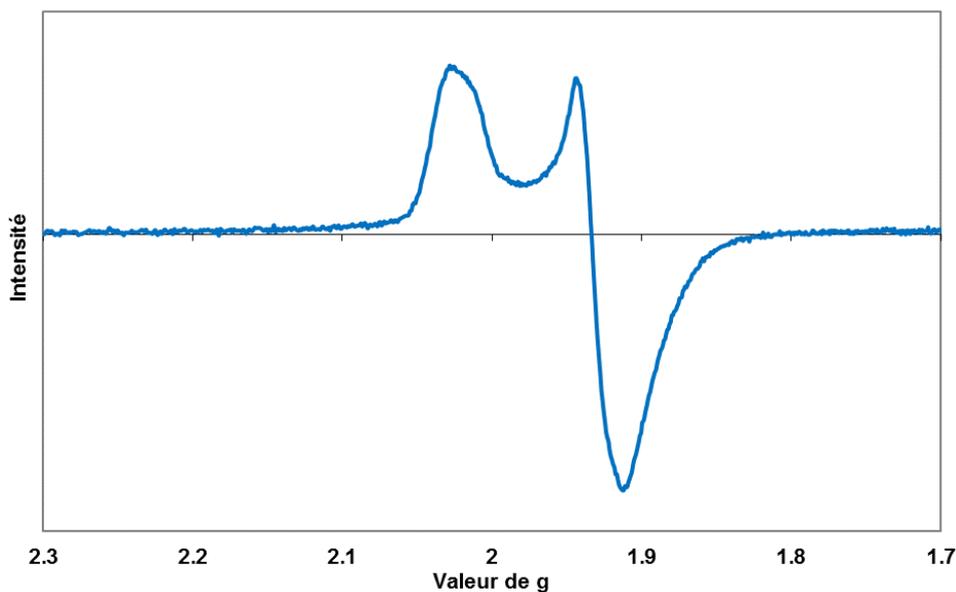


Figure I-4-d-1 : Spectre RPE du mutant RimO-RS à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μ L à 425 μ M d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

La forme du signal pseudo-axial obtenu en RPE CW pour le mutant RimO-RS est légèrement différente de celles observées avec le mutant S et RimO sauvage. Les valeurs de g mesurées proches de $g = 2$ montrent que l'espèce possède un spin = $\frac{1}{2}$. Ce signal représente environ 0,4 spin par monomère très similaire à celui obtenue avec le mutant S.

Le spectre RPE-HYSCORE du même échantillon enregistré dans les mêmes conditions que celles définies précédemment avec la protéine sauvage est représenté ci-dessous (Figure I-4-d-2).

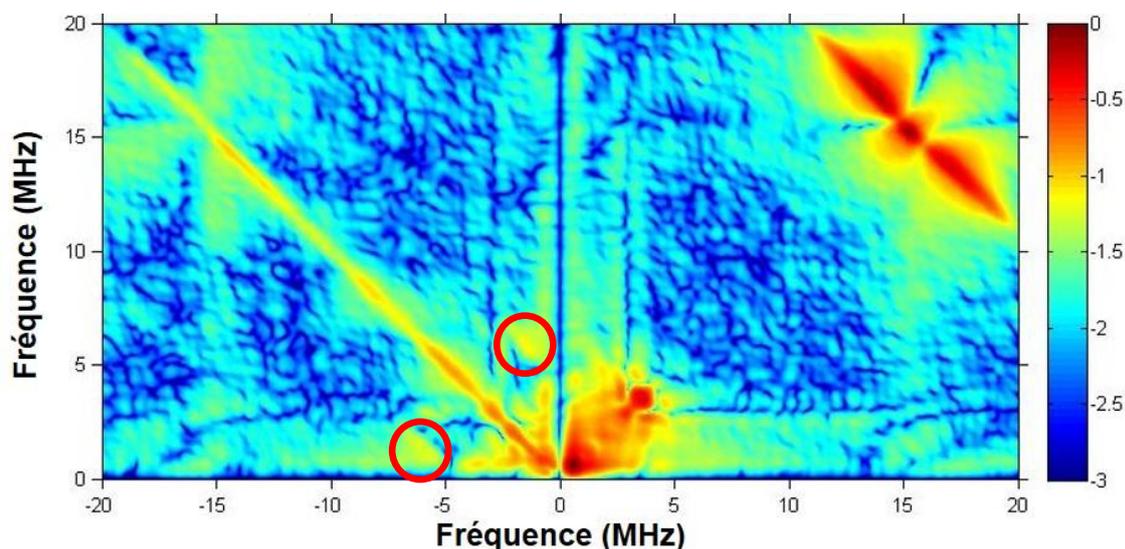


Figure I-4-d-2 : Spectre RPE-HYSCORE du mutant RimO-RS. L'échantillon analysé contient 80 μL à 425 μM d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

Le spectre présente dans le quadrant (+,-) des taches de corrélation (entourées en rouge) pratiquement identiques en ce qui concerne leur formes et positions avec celles observées pour RimO sauvage. Ici aussi ces taches sont attribuées à des transitions caractéristiques d'un azote ^{14}N possédant un moment quadripolaire (double-quanta, double-quanta). L'amplitude du couplage (7-8 MHz) laisse penser que cet azote est lié au centre Fe-S. Ce résultat confirme totalement celui obtenu avec le mutant RimO-S à savoir : les deux particularités spectroscopiques de RimO résident dans le cluster RS de la protéine.

I-5) Discussion.

En ce qui concerne les mesures d'activité enzymatique de l'enzyme RimO sauvage, les données expérimentales nous montrent que l'enzyme seule est capable de réaliser 3 à 4 cycles catalytiques, or le fonctionnement de l'enzyme nécessite une source de Soufre et, là encore, c'est la structure qui nous apporte la solution. La chaîne de polysulfure, une fois mise en milieu réducteur, libère des ions sulfures qui peuvent alors être utilisés par l'enzyme pour réaliser la catalyse. Les caractéristiques de la réaction appellent plusieurs commentaires.

D'abord on observe que L'activité de l'enzyme est stimulée par l'ajout de sulfure exogène, jusqu'à 5 à 6 cycles catalytiques, ce qui implique que c'est la quantité de Soufre dans le milieu réactionnel qui est le facteur limitant lorsqu'il n'est pas ajouté en excès. Par contre, la limitation du nombre de cycles catalytiques en présence de Na₂S peut s'expliquer par une inactivation de l'enzyme, en effet aucun ajout supplémentaire d'un des éléments nécessaires à la réaction ne relance l'activité.

Ensuite, un léger découplage est observé entre l'activité MTTase et les deux autres activités, c'est-à-dire que l'enzyme méthyle plus de sulfure et forme plus de radical adénosyle que nécessaire pour réaliser le nombre de cycles catalytiques mesurés. Ce faible découplage conduit à une non-utilisation d'environ 35% du méthylsulfure produit. En d'autres termes, entre 35 et 50% du radical adénosyle produit ne servent pas à activer le substrat ou, s'il y arrive, le substrat n'est pas thiométhylé. Cette situation a déjà été décrite dans la littérature avec d'autres systèmes similaires et est attribuée à un mauvais contrôle des radicaux produits dû au caractère *in vitro* des mesures (Forouhar et al. 2013).

On observe également que la stimulation du nombre de cycles catalytiques par ajout de sulfure est encore plus forte avec du méthylsulfure exogène (jusqu'à 10 à 12 cycles catalytiques). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'enzyme s'affranchit de l'étape de méthylation du sulfure résultant en une cinétique d'insertion plus rapide qui donc permettrait de réaliser plus de cycles avant l'inactivation de l'enzyme. Dans ces conditions, la formation de 0,3 SAH par cycle catalytique montre effectivement que la réaction de méthylation du sulfure présent dans l'enzyme est plus lente que la réaction d'insertion. L'utilisation optimale du méthylsulfure est également mise en évidence par le fait que la production d'AdoH est strictement équimoléculaire avec celle du produit de thiométhylation

Les mesures d'activité enzymatique obtenues avec les deux triples mutants, RimO-S et RimO-RS, montrent que ces deux enzymes sont totalement inactives. Ceci suggère un lien important entre ces deux cofacteurs. L'activité de l'un ne peut être maintenue qu'en présence de l'autre. Cette observation suggère une influence mutuelle qui pourrait être redox et / ou structurale.

Du point de vue spectroscopique, l'*holo*-enzyme RimO sauvage de *T. maritima* présente deux caractéristiques bien particulières. Les résultats concordants obtenus avec les deux mutants ne possédant qu'un seul des deux centres montrent que ces deux caractéristiques ont leur origine dans le cluster RS. Les deux clusters de RimO sont insaturés en termes de coordination : ils ne sont chacun reliés à la protéine que par trois résidus cystéine. Dans ces conditions, la présence d'un ligand azoté peut refléter deux situations différentes : soit ce ligand azoté occupe la position libre de coordination sur le cluster RS (normalement occupée par la SAM), soit ce ligand azoté est lié à un des trois autres Fer du cluster eux-mêmes liés aux cystéines du motif RS. Ce dernier cas de figure implique que l'atome de Fer en question est pentacoordiné. Il est important de noter que les rares cas de valence localisée au sein de protéines Fe-S ont été le plus souvent corrélés avec la présence d'un Fer pentacoordiné. Si donc on admet que les deux caractéristiques spectroscopiques de RimO sont liées, la présence d'une paire de Fer localisée plaide en faveur de la deuxième hypothèse.

A ce jour il existe plusieurs exemples connus dans la littérature de centres [4Fe-4S] possédant un paire de Fer à valence localisée Fe^{II}-Fe^{III}. Les différents exemples cités ici sont décrit en détail dans l'Introduction (voir Introduction I-2-d). Dans les cas où une étude structurale est disponible (FTR, Hydrogénase Ni-Fe de *R. eutropha*) il apparait que l'existence d'une paire de Fer présentant des valences localisées est corrélée avec la présence d'un des atomes de Fer du cluster dans une géométrie bipyramide trigonale. Il est également significatif que dans les autres cas répertoriés (PFL-AE et LytB), la présence de cette paire localisée est observée suite à l'addition de petites molécules suggérant fortement que le phénomène observé résulte de l'interaction de ces molécules avec le cofacteur Fe-S. (Walters et al. 2005).

L'objectif de l'étude réalisée sur l'enzyme RimO consistait d'abord à localiser les caractéristiques spectroscopiques, avant de vérifier si elles étaient liées et quels rôles elles pouvaient jouer dans le mécanisme. Dans ce chapitre il a été montré que la paire localisée Fe^{II}-Fe^{III} et le couplage spin-azote sont tous deux situés sur le centre RS de RimO Tm. Il s'agit du premier exemple d'une enzyme RS reconstituée *in vitro* possédant un centre atypique sans ajout d'aucune molécule exogène. A ce stade de l'étude, il est trop tôt pour établir un lien direct entre le couplage spin-azote et la localisation de valence Fe^{II}-Fe^{III} car

l'origine précise de l'azote en question n'est pas élucidée. L'identification de cet azote et son rôle dans le cycle catalytique de RimO font l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE II

Etude spectroscopique et rôles des résidus du site actif de RimO.

La suite logique de l'étude exposée dans le chapitre précédent consiste à identifier de manière précise le résidu azoté à l'origine du couplage spin-azote vu en RPE HYSORE. Pour ce travail nous avons utilisé la mutagenèse dirigée pour produire les mutants sélectionnés et les méthodes spectroscopiques décrites précédemment pour les analyser. De plus, les mutations étant ponctuelles, nous avons pu évaluer leur impact sur les trois activités enzymatiques de l'enzyme.

II-1) Hypothèse de travail.

L'hypothèse de départ est que le signal observé en RPE HYSORE est dû à la coordination d'un azote d'une chaîne latérale d'un acide aminé proche du centre RS (les azotes de la chaîne polypeptidique principale paraissant trop éloignés d'après la structure tridimensionnelle). Le rôle supposé de ce ligand azoté serait de permettre le contrôle de la double utilisation de la SAM que RimO doit opérer à chaque cycle catalytique. En effet, lors d'un cycle catalytique, une première molécule de SAM est utilisée comme donneur de méthyle et une seconde pour générer un radical adénosyle utilisé pour l'activation du substrat. Le contrôle de la réaction suppose que la formation du radical adénosyle ne précède pas la méthylation du sulfure. Dans le cas contraire, l'enzyme s'exposerait à des dommages liés à la très forte réactivité de ce radical. Dans cette hypothèse la pentacoordination d'un des fers du centre [4Fe-4S] RS en provoquant une localisation de charge au sein d'une paire Fe-Fe empêcherait soit la coordination de la SAM sur ce centre soit sa réductolyse.

II-2) Analyse structurale et conservation des résidus du site actif.

La résolution récente à 3.3 Å de la structure de l'*holo*-enzyme RimO de *T. maritima* permet d'identifier les résidus faisant partie du site actif de l'enzyme. En particulier ceux qui, dans leur chaîne latérale, possèdent un azote suffisamment proche du cluster RS pour être ligand du cluster en conditions réductrices (Figure II-2-1).

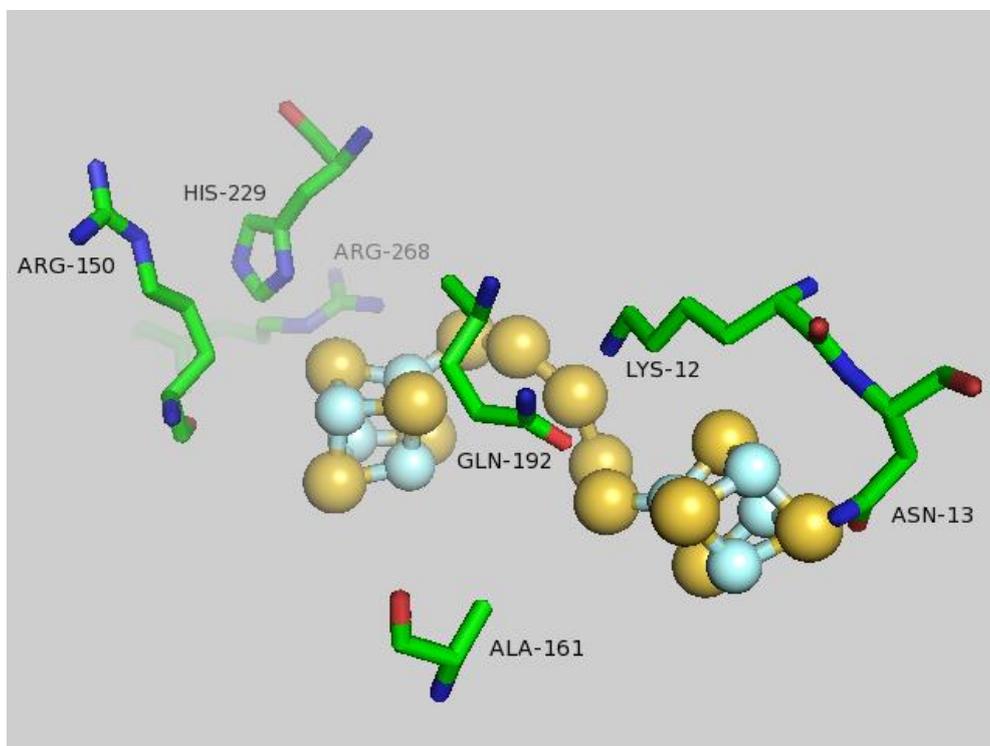


Figure II-2-1 : Structure des centres [4Fe-4S] et des résidus azotés de la poche catalytique de l'*holo*-enzyme RimO de *T. maritima* (pdb 4JC0). Le centre RS se trouve sur la gauche de l'image et le centre auxiliaire S sur la droite.

La Figure II-2-1 représente une vue du site actif de l'enzyme qui fait apparaître plusieurs résidus azotés à proximité des deux centres. Cette structure a été obtenue à l'état oxydé et il n'est pas exclu qu'à l'état réduit (qui est l'état dans lequel l'azote coordonné a été directement observé), des modifications structurales puissent rapprocher ou éloigner certains résidus.

Une comparaison de quelques dizaines de séquences peptidiques de RimO issues de différents organismes permet de déterminer la conservation de ces résidus azotés. Un alignement de quatre séquences de RimO est présenté ci-dessous (Figure II-2-2).

```

RIMO_ECOLI -----MSKVTQPQKIGFVSLGCPKYNLVDSERILTELRTYEGYDVVPSYDDADMVIVNT 52
RIMO_THEMA -----MRVGIKVLGCPKNEADCEVLYAGVLRYEGGHEIVFDVKDADVVLDT 45
RIMO_CHLPN MTTKSLGFSFNSVISKNKIHFISLGCYSRNLVDSEVMLGILLKAGYESTNEIEDADYLILNT 60
RIMO_LEGFA -----MNHKVGYFVSLGCPKALVDSEYRIITQLKAQGYELVPTYYEDAGVVVINT 47
      : : * * * : . * . * : * * : : . * * : : * *
RIMO_ECOLI YCGFIDSAVQESL---EAIGEALNEN-GKVIIVTYGLGAKEDQ-IREVHPKVLEITGPHSYE 107
RIMO_THEMA CAFIEDAKRESIDEIFSFVDAKDQYGYKLVVKGYCLVQRYEELKKEIPEVDQWIGVADPE 105
RIMO_CHLPN CAFLKSARDEAKDYLDHLIDVKKEN-AKIIIVTYGCMTSNHKDELKYPWMSHIHYLLGSGDVE 119
RIMO_LEGFA YCGFIDSAVQESL---DTIKEAMAEN-GRVIVTYGLGAKADV-IKNACPDVLHISGAHAYE 102
      * . * . . * * : : : : : : * * * : . : : : * *
RIMO_ECOLI QVLEHVHHYVPK--PKHNPFSLVPEQGVKLTYPRHYAYLKIYSEGCNHRYCTFCIIPSMRGD 165
RIMO_THEMA EIANAIENGTDL--VPDQPETVYRKRYRIDLEERPYYAVKISDGCYDRGCTFCIIPSPFKGS 163
RIMO_CHLPN NILSAIESRESGEKISAKSYIEMGEVPRQLYSTPKHYAYLYKVAEGCRKRCAFYCIIPSIKYGK 179
RIMO_LEGFA EVVNAVHQHLP--P-ADPFTQLIPPQGIKLTYPRHYAYLKIYSEGCNYQKCTFCIIPYTMKYGK 159
      : : . : : : : : * * * : : * * * : : * * * * : : *
RIMO_ECOLI LVSRPIGEVLSEAKRLVDAGVKEILVISYQDTSAYGVYVDVKHRTGFHNGEPVKYTSMVSLCEQ 225
RIMO_THEMA LRSRSIEDITREVEDLLKEGKKEIILVAYQDTSYYGIDLYRYKQALP-----DLLRR 213
RIMO_CHLPN LRSKPLDQILKEFRILVYNKSVKEIILIAYQDLGDYYGKDLSTRSSQLE----SLLHELLK- 234
RIMO_LEGFA LQSYYPMAQILTEAKKLKQAGVYKELLVISYQDTSAYGVYDTRYQYQIEWQYGKTYVNTRFYDLCEQ 219
      * * : : : * . * . . * * : : : * * * * * * * * * * * *
RIMO_ECOLI L--SKLGIWTRLHYVYYPHYVDDVYIPLMAE-GKILPYLDIYPLQHASPRILKYLMKYRPGSVD 282
RIMO_THEMA LNSLNGEFWIRVMYLHPDHLTEEIISAMLELDYKVVKYFDVYFVQHGSDKILKLMGRYTKSSE 273
RIMO_CHLPN ---EPGDYYWLRMLYLYPDEYVSDGIIDLMQYSNPKLLPYVDIYPLQHINDRILKYMRRTSRE 291
RIMO_LEGFA L--GELGIWVRLHYVYPHYVDDIVYPLMRD-GLILPYLDIYPLQHANSRILKYAMPASSE 276
      * * : * * : : : * . : : * * : * * : * * : * * * * * *
RIMO_ECOLI RQLARIKQWREICPELTLRSTFIVGFPGETEEDYFQMLLDFLKEARLDRVGCYFKYSPVEGA 342
RIMO_THEMA ELKKMLSSIRERFPDAVLRYTSIIVGFPGETEEDYFEELKQFVEEIQYFDKLGAFVYSDEBGT 333
RIMO_CHLPN QILGFLEKLRYAKVQVYIRSSVIVGFPGETYQEEFQELADFYIGEGWIDNLGIFLYSQEANT 351
RIMO_LEGFA NTLRLRIASWREICPDITLRSTFIVGFPGETEYEEFSELLAFLKEAQLDRVGCYFKYSPVEGA 336
      . : . * * : * : : * * * * * * * * * * * * * * * *
RIMO_ECOLI DANALPDQVPEEVEKEERWNRFMQLQQQYISAERLQEKVGREILVIIDEVDEEG---AIGRS 399
RIMO_THEMA VAFNLKEKVDPEMAKRRQEELLLQAEISNSRLDRYFVGKYKLKFLVEGKEG---KFLVGRYT 390
RIMO_CHLPN PAAELPDQIPEKVESRLKILSQIYQKRNVYDKHNQKLIYGEKIEAVIDNYHPETNLLLTARF 411
RIMO_LEGFA KANDLDPVSEDIKEERYHRFMQVQAEISRNKYLKYKNIGSTQTVLIDEITEDQ---IYTARS 393
      * * * : : . : : * . : : * . : : . * * : : : * *
RIMO_ECOLI MADAPEIDGAVYLNGETNV-KPGDILRVKVEHADEYDLWGSRV----- 441
RIMO_THEMA WTEAPEVDGVVYFVRGKG---KIGDFLEVVIKEHDEYDMWGSVI----- 430
RIMO_CHLPN YGQAPEVDPCIIVNEAKLVSHFGERCYFIETGTAGYDLVGRVVKYKSQNQALLKTSKA 468
RIMO_LEGFA KSDAPEIDGLVYLPKISGI-TVGSFAEAMITSDYDDYDLYGDLEYSLA----- 439

```

Figure II-2-2 : Alignement de séquences de RimO issues de quatre organismes différents. En jaune : les cystéines coordinant les centres [4Fe-4S] et en bleu : les résidus azotés conservés présents dans la poche catalytique de RimO *Tm*.

L'arginine R150 étant très peu conservée n'est pas retenue comme ligand potentiel de même que l'asparagine N13, pourtant assez conservée (avec un sous groupe possédant A13 à la place) mais trop éloignée du centre RS. La lysine K161, elle, est très conservée (avec un sous groupe homologue R161), tout comme l'arginine R268 (remplacée dans de rares cas par Q161). L'histidine H229 est assez bien conservée (remplacée par Y229 ou Q229). Enfin, concernant les résidus lysine K12 et glutamine Q192, on peut définir deux groupes : le premier (largement majoritaire) ayant K12 + Q192 et second ayant R12 + E192.

II-3) Choix des résidus mutés.

Sur la base de cette analyse plusieurs résidus peptidiques ont été sélectionnés comme candidats potentiels à l'origine de l'azote du couplage spin-azote, et éventuellement à l'origine de la présence d'un site atypique observée en Mössbauer. Cinq résidus ont été jugés suffisamment proches du centre RS et conservés dans les différentes séquences de RimO connues. Les résidus candidats sont les suivants :

- La lysine K12 : mutée en alanine (RimO K12A)
- La lysine K161 : mutée en alanine (RimO K161A)
- La glutamine Q192 : mutée en alanine (RimO Q192A)
- L'histidine H229 : mutée en phénylalanine (RimO H229F)
- L'arginine R268 : mutée en alanine (RimO R268A)

Parmi ces cinq acides aminés, il y en a deux qui se démarquent des autres, la lysine 161 et l'arginine 268. Leur proximité par rapport au centre radical-SAM et surtout leur très forte conservation en ont fait les premiers candidats testés.

II-4) Le mutant RimO K161A.

II-4-a. Production du mutant.

Ce simple mutant, qui possède une alanine en position 161 à la place de la lysine, est généré par mutagenèse dirigée de la protéine sauvage. Il est surproduit et purifié dans des conditions strictement similaires à celles utilisées avec RimO sauvage de *T. maritima*.

II-4-b. Etude biochimique du mutant RimO K161A.

La reconstitution chimique de l'enzyme est réalisée de la même façon que celle décrite pour RimO sauvage. Les spectres UV-visible avant et après reconstitution sont présentés ci-dessous (Figure II-4-b).

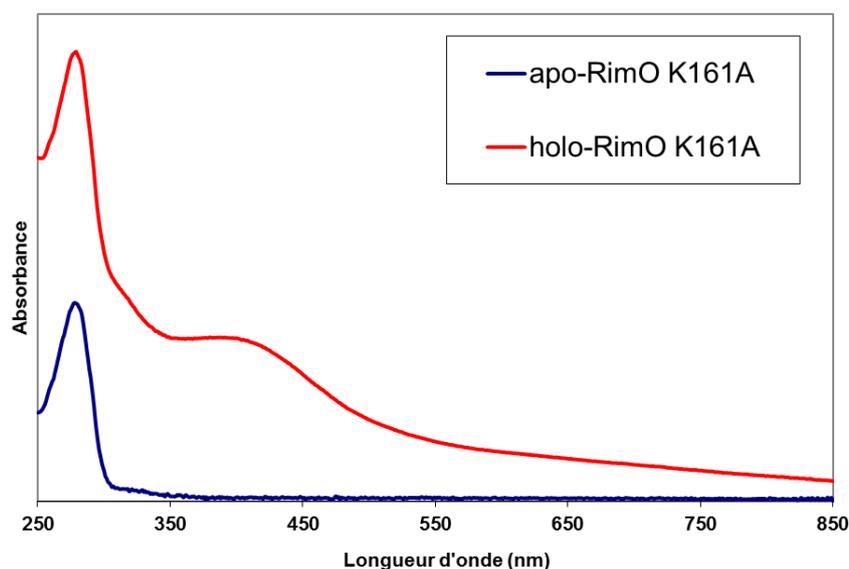
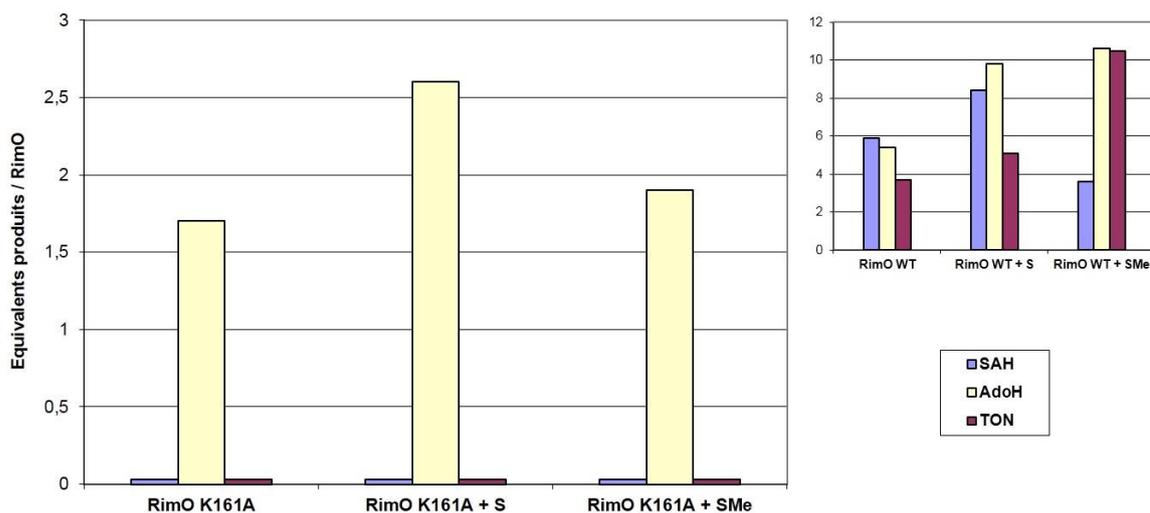


Figure II-4-b : Spectres UV-visible de reconstitution chimique de l'enzyme RimO K161A. Spectres initial (bleu) et final (rouge) de la reconstitution des centres [4Fe-4S] de l'enzyme RimO (mesures sur échantillon dilué 50 fois). Le milieu réactionnel contient 120 μM d'enzyme avec 1 mM de Fer (Fe^{II}), 1,2 mM de cystéine, 3 μM de CsdA (cystéine désulfurase A) et 2 mM de DTT. La réaction est réalisée à température ambiante sous atmosphère contrôlée d'azote.

Une fois reconstituée, la protéine est purifiée par filtration sur gel (Superdex 75) sous atmosphère inerte avant d'être analysée. Le dosage de Fer et de Soufre (6,8 Fe et 7,7 S) est en accord avec la présence de deux centres [4Fe-4S] mais, à la différence de RimO sauvage, le mutant ne contient qu'un léger excès de Soufre.

L'histogramme ci-dessous montre une comparaison des résultats obtenus pour les trois activités enzymatiques du mutant RimO K161A avec ceux obtenus avec RimO sauvage (Histogramme II-4-b).

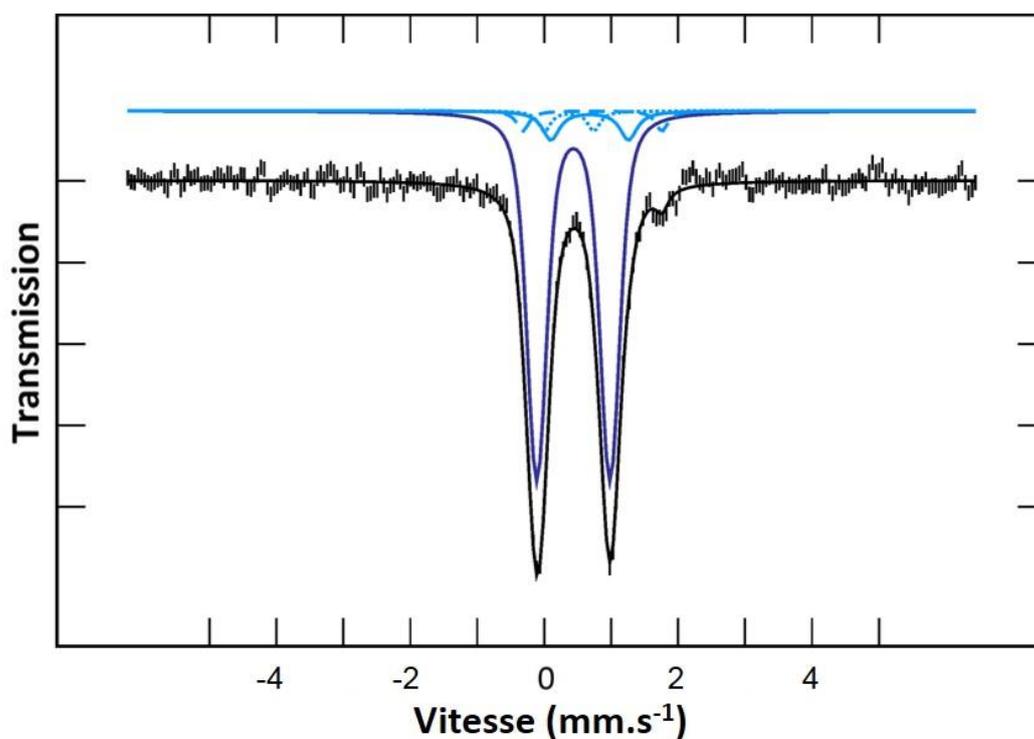


Histogramme II-4-b : Représentation graphique des résultats d'activité enzymatique de l'holo-enzyme RimO K161A. Les trois conditions différentes sont présentées de gauche à droite avec l'enzyme seule, l'enzyme avec un excès de sulfure et l'enzyme avec un excès de méthylsulfure. La production de SAH est représentée en bleu, celle de AdoH en beige et le nombre de cycle catalytique (TON) en violet.

Le mutant RimO K161A ne présente aucune activité méthylthiotransférase ou méthyltransférase (SAH non détecté). Par contre la production d'AdoH en absence ou en présence de sulfure et/ou de méthylsulfure montre que ce mutant a conservé son activité SAM réductase. Il est intéressant de noter que, contrairement à la protéine sauvage, le mutant est incapable d'utiliser le méthylsulfure et que ce dernier ne stimule que très légèrement l'activité SAM réductase.

II-4-c. Analyse par spectroscopie Mössbauer.

Pour l'analyse par spectroscopie Mössbauer, l'holoprotéine RimO K161A est reconstituée en présence de ^{57}Fe et obtenue à l'état oxydé ($2 \times [4\text{Fe-4S}]^{2+}$) (Figure II-4-c).



RimO ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Ratio	Aire (%)
[4Fe4S] ²⁺	0.44	1.09	0.30	4	62 %
[4Fe4S] ²⁺	0.68	1.16	0.31	2	38 %
site diff	0.37	0.73	0.22	1	
	0.72	2.08	0.22	1	

Figure II-4-c : Spectres Mössbauer expérimental et simulés de l'holo-enzyme RimO K161A à l'état oxydé. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 505 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre expérimental obtenu (en hachures noires) est, comme dans le cas de RimO sauvage, la somme de deux spectres correspondant chacun à un centre [4Fe-4S]²⁺. De fait, cet enregistrement est simulé (en noir) par un spectre composé de deux signaux. L'aire de chaque signal permet de déterminer directement la proportion de chaque type de centres [4Fe-4S] détectés. Le premier signal (en violet) a des paramètres ($\delta = 0,44$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,09$ mm/s) caractéristiques d'un centre [4Fe-4S]²⁺ contenant deux paires de fers à valence mixte (Fe^{2,5+}). Dans le cas de RimO K161A, ce site, dit « typique » représente 62% des centres [4Fe-4S]. Le second (en bleu clair) est dit « atypique » et représente 38% de l'échantillon. Il possède une paire de Fer à valence mixte ($\delta = 0,68$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,16$ mm/s) représentant 19% du Fer

des centres [4Fe-4S] et une autre paire à valences localisées Fe^{II}-Fe^{III} apparaissant sous la forme de deux doublets représentant également 19% de l'échantillon. Le premier doublet ($\delta = 0,72 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 2,08 \text{ mm.s}^{-1}$) est caractéristique d'une espèce Fe^{II} et le second ($\delta = 0,37 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 0,73 \text{ mm.s}^{-1}$) est caractéristique d'une espèce Fe^{III}. En résumé, avec ce mutant, le site radical SAM possède toujours une paire à valences localisées et ce n'est donc pas le résidu K161 qui provoque cette caractéristique spectroscopique. Cependant, il est intéressant de noter que les paramètres des doublets ferreux et ferriques sont légèrement différents de ceux de RimO sauvage (Site typique : $\delta = 0,45 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 1,04 \text{ mm.s}^{-1}$; Site atypique : $\delta = 0,44 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 1,22 \text{ mm.s}^{-1}$ + $\delta = 0,65 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 2,11 \text{ mm.s}^{-1}$ + $\delta = 0,31 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_q = 0,97 \text{ mm.s}^{-1}$).

II-4-d. Analyse par spectroscopies RPE CW et RPE-HYSCORE.

Le mutant K161A a été réduit sous atmosphère inerte en incubant la protéine reconstituée avec 10 équivalents molaires de dithionite de sodium pendant 10-30 min. La Figure II-4-d-1 montre l'allure du spectre RPE en bande X enregistré à 10 K.

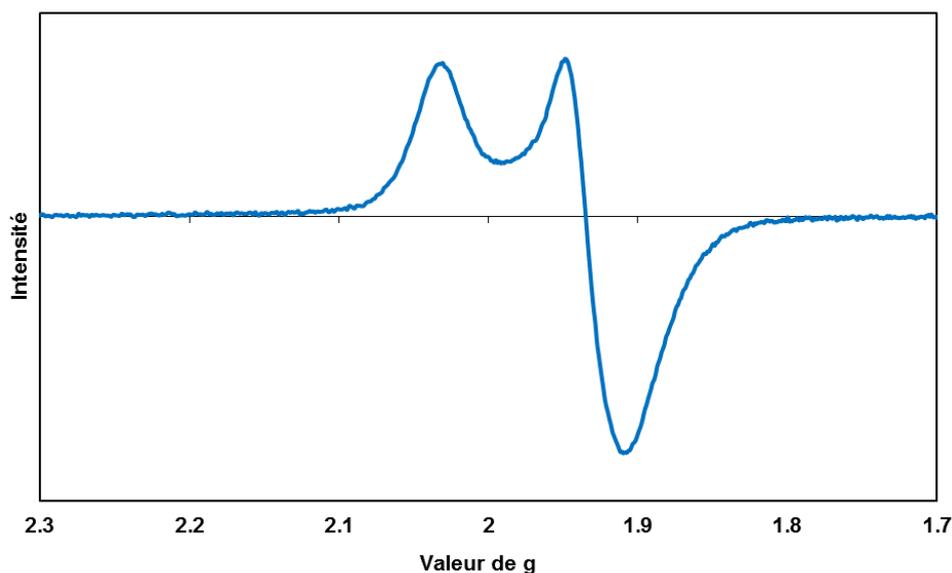


Figure II-4-d-1 : Spectre RPE CW en bande X de RimO K161A à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μL à 480 μM d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μW (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Le signal observé présente une symétrie pseudo-axiale avec un tenseur g proche de 2, caractéristique d'un système de spin $S = 1/2$. La quantification de spin contre un standard de Cu^{2+} enregistré dans les mêmes conditions montre que l'enzyme contient 1,8 spin/monomère, une valeur proche de la stœchiométrie et assez nettement supérieure à celle obtenue avec la protéine sauvage (1,2 spin/monomère).

Le même échantillon a été analysé par RPE pulsée en utilisant une séquence HYSCORE permettant la visualisation des couplages hyperfins entre un centre réduit et des atomes proches possédant un spin nucléaire non nul (Figure II-4-d-2).

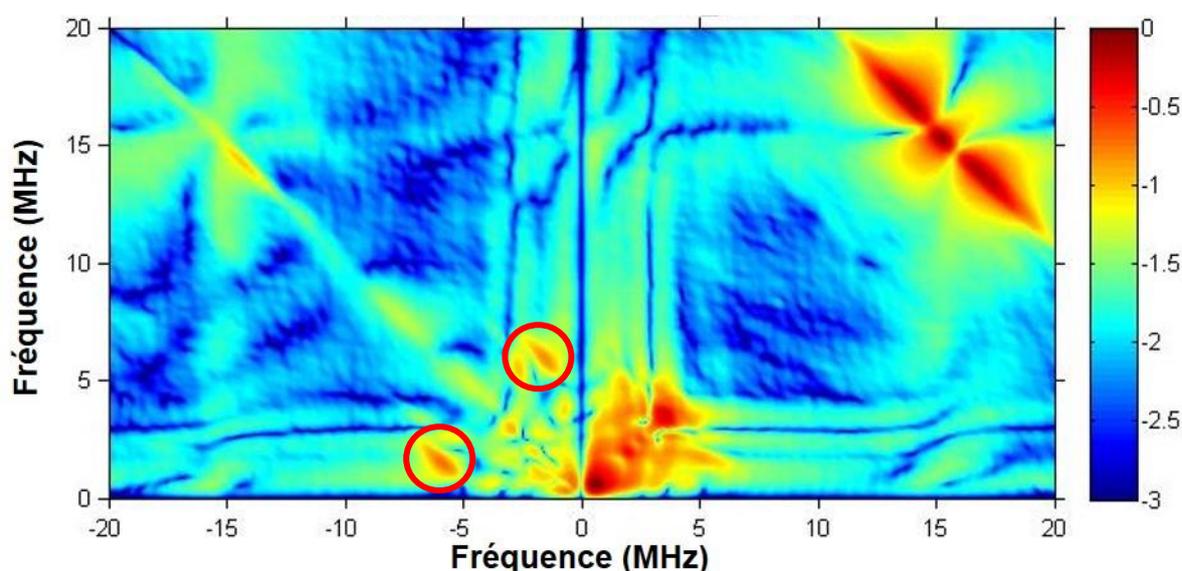


Figure II-4-d-2 : Spectre RPE HYSCORE de l'enzyme RimO K161A à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μL à 480 μM d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 8 K / Champ magnétique = 3590 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D. Entouré en rouge : tâches de corrélation N-spin issus des transitions dq-dq.

La figure montre clairement dans le quadrant $(-,+)$ la présence de taches de corrélations (entourées en rouge) similaires à celles observées avec l'enzyme sauvage et attribuées à un couplage fort spin- ^{14}N . Ce résultat permet d'exclure la Lysine 161 comme responsable du couplage observé dans l'enzyme sauvage.

II-4-e. Résumé des résultats obtenus avec RimO K161A.

Le mutant RimO K161A n'a pas d'activité méthylthiotransférase. Cette absence d'activité est très certainement due au fait qu'il est incapable de catalyser la méthylation du sulfure terminal du site Soufre, comme le montre l'absence de SAH. Cependant, il est probable que cette raison ne soit pas la seule puisque qu'il n'est pas non plus actif en présence de méthylsulfure. Nos résultats montrent que cette lysine a un rôle prépondérant dans l'activité de l'enzyme et sont en accord avec le fait que ce résidu est très fortement conservé dans les séquences de RimO disponibles à ce jour. Ils montrent de plus que l'effet de la mutation est circonscrit uniquement au site S. En effet le centre RS est lui toujours actif et reste avec une paire de Fer à valences localisées Fe^{II} - Fe^{III} dans l'état oxydé et un couplage spin-azote dans l'état réduit.

II-5) Le mutant RimO R268A.

II-5-a. Production du mutant.

Le mutant R268A est généré par mutagenèse dirigée de la protéine sauvage. Il est surproduit et purifié dans des conditions strictement similaires à celles utilisées avec RimO sauvage de *T. maritima*.

II-5-b. Etude biochimique du mutant RimO R268A.

Le mutant purifié sous forme *apo* est reconstitué en conditions anaérobies. Cette reconstitution chimique est suivie par mesure du spectre d'absorbance au cours du temps (Figure II-5-b) et l'enzyme reconstituée est purifiée par filtration sur gel (Superdex 75) en boîte à gants.

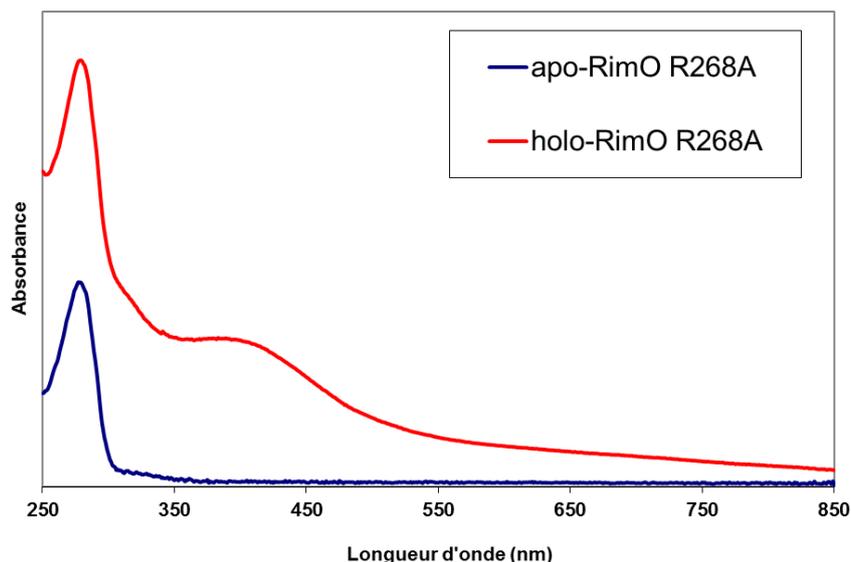
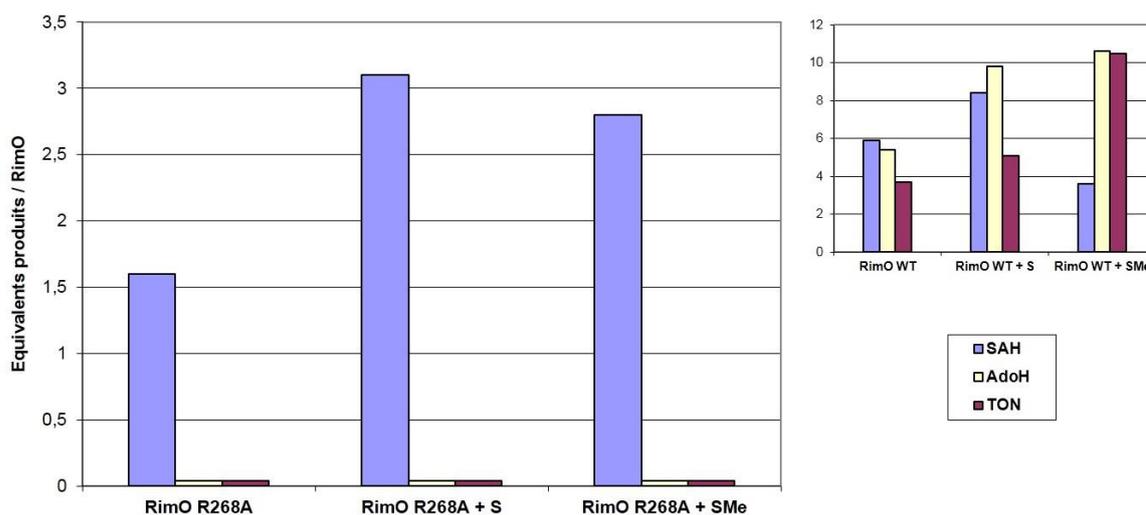


Figure II-5-b : Suivi spectroscopique UV-visible de la reconstitution chimique de l'enzyme RimO R268A. Spectres initial (bleu) et final (rouge) de la reconstitution des centres [4Fe-4S] de l'enzyme RimO (mesures sur échantillon dilué 50 fois). Le milieu réactionnel contient 120 μM d'enzyme avec 10 équivalents molaires de Fer (Fe^{II}), 12 de cystéine, 3 μM de CsdA (cystéine désulfurase A) et 2 mM de DTT. La réaction est réalisée à température ambiante sous atmosphère contrôlée d'azote.

Le dosage du Fer et du Soufre contenu dans l'*holo*-enzyme (7,1 Fe et 8,5 S par monomère) suggère la présence de deux centres [4Fe-4S]. Ce mutant contient un excès de Soufre légèrement plus important que le mutant K161A mais sensiblement moins élevé que celui obtenu avec RimO sauvage.

Les activités enzymatiques du mutant R268A ont été mesurées en utilisant comme substrat le peptide mimétique de la protéine S12. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous (Histogramme II-5-b).

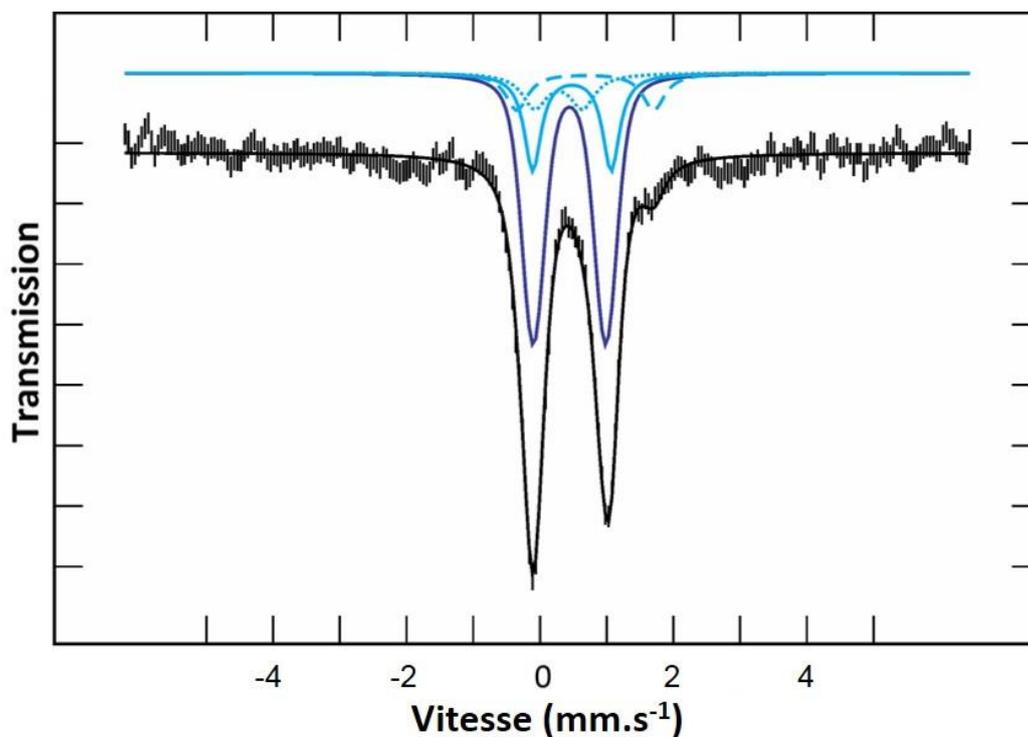


Histogramme II-5-b : Représentation graphique des résultats d'activité enzymatique de l'holo-enzyme RimO R268A. Les trois conditions différentes sont présentées de gauche à droite avec l'enzyme seule, l'enzyme avec un excès de sulfure et l'enzyme avec un excès de méthylsulfure. La production de SAH est représentée en bleu, celle de AdoH en beige et le nombre de cycle catalytique (TON) en violet.

De même qu'avec le mutant K161A, le mutant R268A ne présente pas d'activité MTTase, que ce soit seul ou en présence de sulfure ou méthylsulfure exogène. Cependant, il reste capable de réaliser des réactions de méthylation en utilisant la SAM. Comme le montre la production de SAH, l'activité méthyltransférase n'est pas impactée par la mutation. Par contre, il a totalement perdu son activité SAM réductase et ceci explique son absence d'activité MTTase. Il faut noter que cet acide aminé est très proche du centre RS, il est donc probablement impliqué dans une interaction avec la molécule de SAM qui est utilisée lors de la réaction de réductolyse.

II-5-c. Analyse par spectroscopie Mössbauer.

Les deux clusters $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ du mutant R268A ont été reconstitués en utilisant du sulfate ferreux ^{57}Fe et l'holo-enzyme analysée par spectroscopie Mössbauer après purification sous atmosphère inerte (Figure II-5-c).



RimO ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Ratio	Aire (%)
[4Fe4S] ²⁺	0.44	1.09	0.36	4	62 %
[4Fe4S] ²⁺	0.48	1.18	0.31	2	38 %
site diff	0.28	0.72	0.44	1	
	0.68	2.05	0.40	1	

Figure II-5-c : Spectres Mössbauer expérimental et simulés de l' *holo*-enzyme RimO R268A à l'état oxydé. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 310 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre expérimental obtenu (en hachures noires) est simulé (en noir) par deux signaux correspondant à deux centres [4Fe-4S]²⁺ différents. Le premier (en violet), représentant 62% du Fer contenu dans les centres [4Fe-4S], est « typique » avec deux paires de fers à valence mixte (Fe^{2,5+}) ($\delta = 0,44$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,09$ mm.s⁻¹). Le second (en bleu clair), représentant 38% de l'échantillon, est « atypique ». Il possède une paire de Fer à valence mixte ($\delta = 0,48$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,18$ mm.s⁻¹) et une autre paire à valences localisées Fe^{II}-Fe^{III} ($\delta = 0,68$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 2,05$ mm.s⁻¹ pour le Fe^{II} et $\delta = 0,28$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 0,72$ mm.s⁻¹ pour le Fe^{III}). Ces paramètres, bien que différents de ceux mesurés avec RimO sauvage,

sont cependant très proches. Cette analyse suggère que le résidu R268 n'est pas responsable de la localisation de valence observée dans l'enzyme sauvage.

II-5-d. Analyse par spectroscopies RPE CW et RPE HYSCORE.

Comme précédemment, le mutant R268A est réduit par le dithionite de sodium en boîte à gants et est ensuite analysé par spectroscopie RPE CW (Figure II-5-d-1).

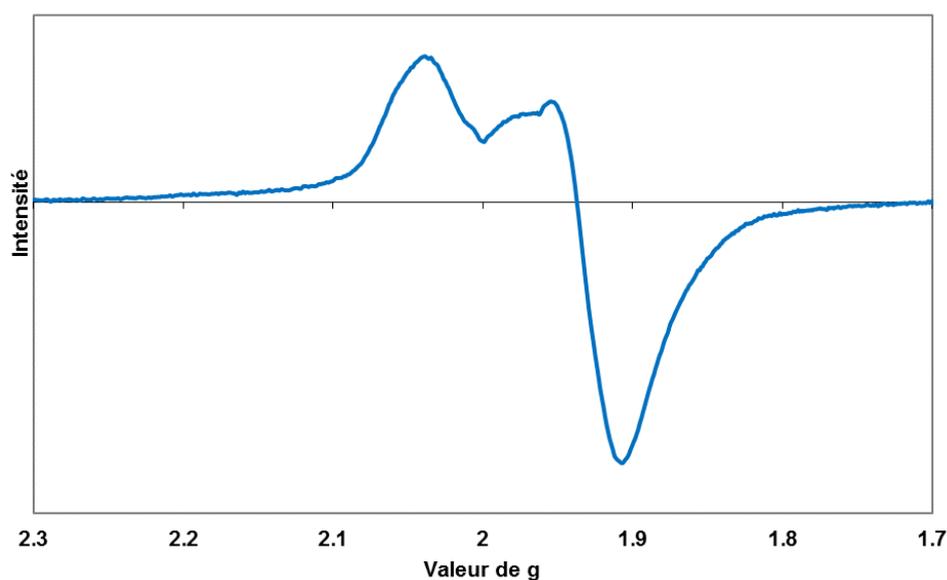


Figure II-5-d-1 : Spectre RPE CW en bande X de RimO R268A à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μL à 295 μM d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μW (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Le signal RPE du mutant R268A est caractéristique d'un système de spin $S = \frac{1}{2}$ de type pseudo-axial (valeurs de g autour de $g = 2$). La quantification de spin donne 0,9 centre réduit par monomère de protéine, ce qui est relativement faible. Le signal obtenu est composite et son allure est très différente de celle du signal vu avec RimO sauvage. La mutation semble donc avoir provoqué des modifications importantes de la structure électronique d'au moins un des deux centres paramagnétiques. Un point important à signaler avec ce mutant est que le faible taux apparent de réduction peut poser des problèmes d'interprétation. En effet, une quantité de spin inférieure à la moitié de la somme théorique peut à l'extrême signifier qu'un seul centre a été réduit et dans ce cas l'analyse par RPE HYSCORE devra prendre en compte cette possibilité.

Ce même échantillon a été analysé par RPE HYSCORE et le spectre obtenu est le suivant (Figure II-5-d-2).

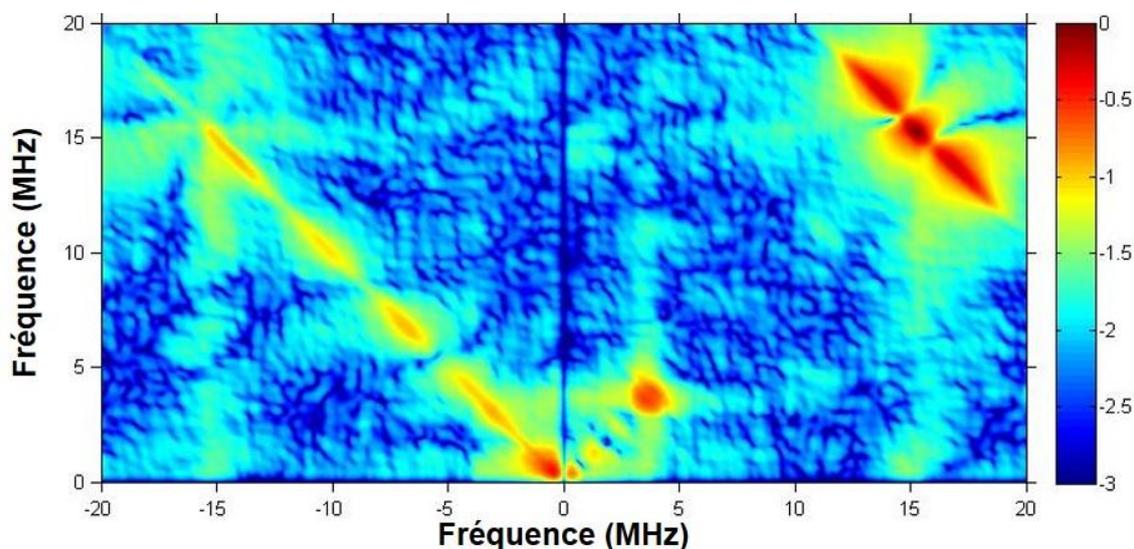


Figure II-5-d-2 : Spectre RPE HYSCORE de l'enzyme RimO R268A à l'état réduit. L'échantillon analysé contient 80 μ L à 295 μ M d'holoprotéine réduite. La réduction est réalisée par incubation avec 10 équivalents de dithionite pendant 30 minutes. Les conditions d'enregistrements de ce spectre sont : Température = 8 K / Champ magnétique = 3585 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformé de Fourier 2D.

Dans le quadrant des forts couplages (-,+), les taches de corrélations caractéristiques d'un couplage spin- ^{14}N ont totalement disparues. Ce résultat semble donc indiquer que c'est un azote du résidu R268 (parmi les trois de la chaîne latérale et/ou celui de la chaîne principale) qui est responsable de ce couplage. Cependant, comme indiqué plus haut, le faible taux de réduction de l'enzyme empêche toute conclusion définitive. En effet, si un des centres n'est pas réduit il devient alors invisible en spectroscopie RPE HYSCORE.

II-5-e. Résumé des résultats obtenus avec RimO R268A.

Le mutant RimO R268A ne présente aucune activité MTTase. Plus précisément, cette perte d'activité est due à son incapacité à générer le radical adénosyle à partir de la SAM et donc à activer le substrat. Cependant, le centre S est, lui, toujours actif comme le montre la production de SAH. Dans ce cas aussi nos résultats sont en accord avec le fait que l'importance mécanistique de tel ou tel résidu est corrélée avec sa forte conservation dans les séquences de RimO connues. En l'état nos résultats semblent indiquer que les deux caractéristiques spectroscopiques de RimO (site différencié et pentacoordination) ne seraient

pas liées. Cependant le faible taux de réduction du mutant R268A ne permet pas de conclusion définitive.

II-6) Discussion.

Le but de l'étude décrite dans ce chapitre était d'identifier l'origine de la présence de deux caractéristiques spectroscopiques observées avec RimO sauvage, à savoir : un site [4Fe-4S] atypique et un azote coordonné à un centre [4Fe-4S]. Dans le chapitre précédent, il avait été montré que ces particularités spectroscopiques étaient associées au centre RS. La suite logique était d'identifier l'azote lié à ce centre vu par RPE HYSCORE et donc en milieu réducteur. Plusieurs acides aminés azotés ont été sélectionnés sur la base de la structure de l'holoprotéine et des alignements de séquences de protéines RimO de différents organismes. Ces résidus ont été mutés et analysés, en commençant par les deux candidats les plus prometteurs, la lysine K161 et l'arginine R268.

Le mutant RimO K161A présente une activité MTTase nulle mais son activité de réductolyse de la SAM est maintenue. Cette mutation affecte le site auxiliaire Soufre qui perd son activité méthyltransférase et reste inactif même en présence de méthylsulfure. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces observations. La première est que ce mutant serait incapable de fixer un ion sulfure ou méthylsulfure sur le site de coordination libre du cluster S. Cette incapacité résulterait de l'absence de charge positive portée par la lysine et dont la fonction serait de positionner un anion (S^{2-} ou CH_3S^-) de façon à ce qu'il puisse se coordonner au centre [4Fe-4S]. Le fait que ce mutant ne contienne pas d'excès significatif de Soufre est en accord avec cette hypothèse. La seconde hypothèse est basée sur la quantification de spin $\frac{1}{2}$ mesurée en RPE. En effet, les centres [4Fe-4S] du mutant K161A sont presque totalement réduits en présence de 10 équivalents molaires de dithionite de sodium (1.8 spin/monomère). A l'état réduit le centre additionnel est incapable d'oxyder un anion méthylsulfure et dans ces conditions un couplage radicalaire avec le substrat activé devient impossible. Ainsi, selon cette hypothèse, la lysine K161 modulerait le potentiel redox du centre Soufre et son absence maintiendrait ce centre à l'état réduit dans les conditions réductrices utilisées lors des tests d'activité enzymatique. Il existe un précédent dans la littérature montrant que la présence d'une lysine à proximité d'un centre [4Fe-4S] peut avoir une influence importante sur son potentiel redox. C'est le cas de la fumarate réductase B

(FrdB), une enzyme qui catalyse la réduction du fumarate couplée à l'oxydation du pool de quinones au sein du complexe de la chaîne respiratoire (Lancaster et al. 1999). Il a été montré que la présence de la lysine K228 de la FrdB déplaçait le potentiel redox du centre [4Fe-4S] de cette enzyme d'environ +100 mV. Sans cette lysine l'enzyme est inactive (Cheng et al. 2013).

Dans le cas discuté ici, le très bon taux de réduction pourrait également s'expliquer par une plus forte proportion de spin $\frac{1}{2}$ elle-même due à un changement dans l'état de symétrie du centre [4Fe-4S]. En effet plus un système est asymétrique plus l'état $S = \frac{1}{2}$ est favorisé par rapport à un état de spin $\frac{3}{2}$, et cette symétrie est directement relié à l'environnement proche du centre [4Fe-4S] (Solomon et al. 2013).

Sur le plan spectroscopique, le mutant K161A ne montre pas de grandes différences avec la protéine RimO sauvage. Le spectre RPE CW ressemble au spectre de l'enzyme sauvage mais la quantification du signal $S = \frac{1}{2}$ est significativement plus élevée. Le site atypique vu par analyse Mössbauer est toujours présent, tout comme l'azote fortement couplé au centre RS visible sur le spectre RPE HYSCORE. Le résidu K161 n'est donc pas à l'origine des caractéristiques spectroscopiques. Cependant, il faut noter que les proportions des sites typiques et atypiques ne sont jamais les mêmes, ce qui devrait être le cas en théorie. Le fait que la proportion en site atypique soit inférieure à celle attendue peut signifier que le centre RS peut se trouver sous la forme typique dans certaines circonstances ou que ce centre est moins stable, donc absent, dans une portion des protéines de l'échantillon.

Le mutant RimO R268A ne présente pas non plus d'activité MTTase, comme le mutant précédent. Par contre cette absence d'activité est ici due à la perte de l'activité SAM réductase. Cette perte d'activité peut avoir plusieurs origines. La première serait que R268 serve à positionner le substrat S12-D89. Sans ce résidu le substrat ne serait pas reconnu ou mal placé dans le site catalytique. La seconde serait que R268 contrôle l'état d'oxydation du centre RS au cours de la catalyse. Sans ce résidu le centre RS resterait à l'état oxydé et la réductolyse de SAM ne serait pas possible. R268 pourrait ainsi être impliqué dans la régulation de la double utilisation de la SAM en modulant l'activité du site RS, la première molécule de SAM servant d'agent méthylant et la seconde d'activateur radicalaire.

Du point de vue spectroscopique, l'analyse RPE CW de RimO R268A montre une modification significative de l'allure du spectre par rapport à RimO sauvage ce qui peut refléter des changements structuraux importants. Bien que le site atypique soit toujours présent, le couplage spin-azote a complètement disparu. Cependant la relativement faible quantité de centre réduit ayant un spin $\frac{1}{2}$ (0,9 par protéine) empêche toute interprétation définitive. En effet, la disparition du couplage hyperfin avec l'azote peut avoir trois raisons. Soit le résidu R268 est responsable de ce couplage, soit l'absence d'un résidu modifie l'environnement d'un autre résidu azoté qui serait, lui, directement responsable de ce couplage. Soit, enfin, le centre [4Fe-4S] du mutant R268A n'est pas réductible dans les conditions utilisées ce qui le rendrait indétectable en RPE.

Les résultats présentés dans ce chapitre impliquent que la présence du site atypique au sein du centre RS ne serait pas liée à la coordination d'un ligand azoté (R268). Cependant on ne peut exclure qu'il en soit ainsi puisque chacune des deux particularités spectroscopiques est observée dans un état redox différent, oxydé pour le site atypique et réduit pour l'azote coordonné.

Il est important de noter que dans tous les cas étudiés ici où une localisation de charge $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ a été observé dans un centre [4Fe-4S], il y a une sous-stœchiométrie du centre atypique. En théorie il devrait y avoir 50% de centre typique et 50% d'atypique mais ce n'est jamais le cas, la proportion de centre ayant une paire localisé se situe entre 30 et 40%. Ceci peut s'expliquer de deux façons, soit le site atypique est partiellement dégradé et donc une partie des protéines ne possèdent que le seul centre typique, soit le centre RS existe sous deux formes, une localisée et une délocalisée. Une telle sous-stœchiométrie a également été décrite pour l'enzyme Dph2 qui ne possède que 15% de paire localisée mais cette observation n'a pas été commentée ou expliquée (Zhang et al. 2010).

Bien que l'importance de plusieurs résidus du site actif de RimO ait été mise en évidence dans cette étude, il est prématuré, à ce stade, de formuler un mécanisme catalytique précis concernant cette enzyme. Des analyses spectroscopiques plus détaillées sont nécessaires, notamment en ce qui concerne son comportement en présence de SAM. C'est cette étude spectroscopique qui fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

Etude spectroscopique de l'enzyme RimO en présence de SAM.

Le système réactionnel de l'enzyme RimO nécessite la présence de quatre éléments, en plus de l'enzyme : une source d'électrons, le co-substrat SAM, le substrat S12-D89 et une source de Soufre. Dans les deux chapitres précédents, l'enzyme sauvage et différentes formes modifiées de l'enzyme ont été analysées seules et en présence d'une source d'électrons. Dans ce chapitre nous examinons l'impact de la SAM sur les caractéristiques spectroscopiques de RimO dans ses deux états redox.

III-1) Etude par spectroscopie UV-visible de RimO sauvage.

Les centres [4Fe-4S] présentent en spectroscopie UV-visible une bande d'absorption caractéristique à 400 nm. L'influence de la SAM a donc été étudiée dans un premier temps avec cette technique. A l'état oxydé, une incubation en présence de 10 équivalents molaires de SAM ne modifie pas le spectre d'absorbance (spectres non montrés) contrairement à ce qui est observé avec d'autres enzymes RS, comme par exemple la biotine synthase (Ugulava et al. 2001). En présence d'un excès de dithionite qui maintient une pression réductrice sur le système et de 10 équivalents molaires de SAM, les spectres réalisés avant et après l'ajout de SAM montrent une très légère différence (Figure III-1-a).

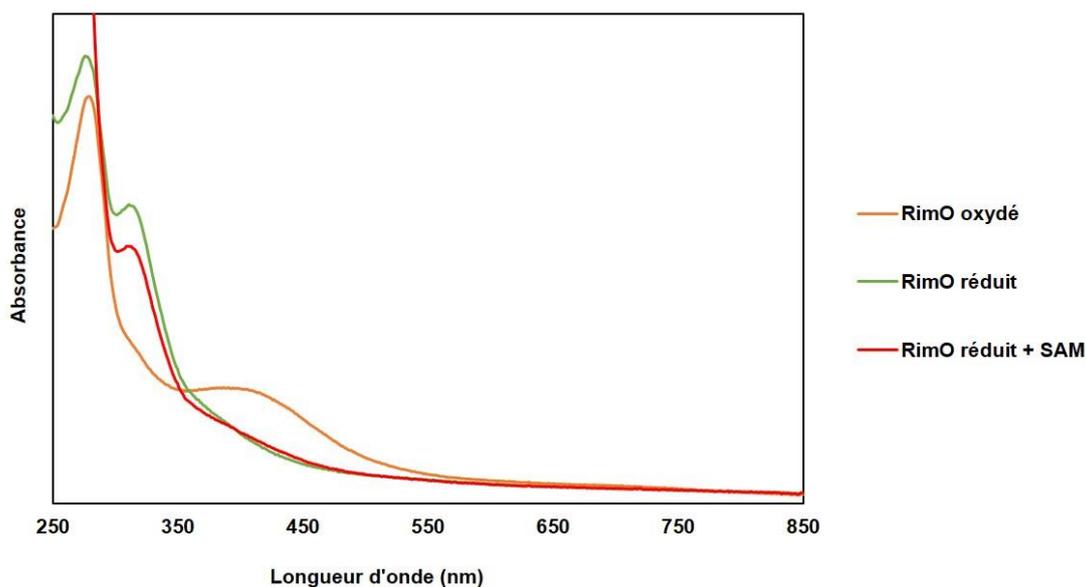


Figure III-2-a : Spectres d'absorbance UV-visible de l'holo-enzyme RimO oxydée (en orange), réduite (en vert) et réduite en présence de SAM (en rouge). La protéine (200 μ M) est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 30 min.

En présence de SAM l'absorbance à 400 nm augmente faiblement, suggérant une réoxydation partielle de l'enzyme. Cette modification du spectre est instantanée et ne varie pas, même après 30 min d'incubation. La bande d'absorbance à 314 nm due au dithionite diminue de façon significative après l'ajout de SAM, ce qui traduit une consommation du réducteur alors que cette bande d'absorbance était stable avant l'ajout. La saturation de l'absorbance en deçà de 290 nm est due à la SAM (λ max= 260 nm, ϵ = 15.4 mM⁻¹.cm⁻¹).

III-2) Etude RPE CW et RPE HYSCORE en présence de SAM.

III-2-a. L'enzyme RimO sauvage.

Deux échantillons identiques ont été préparés à partir d'une solution de protéine réduite, le premier ne contenant que l'enzyme et le second contenant en plus un excès (x 10) de SAM. Les deux échantillons sont incubés 20 min à température ambiante puis analysés en RPE CW (Figure III-1-a-1).

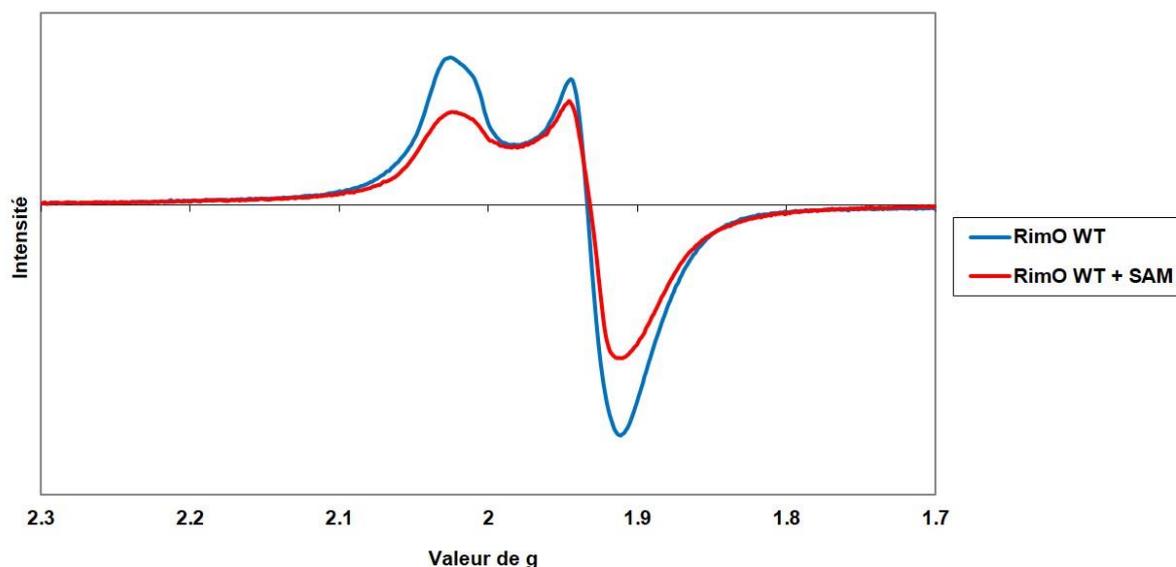


Figure III-2-a-1 : Spectres RPE CW de l' *holo*-enzyme RimO réduite seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Les deux signaux possèdent un spin $S = \frac{1}{2}$ (région $g = 2$) et sont de type pseudo-axial. L'allure des spectres et les valeurs de g sont similaires avec et sans SAM. Cependant, il y a une forte diminution de l'intensité du signal de l'échantillon contenant la SAM, alors que les deux échantillons ont la même concentration en protéine. La quantification de spin montre une perte de 50% du signal avec 0,6 centre réduit par protéine en présence de SAM.

L'analyse par RPE HYSCORE de l'enzyme réduite avec la SAM est présentée ci-dessous. Pour faciliter l'interprétation du spectre, la SAM utilisée est marquée au niveau de l'azote de la partie méthionine par un ^{15}N permettant, en cas de coordination, de la distinguer facilement de l'azote ^{14}N ligand du cluster RS décrit dans les chapitres précédents. (Figure III-2-a-2).

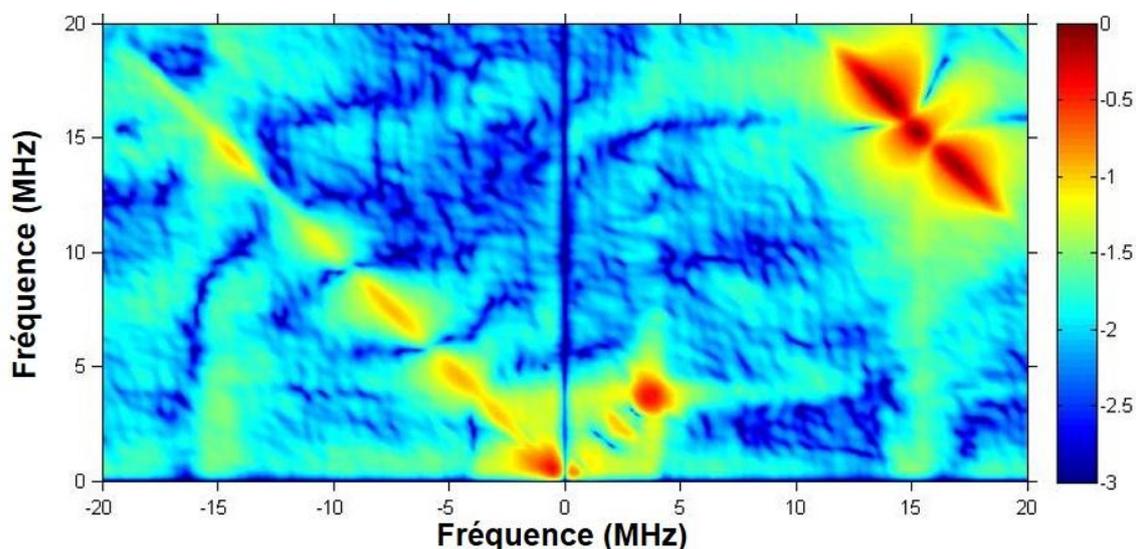


Figure III-2-a-2 : Spectre RPE HYSCORE de l' *holo*-enzyme RimO réduite en présence de SAM ¹⁵N. La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ¹⁵N pendant 20 min. Conditions d'enregistrement : Température = 8 K / Champ magnétique = 3585 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

La Figure III-2-a-2 montre que le quadrant (+,-) ne présente plus aucune tache de corrélation. Non seulement le couplage spin/¹⁴N observable avec l'enzyme seule n'est plus détecté mais aucun couplage spin/¹⁵N n'apparaît. Le fait de ne pas observer de couplage spin/¹⁵N est inattendu car pour toutes les enzymes RS étudiées avec cette technique leur interaction avec la SAM se manifeste par un couplage fort spin/azote d'environ 6-9 MHz (Hubrich et al. 1996 ; Gambarelli et al. 2005). L'absence de couplage entre le cluster et l'un ou l'autre azote suggère que le cluster RS est à l'état oxydé et de ce fait invisible par cette technique.

III-2-b. L'enzyme RimO-S.

Le mutant RimO-S ne contient que le centre Soufre auxiliaire, dont on a vu qu'il n'est pas responsable des caractéristiques spectroscopiques de la protéine sauvage. Seul le spectre RPE CW a été enregistré pour l'échantillon réduit puis incubé en présence de SAM (Figure III-2-b-1).

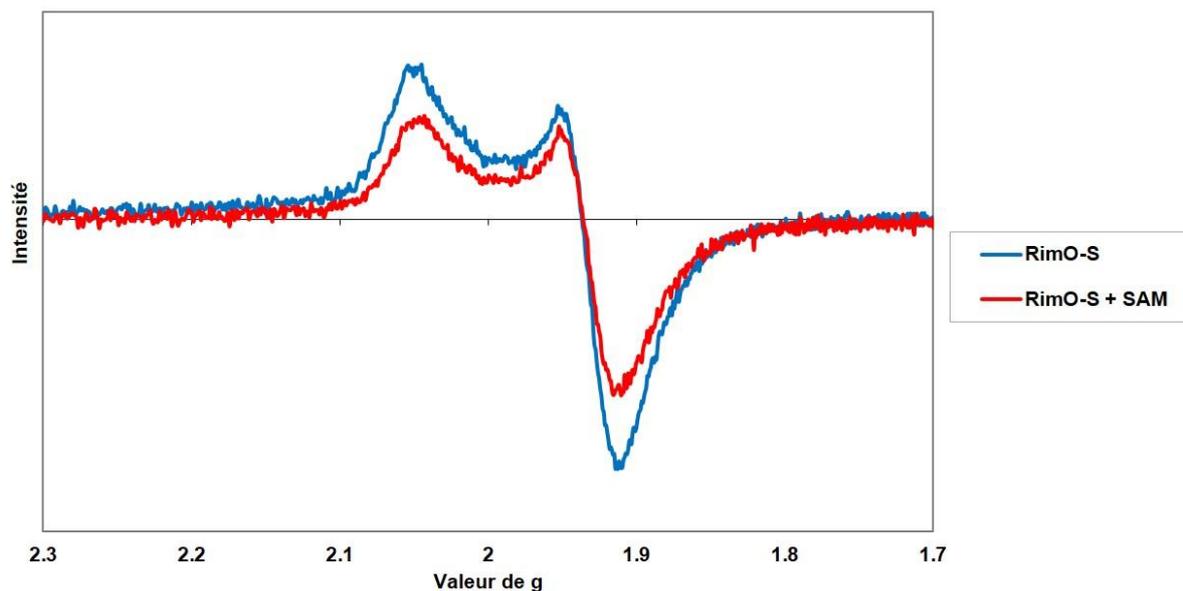


Figure III-2-b-1 : Spectres RPE CW de l' *holo*-enzyme RimO-S réduite seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Comme dans le cas de la protéine RimO sauvage, les deux signaux avec et sans SAM possèdent un spin $S = \frac{1}{2}$. Dans ce cas aussi il y a une diminution de l'intensité du spectre RPE d'environ 50%. Le signal en présence de SAM correspond à 0,2 centre réduit par monomère de protéine. L'allure du spectre n'est pas modifiée par l'ajout de SAM.

III-2-c. L'enzyme RimO-RS.

Le triple mutant RimO-RS ne contient que le centre Radical-SAM qui possède une paire de Fer localisée Fe^{II} - Fe^{III} à l'état oxydé et présente un azote coordonné à l'état réduit. La protéine réduite a été incubée avec la SAM et analysée par RPE CW et RPE HYSOCORE (Figures III-2-c-1 & III-2-c-2).

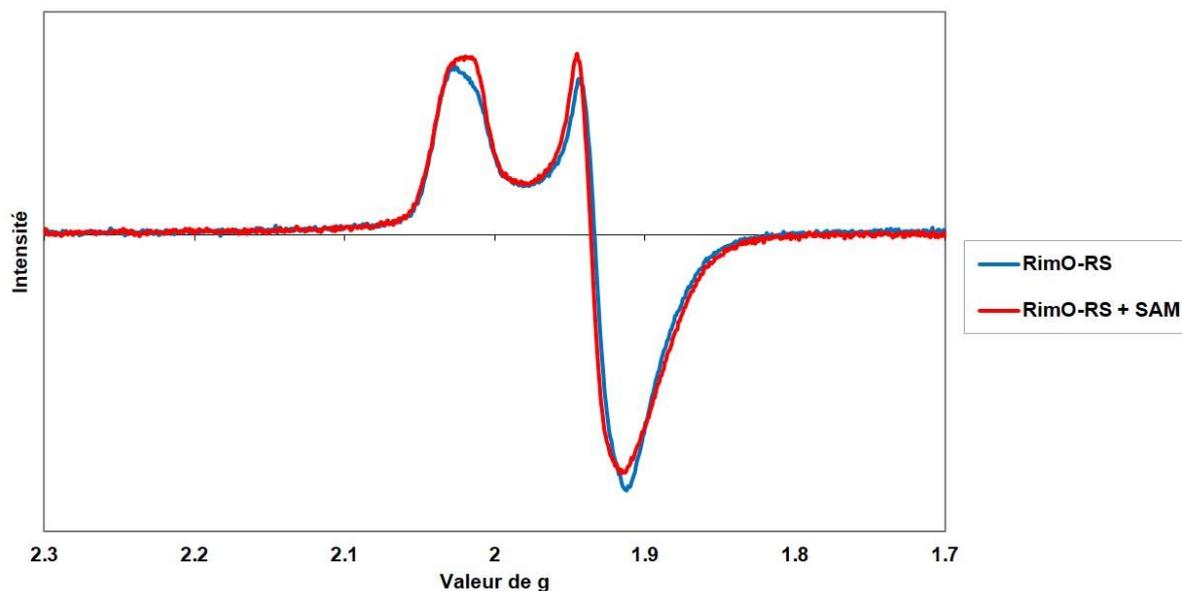


Figure III-2-c-1 : Spectres RPE CW de l' *holo*-enzyme RimO-RS réduite seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Conditions d'enregistrement : Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Contrairement à la souche sauvage, l'addition de SAM sur la protéine RimO-RS ne provoque pas de diminution du signal RPE CW mais un léger changement d'allure du spectre et des valeurs de g, ce qui suggère une interaction entre la SAM et centre RS.

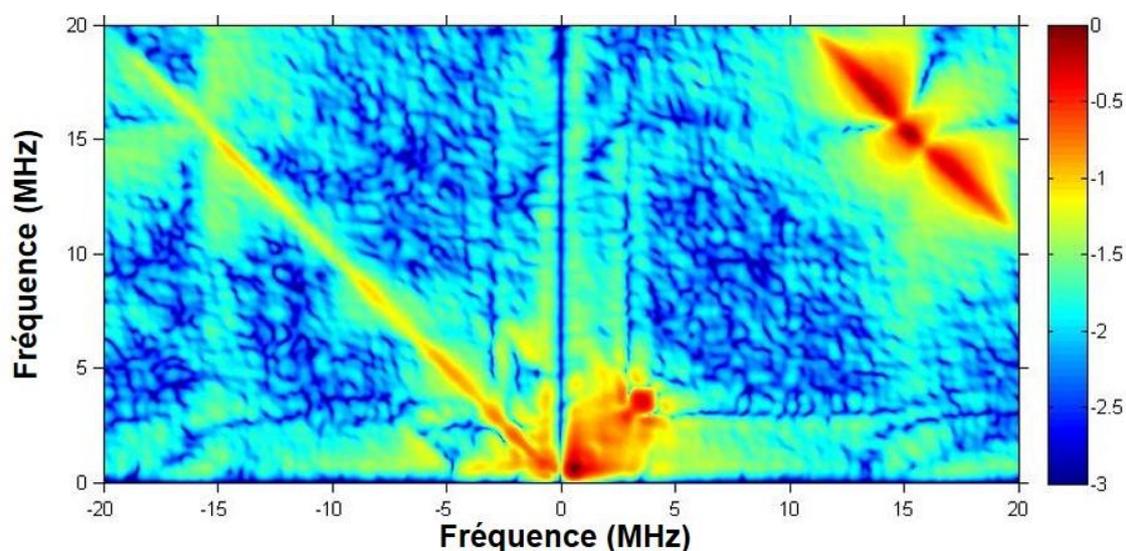


Figure III-2-c-2 : Spectre RPE HYSCORE de l' *holo*-enzyme RimO-RS réduite en présence de SAM ^{15}N . La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ^{15}N pendant 20 min. Conditions d'enregistrement : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

L'enregistrement RPE HYSORE ne montre pas de changement significatif en présence de SAM. Il n'y a pas de disparition du couplage spin azote. Tout se passe comme si ce mutant n'interagissait pas avec la SAM.

Dans leur ensemble ces résultats montrent que les deux triple mutants ne constituent pas de bons modèles des deux centres Fer-soufres de la protéine sauvage. A contrario, ils laissent entendre qu'avec celle-ci les deux centres acquièrent des propriétés particulières résultant probablement de leur proximité spatiale.

III-2-d. L'enzyme RimO K161A.

Le spectre RPE CW a été enregistré avec et sans SAM dans les mêmes conditions que pour RimO sauvage et les triple mutants. Les spectres sont présentés ci-dessous (Figure III-2-d-1).

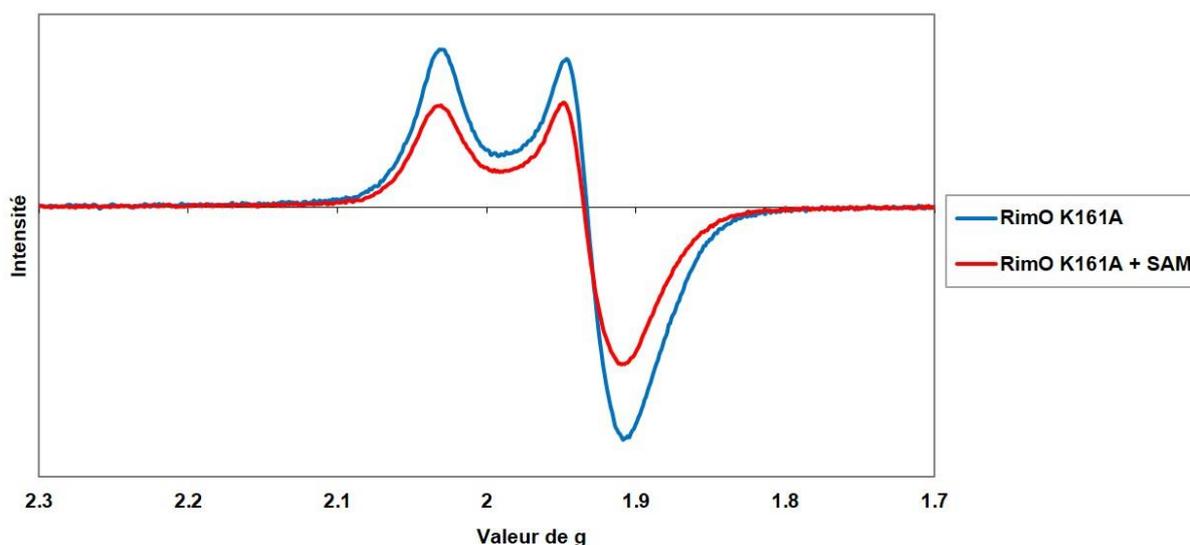


Figure III-2-d-1 : Spectres RPE CW de l'holo-enzyme RimO K161A réduite seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10^5 .

Le signal obtenu avec le mutant seul est différent de celui observé avec l'enzyme sauvage pour la composante g_z ici plus symétrique. L'ajout de SAM ne change pas l'allure

générale du signal mais provoque une diminution de l'intensité du spectre RPE CW d'environ 50%, similaire à ce qui est observé avec la protéine sauvage.

Le spectre RPE HYSORE du mutant RimO K161A avec la SAM a également été enregistré (Figure III-2-d-2).

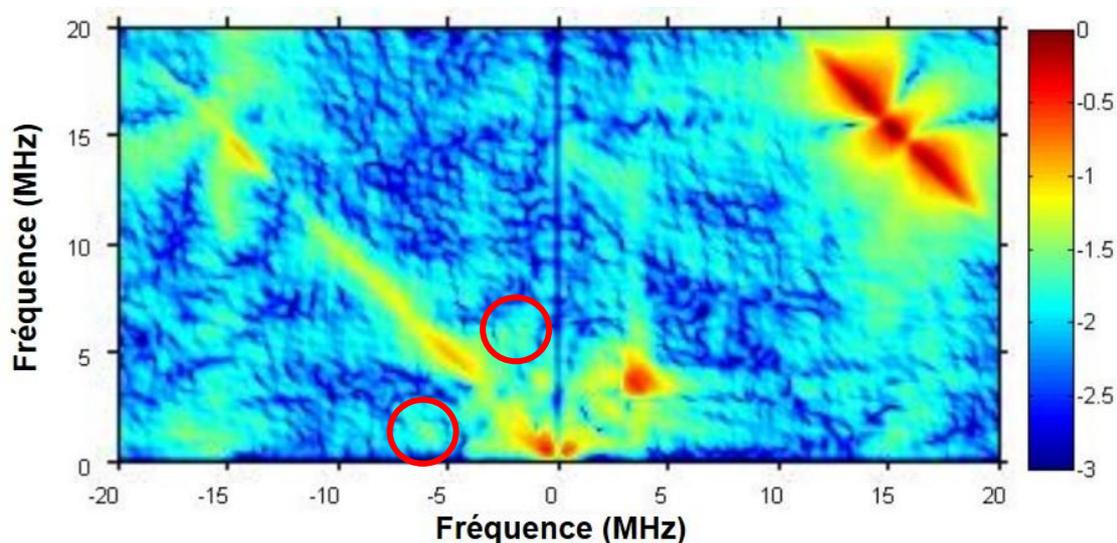


Figure III-2-d-2 : Spectre RPE HYSORE de l'holo-enzyme RimO K161A réduite en présence de SAM ^{15}N . La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ^{15}N pendant 20 min. Conditions d'enregistrements : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformé de Fourier 2D. Entouré en rouge : tâches de corrélation résiduelles issus du couplage fort N-spin.

La Figure III-2-d-2 montre la disparition presque complète des taches de corrélation spin- ^{14}N présentes en absence de SAM. Les taches résiduelles de couplages spin- ^{14}N (entourées en rouge) suggèrent qu'une faible partie de l'enzyme n'est pas en interaction avec la SAM. De même qu'avec la protéine sauvage on n'observe aucun couplage spin- ^{15}N .

Nous avons vu dans le Chapitre II que le mutant RimO K161A n'a pas d'activité MTTase mais que son centre RS est toujours fonctionnel. La mutation affecte le centre S qui devient inactif, même en présence de méthylsulfure exogène. En présence de SAM, le spectre RPE HYSORE perd la quasi-totalité des taches de corrélation spin-azote. L'absence de toute interférence dans cette région du spectre nous a permis de tester les propriétés du centre S par l'utilisation d'un méthyl sélénure marqué, $^{77}\text{SeMe}$. Le méthylsélénure est utilisé comme analogue du méthylsulfure (le Sélénium et le Soufre ont des propriétés physico-chimiques très

proches). L'isotope ^{77}Se est visible en RPE HYSCORE lorsqu'il est en interaction avec un centre paramagnétique. Le spectre RPE HYSCORE du mutant K161A en présence de SAM et de méthyl sélénure marqué ($^{77}\text{SeMe}$) est présenté ci-dessous (Figure III-2-d-3).

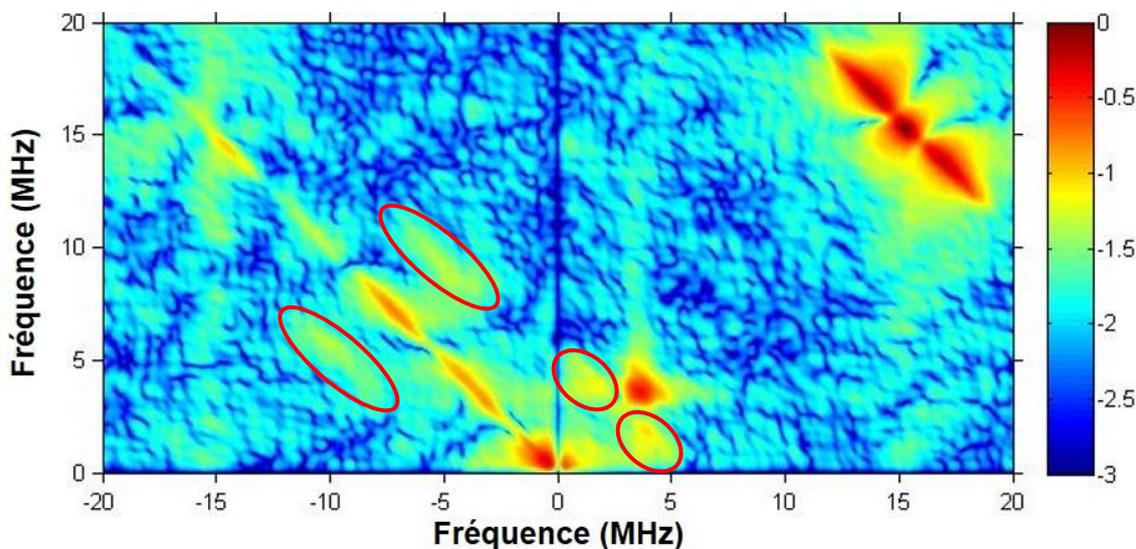


Figure III-2-d-3 : Spectre RPE HYSCORE de l'holo-enzyme RimO K161A réduite en présence de SAM ^{15}N et de $^{77}\text{SeMe}$. La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ^{15}N puis 10 équivalents molaires de $\text{Na}^{77}\text{SeMe}$, avec une incubation de 20 min après chaque ajout. Les taches de corrélation spin- ^{77}Se sont encerclées en rouge.

Le spectre RPE HYSCORE montre la présence de plusieurs taches de corrélations spin- ^{77}Se (entourées en rouge) correspondant à la coordination du méthylsélénure sur le centre S. Ceci prouve que ce mutant RimO K161A, bien qu'inactif, est toujours capable de fixer du $^{77}\text{SeMe}$ et par extension du méthylsulfure également. L'absence d'activité méthyltransférase du mutant K161A pourrait être expliquée soit par son incapacité à lier le substrat S12-D89 soit par un potentiel redox incompatible avec l'oxydation postulée du ligand méthylsulfure en radical.

III-2-e. L'enzyme RimO R268A.

Les enregistrements RPE CW et RPE HSCORE ont été effectués sur des échantillons du mutant RimO R268A réduit et incubé en présence de SAM (Figures III-2-e-1 et III-2-e-2).

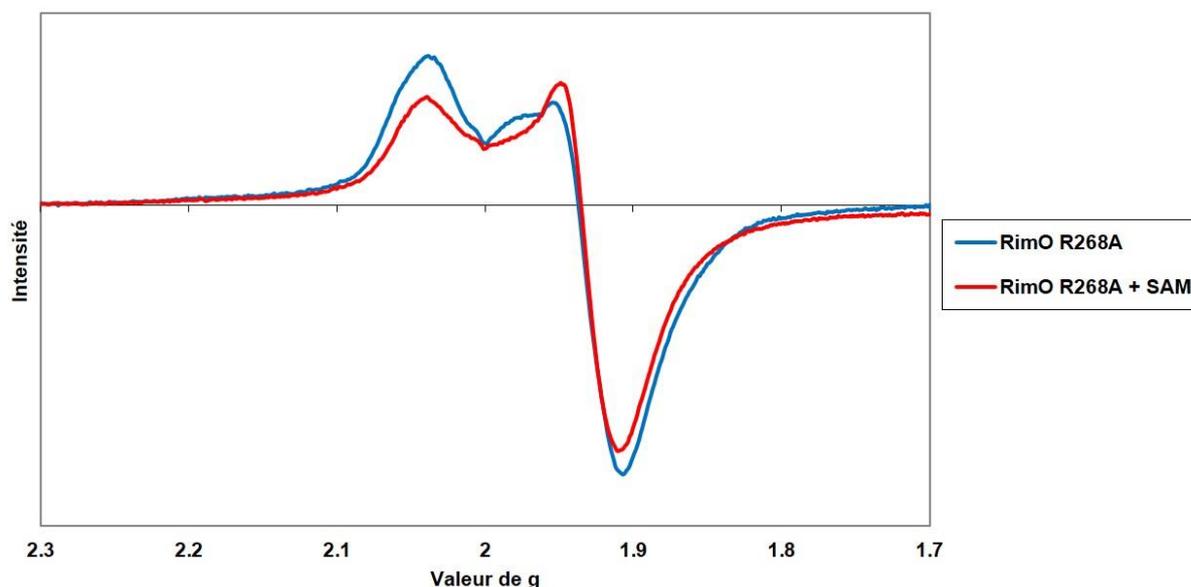


Figure III-2-e-1 : Spectres RPE CW de l'holo-enzyme RimO R268A réduite seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Une partie de cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ¹⁵N pendant 20 min. Conditions d'enregistrement: Température = 10 K / Puissance = 250 μ W (29 dB) / Fréquence = 9,65 GHz / Modulation = 10 G / Gain = 10⁵.

Après incubation avec la SAM, le mutant RimO R268A réduit présente une importante modification du signal RPE CW. On observe une diminution d'environ 15% de l'intensité du signal plus faible que celle observée dans le cas de RimO sauvage. Ces données indiquent que le mutant RimO R268A interagit bien avec la SAM, alors même qu'il ne présente aucune activité SAM réductase.

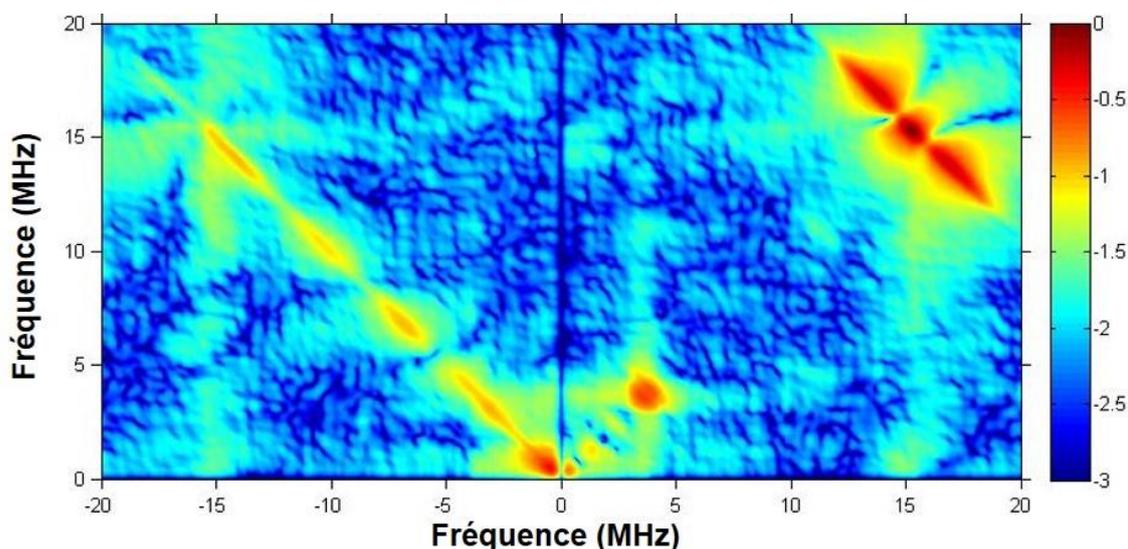


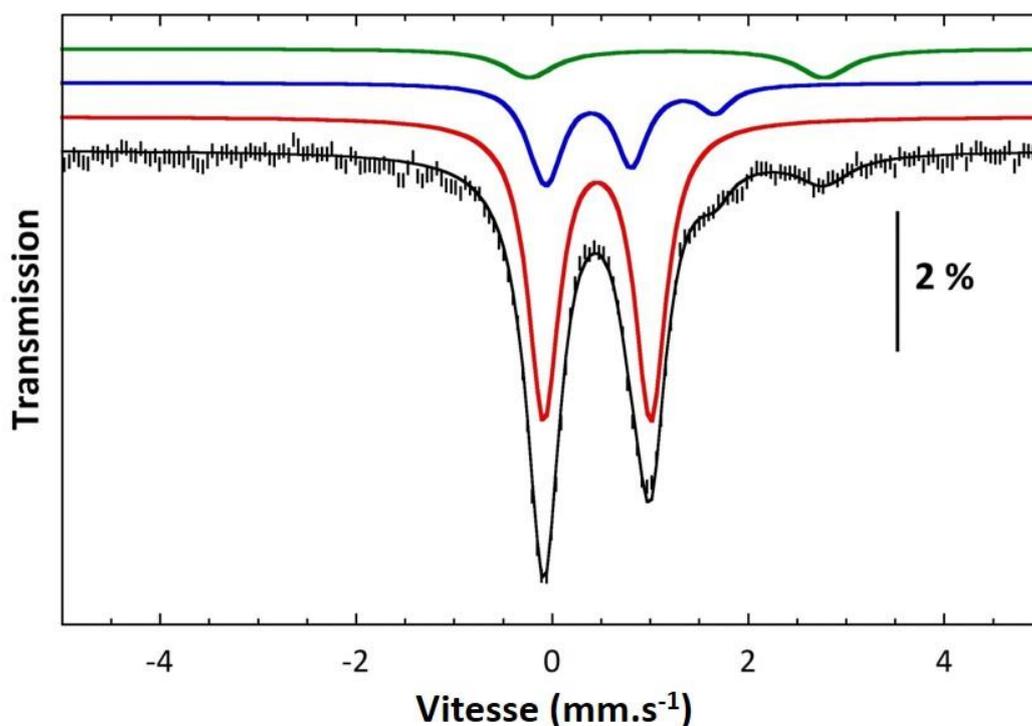
Figure III-2-e-2 : Spectre RPE HYSCORE de l' *holo*-enzyme RimO R268A réduite en présence de SAM ¹⁵N. La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Cette préparation est incubée avec 10 équivalents molaires de SAM ¹⁵N pendant 20 min.. Conditions d'enregistrements : Température = 8 K / Champ magnétique = 3585 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformé de Fourier 2D.

En présence de SAM-¹⁵N on n'observe aucune modification du spectre RPE HYSCORE. Compte tenu des modifications importantes du signal RPE CW vues plus haut et interprétées comme la preuve d'une interaction avec la SAM, l'absence de signal HYSCORE suggère que cette interaction a conduit à l'oxydation du centre RS rendant la technique HYSCORE non applicable pour ce cluster.

III-3) Etude Mössbauer en présence de SAM.

III-3-a. L'enzyme RimO sauvage à l'état oxydé.

Le spectre Mössbauer de l'holoprotéine RimO contenant ses deux centres [4Fe-4S]²⁺ et incubée en présence de SAM (x 10) est présentée en Figure III-3-a-1.



RimO ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S]²⁺	0.45	1.09	66 %
[4Fe4S]²⁺ différencié	0.38 0.37	0.85 0.85	24 %
Fe^{II}	1.26	3.01	10 %

Figure III-3-a-1 : Spectre Mössbauer expérimental et simulé de l' *holo*-enzyme RimO de *T. maritima* à l'état oxydé en présence de SAM. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 290 μ M d'holoprotéine et 10 équivalents molaires de SAM. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

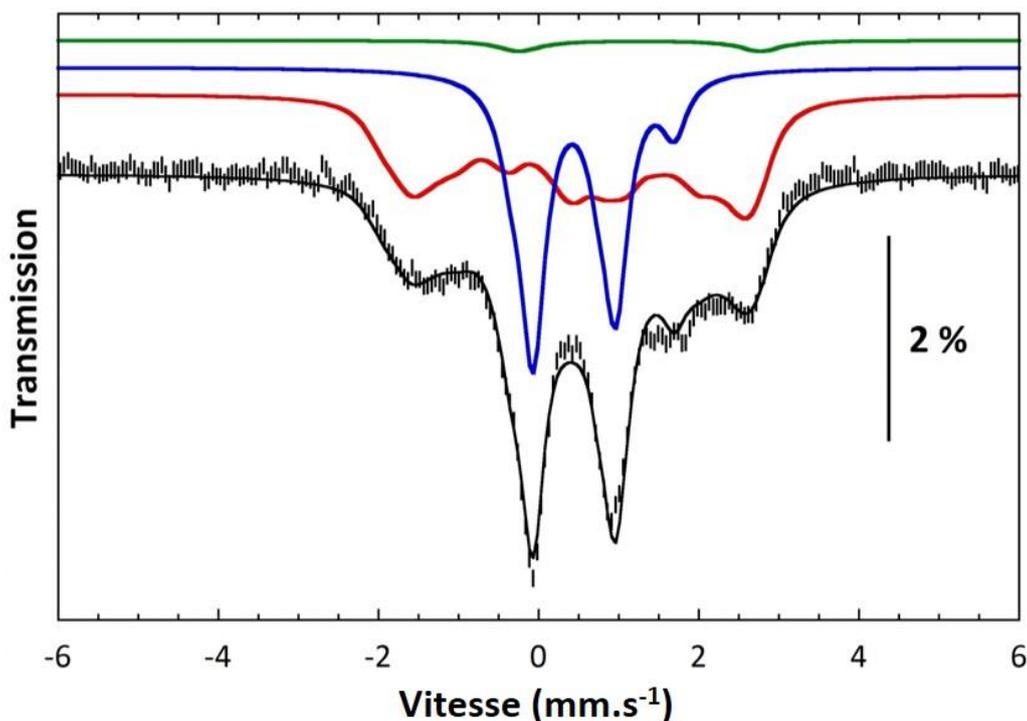
Par rapport à l'enzyme seule, ce spectre présente une modification significative des paramètres du centre RS (atypique) accompagnée d'une dégradation de ce centre d'environ 25%. Ces observations montrent qu'à l'état oxydé le centre RS de RimO interagit avec la SAM. Un tableau comparatif des paramètres Mössbauer δ et ΔE_Q obtenus en présence ou en absence de SAM est présenté ci-dessous (Tableau III-3-a-2).

Centre Fe-S	δ (mm.s ⁻¹)		ΔE_Q (mm.s ⁻¹)		Proportion (%)	
	RimO seul	RimO + SAM	RimO seul	RimO + SAM	RimO seul	RimO + SAM
[4Fe-4S]²⁺ Typique	0.45	0.45	1.04	1.09	68%	66%
[4Fe-4S]²⁺ Différencié	0.49	0.38	1.22	0.85	32%	24%
	0.31	0.37	0.97	0.85		
	0.65	0.74	2.11	1.94		

Tableau III-3-a-2 : Comparatif des paramètres Mössbauer δ et ΔE_Q déterminés pour l'enzyme RimO sauvage à l'état oxydé en absence et en présence de SAM.

III-3-b. L'enzyme RimO sauvage à l'état réduit.

L'enzyme RimO réduite, lorsqu'elle est étudiée par spectroscopie Mössbauer, présente un taux de réduction de 86%. Les simulations montrent que l'échantillon est composé de deux type de centres réduits présentant des caractéristiques différentes (voir chapitre I) Cette protéine réduite a été incubée en présence de 10 excès de SAM et analysée par spectroscopie Mössbauer (Figures III-3-a-3).



RimO red	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S] ¹⁺	0.63	1.88	58 %
	0.53	1.44	
[4Fe4S] ²⁺	0.45	1.03	38 %
différencié	0.34	0.83	
	0.67	2.04	
Fe ^{II}	1.26	3.01	2.5 %

Figure III-3-b : Spectre Mössbauer expérimental et simulé de l' *holo*-enzyme RimO de *T. maritima* à l'état réduit en présence de SAM. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 260 μ M d'holoprotéine réduite par 10 équivalents molaire de dithionite et contient 10 équivalents molaires de SAM. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

La Figure III-3-b montre l'apparition d'un doublet (en bleu) de forte intensité au centre du spectre, caractéristique d'un centre [4Fe-4S]²⁺. Ce doublet (38% du signal) peut être simulé en considérant trois jeux de paramètres, le premier ($\delta = 0,45$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,03$ mm/s) caractéristique d'une paire délocalisée Fe^{2.5+}, le second ($\delta = 0,34$ mm/s et $\Delta E_Q = 0,83$ mm/s) caractéristique d'un Fe³⁺ et le troisième ($\delta = 0,67$ mm/s et $\Delta E_Q = 2,04$ mm/s) caractéristique d'un Fe²⁺. Les centres Fe-S restants (58%) correspondent à un centre [4Fe-4S]¹⁺ caractérisé par deux jeux de paramètres ($\delta_1 = 0,63$ mm/s, $\delta_2 = 0,53$ mm/s, $\Delta E_{Q1} = 1,88$ mm/s, $\Delta E_{Q2} = 1,44$ mm/s, respectivement). L'ajout de SAM sur l'enzyme RimO réduite provoque donc une réoxydation spécifique du centre RS.

III-3-c. L'enzyme RimO R268A.

Le mutant RimO R268A a également été analysé à l'état réduit par spectroscopie Mössbauer, seul et en présence de SAM. Les spectres présentés ci-dessous ont été simulés, permettant de calculer la proportion d'espèces oxydées et réduites. (Figure III-3-c).

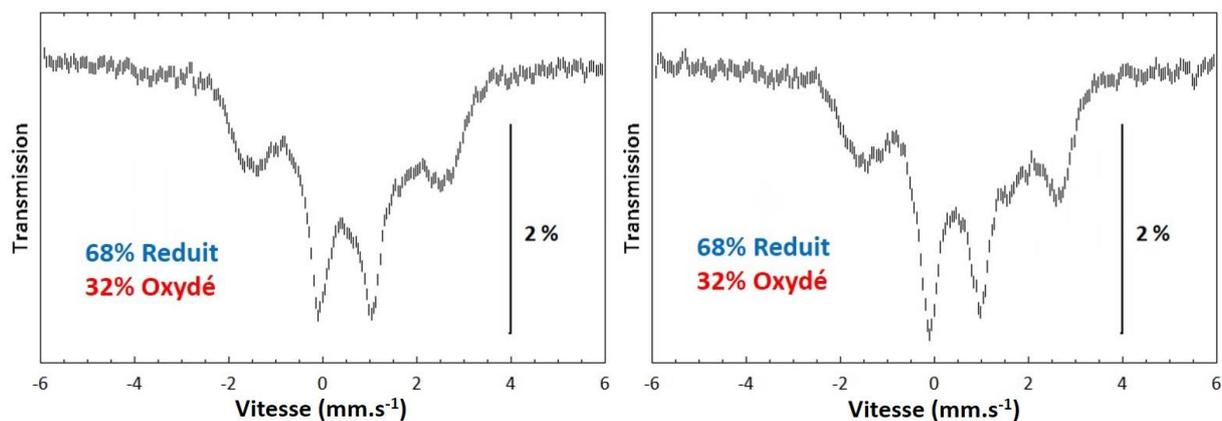


Figure III-3-c : Spectres Mössbauer expérimentaux du mutant RimO R268A réduit en absence (à gauche) et en présence de SAM (à droite). L'échantillon analysé contient 400 μL à 250 μM d'holoprotéine réduite pas 10 équivalents molaires de dithionite et pour le spectre de droite incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Les spectres ont été enregistrés à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire aux rayons γ .

Dans le cas du mutant RimO R268A, il n'y a pas de changement significatif après l'ajout de SAM. L'enzyme seule n'est réduite que partiellement, à 68% et en présence de SAM ce taux reste inchangé. Ce comportement s'oppose à celui de l'enzyme sauvage qui se réduit mieux et se réoxyde en présence de SAM. La présence de l'arginine R268 au niveau du site actif a donc un effet très important sur le potentiel redox d'au moins un centre [4Fe-4S].

III-4) Etude électrochimique.

Les expériences d'électrochimie sur l'*holo*-enzyme RimO ont été réalisées en collaboration avec les Dr. Nicolas Duraffourg (CEA, LCBM) et Vincent Fourmond (CNRS, BIP). Les mesures sont effectuées sous atmosphère inerte en boîte à gants en utilisant un système de microélectrodes opérant sur une goutte de protéine (environ 20 μL) et en absence de tout médiateur (Voir Matériels & Méthodes VII). La technique utilisée est la voltammétrie à base carrée (SWV). Les cycles sont composés d'un balayage de -0,9 V à -0,4 V (Référence Ag/AgCl) par pas de 10 mV suivi d'un autre en sens inverse. A chaque pas le différentiel de courant $i_{\text{ox}}-i_{\text{red}}$ est calculé pour un « pulse » de 30 mV appliqué avec une fréquence de 10 Hz.

III-4-a. L'enzyme RimO sauvage.

L'*holo*-enzyme RimO sauvage a été analysée seule et en présence de SAM entre -0,9 V et -0,4 V (Figure III-4-a).

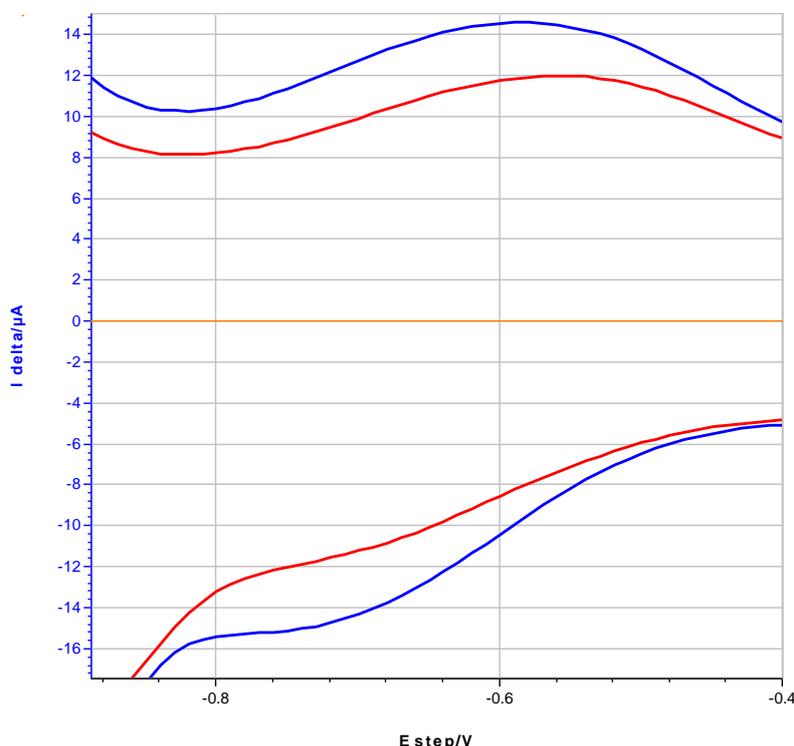


Figure III-4-a : Voltampérogramme à base carrée de l'*holo*-enzyme RimO sauvage seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). L'échantillon est déposé sur une électrode d'or sous la forme de goutte de 20μL contenant 1 mM de protéine dans un tampon Tris-HCl en absence (bleu) ou en présence (rouge) de 10 équivalents molaires de SAM. Vitesse de balayage : 100 mV/s. Référence : Ag/AgCl.

L'enregistrement ci-dessus montre un balayage oxydatif (de -0,9 V à -0,4 V) (en haut) et un balayage réductif (de -0,4 V à -0,9 V) (en bas). Une vague est détectée correspondant à un système redox réversible ayant un potentiel proche de -650 mV (soit -450 mV/ENH). Il n'y a qu'un seul système visible alors que la protéine contient 2 centres [4Fe-4S] ce qui pourrait indiquer que leurs potentiels redox sont très proches voire identiques. Les petites variations visibles au début des balayages sont des artefacts dus à l'initiation de la mesure. La lecture des courbes à bas potentiel est obscurcie par la réponse du tampon Tris utilisé.

En présence de SAM, il y a toujours une seule vague et donc un seul système détecté. L'intensité du signal plus faible ne permet qu'une estimation du potentiel redox estimé à -610 mV (-410 mV/ENH), soit un décalage de + 40 mV par rapport à l'enzyme seule.

III-4-b. L'enzyme RimO-S.

Le triple mutant RimO-S a été analysé dans les mêmes conditions que précédemment, seul et avec un excès de SAM (Figures III-4-b).

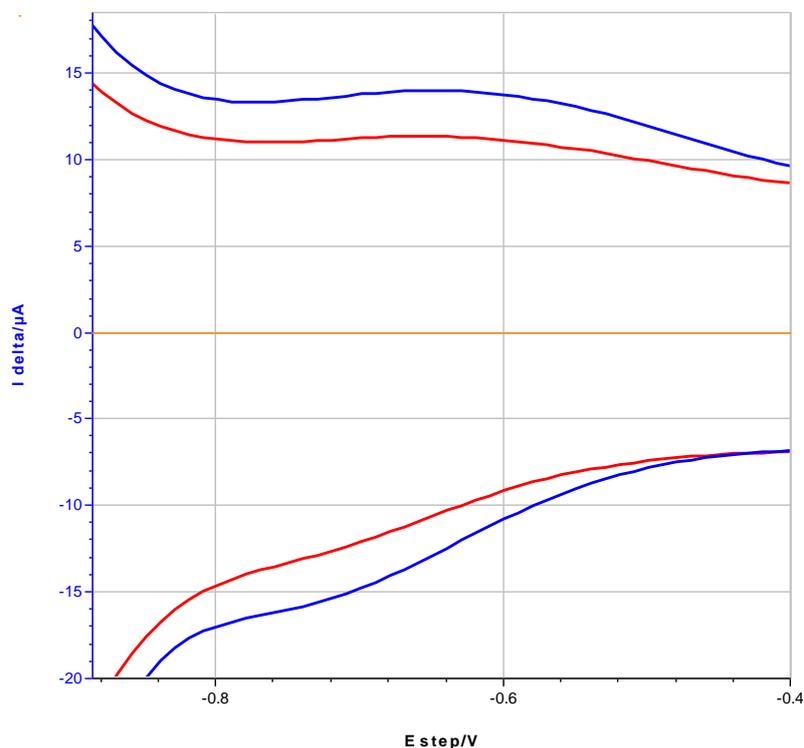


Figure III-4-b : Voltampérogrammes à base carrée de l'holo-enzyme RimO-S seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). L'échantillon est déposé sur une électrode d'or sous la forme de goutte de 20µL contenant 350 µM de protéine dans un tampon Tris-HCl. Dans le cas du signal rouge l'échantillon contient 10 équivalents molaires de SAM. Vitesse de balayage : 100 mV/s. Référence : Ag/AgCl

Les voltampérogrammes obtenus montrent un système redox pseudo réversible qui a un potentiel de -695 mV (-495 mV/ENH), environ -55 mV par rapport au sauvage. En présence de SAM, aucune modification apparente du potentiel n'est détectée mais on observe une baisse significative de l'intensité du signal.

III-4-c. L'enzyme RimO-RS.

Les résultats obtenus avec le mutant RimO-RS sont présentés en Figure III-4-c. Le potentiel redox mesuré pour le système redox concerné est -635 mV (-435 mV/ENH), environ +15 mV par rapport au sauvage. L'ajout de SAM provoque un déplacement de la vague oxydative de +40 mV et un déplacement de -55 mV de la vague réductive. De même qu'avec

le mutant RimO-S, l'ajout de SAM provoque une diminution importante de l'intensité du signal.

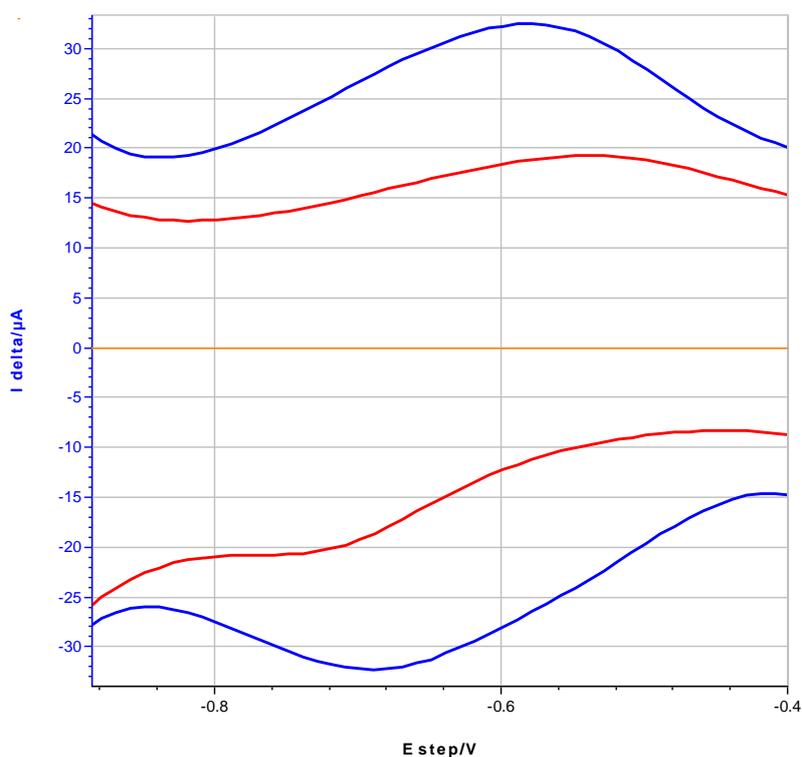


Figure III-4-c : Voltampérogramme à base carrée de l'holo-enzyme RimO-RS seule (en bleu) et en présence de SAM (en rouge). L'échantillon est déposé sur une électrode d'or sous la forme de goutte de 20 μL contenant 200 μM de protéine dans un tampon Tris-HCl. Dans le cas du signal rouge l'échantillon contient 10 équivalents molaires de SAM. Vitesse de balayage : 100 mV/s. Référence Ag/AgCl.

III-4-d. Résumé des résultats obtenus en électrochimie.

L'enzyme RimO sauvage seule présente un système redox pseudo réversible proche de -450 mV/ENH. L'ajout de SAM provoque une forte diminution du signal et un décalage du potentiel vers -410 mV/ENH.

RimO-S possède un système redox pseudo réversible vers -495 mV/ENH. Avec ce mutant, il n'y a pas de décalage de potentiel après ajout de la SAM, seulement une diminution significative de l'intensité du signal détecté.

RimO-RS présente un système quasi réversible à -435 mV. En présence de SAM l'intensité du signal diminue fortement mais, surtout, le système devient quasi irréversible avec une vague aller à -370 mV et une vague retour à -515 mV.

III-5) Analyse de l'enzyme RimO marquée à l'azote ^{15}N .

L'enzyme RimO sauvage marquée à l'azote ^{15}N a été reconstituée et analysée par spectroscopie RPE HYSCORE. L'utilisation de l'azote ^{15}N permet de ne visualiser que les couplages hyperfins spin-azote. Contrairement à l'azote ^{14}N , qui possède un spin nucléaire entier, donc un moment quadripolaire, l'azote ^{15}N n'en possède pas. Les interactions, visibles par RPE HYSCORE, entre l'espèce paramagnétique et l'azote ^{15}N sont uniquement dues aux couplages hyperfins, et grâce à des simulations informatiques il est possible de déterminer la nature de l'azote concerné (Figure III-5-1).

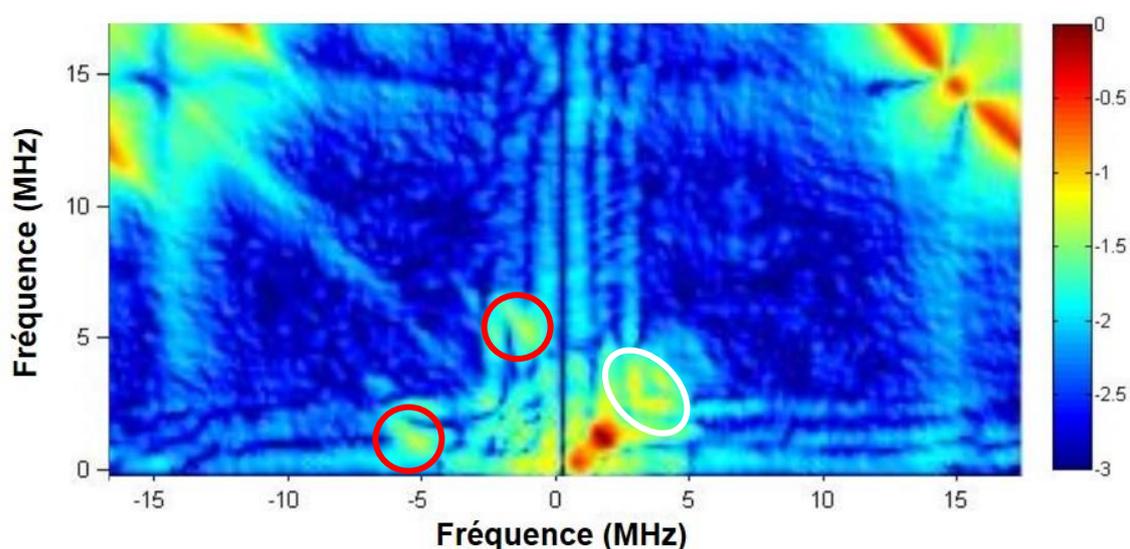


Figure III-5-1 : Spectre RPE HYSCORE de l'holo-enzyme RimO sauvage réduite marquée à l'azote ^{15}N . La protéine est réduite par 10 équivalents molaire de dithionite durant 30 min. Conditions d'enregistrement : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D. Entouré en rouge : les taches de corrélation issues d'un fort couplage ^{14}N -spin. Entouré en blanc : les taches de corrélation issues de faibles couplages ^{15}N -spin.

Comme le montre la Figure III-5-1, le spectre présente de façon tout à fait inattendue un fort couplage spin-azote ^{14}N (taches entourées en rouge). L'enzyme est cependant complètement marquée à l'azote ^{15}N comme le montre les taches de corrélation spin-azote ^{15}N dans le quadrant (+,+) (entourées en blanc). Si le marquage était partiel, tous les couplages spin-azote observés présenteraient un dédoublement dû à la présence des deux isotopes. La protéine étant entièrement marquée à l'azote ^{15}N , le couplage observé n'est donc pas dû à un des résidus de la protéine mais plutôt à une molécule azotée du milieu. Les candidats possibles sont au nombre de quatre : le tampon (Tris-HCl), la cystéine et/ou l'alanine (substrat

et produit de CSDA utilisée lors de la reconstitution des centres Fe-S) ou encore, l'ammonium contenu dans la source de Fer utilisée (sel de Möhr).

Comme substitut au tampon Tris comportant une amine primaire nous avons utilisé un tampon triéthanolamine (TEA) comportant une amine tertiaire a priori peu coordinante du fait de son encombrement stérique et efficace dans la région des pH utilisés dans cette étude (8,0). L'enzyme RimO marquée à l'azote ^{15}N reconstituée dans le tampon triéthanolamine (TEA) a été analysée par RPE HYSORE (Figure III-5-2).

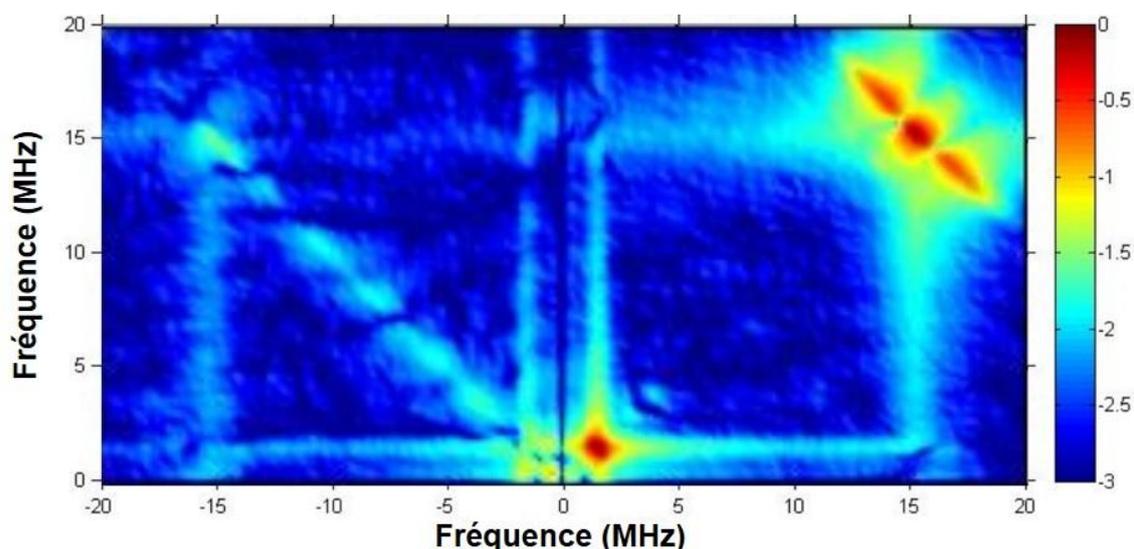
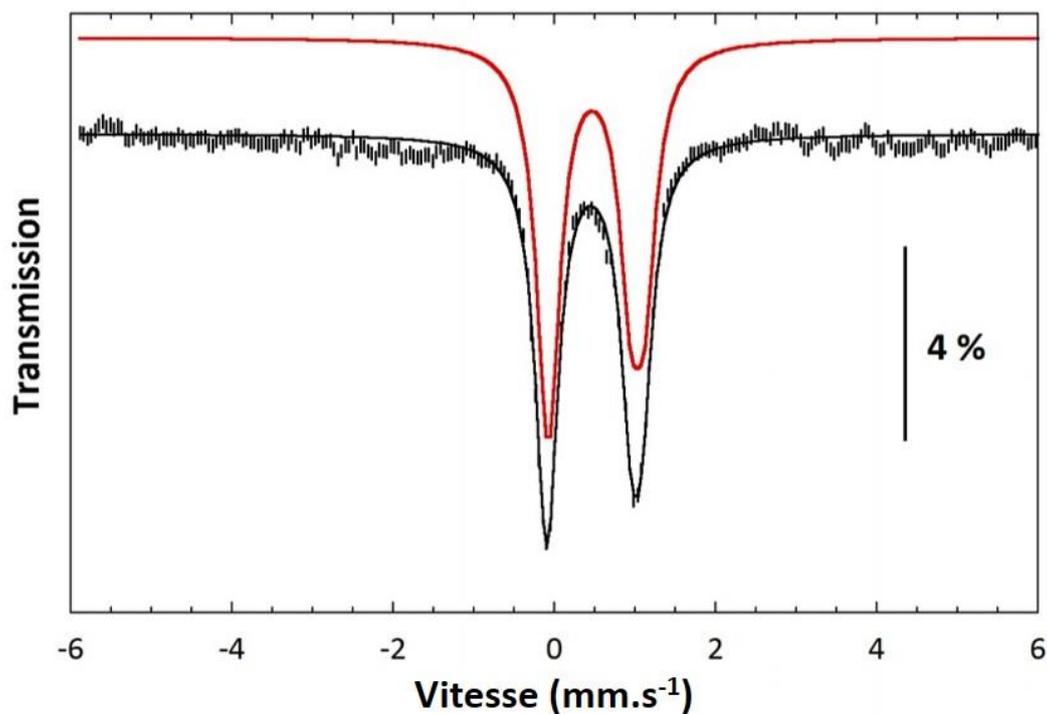


Figure III-5-2 : Spectre RPE HYSORE de l'holo-enzyme RimO sauvage réduite marquée à l'azote ^{15}N dans un milieu tamponné par la triéthanolamine. La protéine est réduite par 10 équivalents molaires de dithionite durant 30 min. Conditions d'enregistrements : Température = 8 K / Champ magnétique = 3580 G / Fréquence = 9,71 GHz / Transformée de Fourier 2D.

Le spectre obtenu montre l'absence d'azote dans le quadrant des couplages forts. Ce résultat établit sans ambiguïté que l'azote coordonné détecté par HYSORE dans les expériences décrites jusqu'ici dans cette thèse provient du tampon Tris. C'est la première fois qu'une telle coordination d'un centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ par le tampon Tris est observée.

Le spectre Mössbauer de l'échantillon préparé dans le tampon TEA présente 92% de site typique et seulement 8% de site atypique. La comparaison des paramètres δ et ΔE_q dans le Tris et le TEA montre que l'absence du ligand azoté du Tris affecte principalement le signal majoritaire qui est maintenant mieux simulé avec deux jeux de paramètres caractéristiques de paires délocalisées.



RimO ox	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Area (%)
[4Fe4S]²⁺	0.42	1.05	0.35	91 %
	0.49	1.18	0.35	

Figure III-5-6 : Spectre Mössbauer expérimental et simulé de l'holo-enzyme RimO de *T. maritima* à l'état oxydé dans un milieu tamponné par la triéthanolamine. L'échantillon analysé contient 400 μ L à 200 μ M d'holoprotéine. Le spectre expérimental a été enregistré à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire à la source de rayons γ .

Le spectre Mössbauer de l'échantillon préparé dans le tampon TEA présente 91% de site typique ($\delta = 0,42$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,05$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,49$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,18$ mm.s⁻¹). C'est donc le tampon Tris-HCl qui induit la formation de la paire localisée Fe^{II}-Fe^{III}. Les différents paramètres obtenus sont très similaires à ceux obtenus avec l'enzyme dans le tampon Tris, seules changent les proportions en site typique et atypique. Ces résultats permettent de relier les deux caractéristiques que nous avons cherché à comprendre jusqu'ici. La molécule de Tris est capable de coordonner le centre RS de RimO et cette coordination provoque une localisation de charge dans une des paires du cluster. Un modèle structural de cette interaction a été construit (Figure V-5-7).

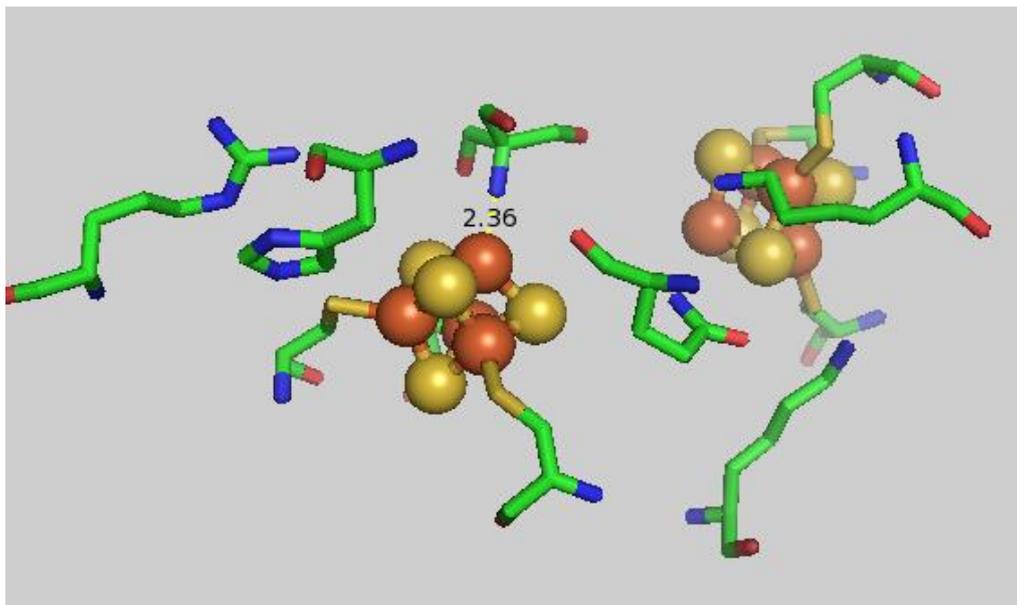
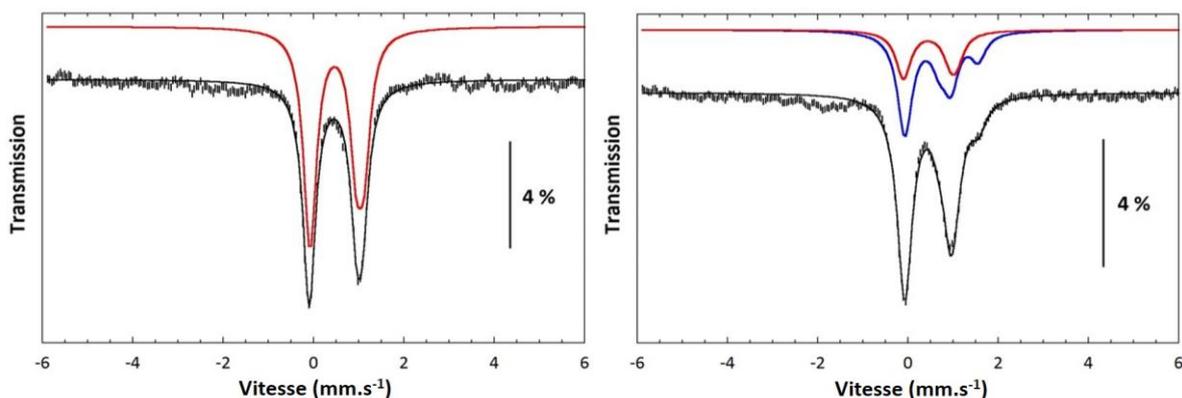


Figure V-5-7 : Modèle structural de RimO en interaction avec une molécule de Tris.

Dans la figure ci-dessus, le modèle présente une molécule de Tris à 2,36 Å du Fer du centre RS n'étant pas coordonné par une cystéine. Cela suggère l'existence d'un équilibre entre formes liées par le polysulfure observé dans la structure et formes liées par le Tris. Ces équilibres sont probablement très dépendants de la concentration et la forme liée par le Tris ne serait détectable qu'aux fortes concentrations utilisées en spectroscopie Mössbauer.

Les expériences Mössbauer avec RimO en absence et en présence de SAM ont été refaites dans le tampon TEA. Les spectres à l'état oxydé et réduit ont été enregistrés et sont présentés ci-dessous (Figures V-5-8 & V-5-9).

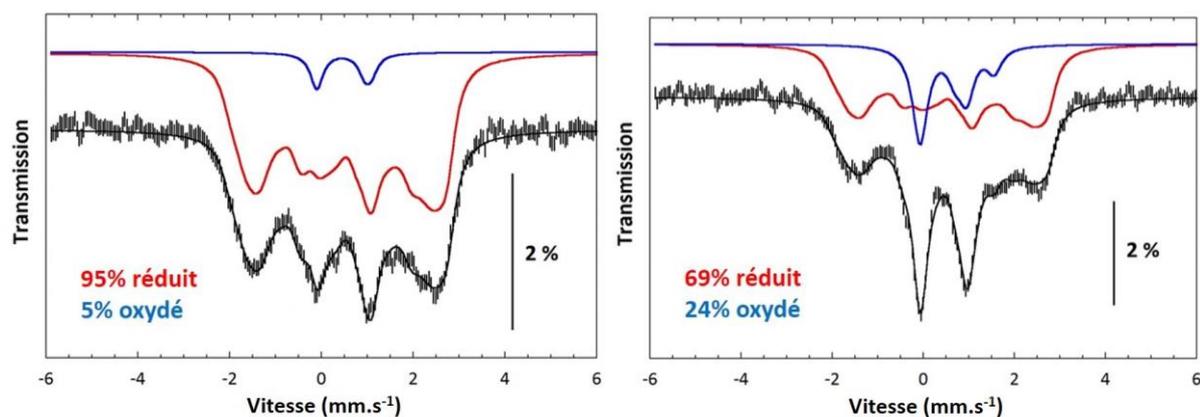


RimO ox + SAM	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S]²⁺	0.42	1.05	0.4	22 %
	0.49	1.18	0.4	
[4Fe4S]²⁺ site diff	0.44	1.02	0.4	46 %
	0.31	0.77	0.4	
	0.74	1.63	0.4	

Figure V-5-8 : Spectres Mössbauer expérimentaux et simulé de RimO oxydé en absence (à gauche) et en présence de SAM (à droite). L'échantillon analysé contient 400 μ L à 300 μ M d'holoprotéine réduite pas 10 équivalents molaires de dithionite et pour le spectre de droite incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Les spectres ont été enregistrés à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire aux rayons γ . Seuls les paramètres de l'enzyme en présence de SAM sont détaillés

L'enzyme RimO à l'état oxydé dans le tampon TEA ne contient que des centres typiques. L'addition de SAM provoque la différenciation d'un des centres Fe-S sous la forme d'une paire à valence localisée Fe^{II}-Fe^{III} ($\delta = 0,44$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,02$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,31$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 0,77$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,74$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,63$ mm.s⁻¹). Ces valeurs sont proches de celles trouvées avec BioB incubée en présence de SAM ($\delta = 0,42$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,21$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,40$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 0,86$ mm.s⁻¹ ; $\delta = 0,64$ mm.s⁻¹ et $\Delta E_Q = 1,26$ mm.s⁻¹) (Cosper et al. 2002). L'analyse Mössbauer des protéines Rimo-RS et RimO-S dans le tampon TEA est nécessaire pour établir que seul le centre RS est capable de coordonner la SAM. Il est cependant extrêmement probable que ce soit le cas et ces expériences allant dans ce sens sont en cours de réalisation.

A l'état réduit, l'ajout de SAM provoque la réoxydation spécifique d'un des centres Fe-S possédant une paire localisée Fe^{II}-Fe^{III}.



RimO red + SAM	δ (mm.s ⁻¹)	ΔE_Q (mm.s ⁻¹)	Γ (mm.s ⁻¹)	Aire (%)
[4Fe4S]¹⁺	0.54	2.02	0.4	69 %
	0.60	1.40	0.4	
[4Fe4S]²⁺	0.44	1.02	0.4	24 %
	0.31	0.77	0.4	
Différencié	0.74	1.63	0.4	

Figure V-5-9 : Spectres Mössbauer expérimentaux et simulé de RimO réduit en absence (à gauche) et en présence de SAM (à droite). L'échantillon analysé contient 400 μ L à 300 μ M d'holoprotéine réduite pas 10 équivalents molaires de dithionite et pour le spectre de droite incubée avec 10 équivalents molaires de SAM pendant 20 min. Les spectres ont été enregistrés à 4,2 K en appliquant un champ de 50 mT perpendiculaire aux rayons γ . Seuls les paramètres de l'enzyme en présence de SAM sont détaillés.

La parfaite concordance des paramètres de cette paire localisée avec ceux de l'enzyme oxydée en présence de SAM suggère fortement que c'est bien le centre RS qui est concerné. A l'état réduit, les résultats ci-dessus confirment donc ceux obtenus dans le tampon Tris, à savoir : l'ajout de SAM provoque une réoxydation spécifique de centre RS.

III-6) Discussion.

Dans ce chapitre, l'objectif était de décrire et comprendre les événements qui se produisent lorsque la SAM est ajoutée à la protéine RimO. Avec la protéine sauvage l'ajout de SAM sur l'enzyme réduite provoque la réoxydation spécifique du centre RS. Et ce, malgré la présence d'un fort excès de dithionite. La réoxydation spécifique du cluster RS a été établie par spectroscopie Mössbauer dans deux tampons différents. En tampon Tris le signal du centre Fe-S réoxydé présente une paire à valence localisée, signature du cluster RS. En tampon TEA, le signal du centre réoxydé présente un site atypique avec des paramètres

similaires à ceux trouvés dans plusieurs enzymes RS dont le cluster est coordonné par la SAM. Cette oxydation spécifique du centre RS est corroborée par la perte du couplage spin-azote ^{14}N détecté par HYSCORE et qui est observé quand la SAM est incubée avec l'enzyme réduite en tampon Tris. Ce résultat suggère donc que le potentiel redox du centre RS se situe largement au-delà de celui du dithionite (-550 mV/ENH). Le centre RS étant à l'état oxydé il ne peut plus maintenant catalyser la réductolyse de la SAM. Par contre, même coordonné au centre RS, la SAM garde sa capacité de méthyler le sulfure du centre S.

Ce résultat permet de répondre à la question de savoir comment RimO procède pour, dans le même cycle, utiliser successivement la même molécule pour deux réactions complètement différentes. Le contrôle redox que nous avons mis en évidence permet de déclencher la réaction d'activation radicalaire une fois que le méthylsulfure a été généré évitant ainsi la formation potentiellement délétère de radicaux dans le cas contraire.

Plusieurs systèmes similaires ont été décrits dans la littérature qui corrèlent des décalages en potentiel à des changements de coordination. C'est le cas du centre [4Fe-3S] de l'hydrogénase tolérante à l'oxygène de *E. eutropha*, qui, dans son état superoxydé, est coordonnée par un azote de la chaîne principale de la protéine provoquant une diminution de son potentiel redox vers des valeurs négatives (-160 mV/ENH) (Lubitz et al. 2013 ; Heering et al. 1995). L'enzyme fumarate réductase B (FrdB), qui a déjà été citée dans le chapitre II, montre également une modulation de potentiel redox de son centre [4Fe-4S] en fonction des résidus de la poche catalytique (Cheng et al. 2013). C'est finalement le cas de plusieurs ferrédoxines comme par exemple la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR). Le potentiel redox du centre [2Fe-2S] de cette enzyme décroît de -90 mV/ENH en réponse à la coordination de la cystéine (Batie et al. 1981).

Le scénario mis en évidence ici implique qu'il existe un mécanisme permettant au centre RS d'être réduit en présence du substrat. Trois options sont envisageables : soit ce déplacement vers les potentiels positifs dépend du substrat seul, soit il dépend de la fixation du méthylsulfure au centre additionnel, soit finalement, il dépend de la présence simultanée des deux substrats. Nous avons montré avec le mutant K161A que le centre additionnel gardait la possibilité de fixer le méthylsulfure en présence de SAM et du cluster RS oxydé. Ce résultat suggère donc que le centre RS ne peut être de nouveau réductible qu'en présence du substrat de la réaction. Il sera déterminant d'étudier le devenir redox du centre RS en présence

du peptide substrat et/ou d'un analogue muté sur l'aspartate cible de ce dernier. Il semble également que le résidu R268 joue un rôle important au niveau du contrôle du potentiel redox du centre RS ou au niveau de l'interaction entre la SAM et le centre RS. En absence de ce résidu, le centre RS n'est pas réductible dans les conditions utilisées à réduire et donc la SAM ne peut plus provoquer sa réoxydation.

D'autres systèmes utilisant deux molécules de SAM pour deux fonctions différentes sont connus dans la littérature (voir Introduction IV).

Le premier concerne les enzymes radical-SAM Cfr et RlmN (Grove et al. 2013 ; Silakov et al. 2014). A la différence de RimO, le système utilisé par Cfr ne nécessite pas de contrôle redox. En effet le centre unique de Cfr peut demeurer à l'état réduit sans que la réaction de réductolyse ait nécessairement lieu, ceci parce que le partenaire du radical adénosyle (mCys) n'a pas été encore produit. Ceci revient à dire qu'en milieu réducteur, l'ajout de SAM sur Cfr conduit nécessairement à la méthylation de la cystéine cible. Dans le cas de RimO au contraire, en l'absence de contrôle redox, c'est-à-dire si le potentiel du cluster RS demeurerait inchangé, il y aurait compétition entre méthylation du sulfure lié au centre additionnel et réaction de réductolyse.

L'enzyme GenK peut également être cité. Cette protéine utilise un centre RS et un cofacteur cobalamine pour catalyser une étape de méthylation durant la biosynthèse de la gentamicine (Kim et al. 2013). Le groupement méthyle provient d'une première molécule de SAM et l'activation radicalaire permettant la fonctionnalisation du substrat utilise une seconde molécule de SAM.

La protéine NifB est un autre exemple connu d'enzyme RS utilisant la SAM pour réaliser deux réactions différentes. NifB est impliquée dans la formation du centre FeMoco de la nitrogénase (Hu et al. 2014). De façon tout à fait spéculative, on pourrait voir la réaction catalysée par NifB comme un « mix » de celles catalysées par RimO et Cfr. Comme RimO, NifB utiliserait un cluster [4Fe-4S] pour fixer un sulfure et le méthyler. Comme Cfr, le radical adénosyle activerait ce groupement en Fe-S-CH₂^o précurseur du S additionnel et du carbone μ -Fe₈C⁴⁺ interstitiel du FeMoco.

Une autre hypothèse peut également être envisagée pour expliquer comment l'enzyme contrôle la double utilisation de la SAM. Il a été décrit dans la littérature que la polarité du site actif joue un rôle essentiel dans la réaction de réductolyse de la SAM. Un premier exemple concerne la lysine 2,3-amino mutase (LAM) pour laquelle il a été montré que la présence de la lysine dans le site actif permet d'abaisser de 4 kcal.mol^{-1} l'énergie d'activation de clivage de la SAM (Wang et al. 2007). Un deuxième exemple est décrit avec le site actif de l'activase de la pyruvate formiate lyase (PFL-AE) dont la polarité est contrôlée par le substrat, ce qui provoque la réductolyse de la SAM (Crain et al. 2013). Pour l'enzyme RimO, la présence du substrat est également une condition nécessaire à la réductolyse de la SAM et nous avons montré que le résidu R268 (a priori fortement polarisé) était essentiel à l'activité. Il se pourrait donc qu'une modulation de la polarité du milieu à proximité des centres [4Fe-4S] joue un rôle clé dans le contrôle de la réaction. La polarité du site actif peut également moduler le potentiel redox des deux centres, un effet conjugué de ces deux éléments sur le mécanisme de la réaction catalysée par RimO est donc envisageable.

La mise en évidence d'un contrôle redox permettant à RimO d'utiliser à chaque cycle catalytique le même co-substrat pour deux réactions différentes pose plusieurs questions et notamment la question du « comment ».

Au début de cette thèse nous avons fait l'hypothèse que les caractéristiques spectroscopiques tout à fait originales de RimO pouvaient peut-être expliquer la réactivité de l'enzyme. Au terme de notre étude, il apparaît que ces propriétés sont le produit d'un artefact de reconstitution. Il s'avère que le tampon Tris utilisé ici et communément en enzymologie est capable de coordiner le site vacant du centre RS. Ce résultat a priori inattendu a un précédent dans la littérature avec l'aminopeptidase de *Aeromonas proteolytica* qui contient un site binucléaire à Zn coordonné par l'azote et deux groupements hydroxyles du Tris (Desmarais et al. 2002). Le modèle généré à partir de la structure de RimO montre que le Tris ne peut coordiner le cluster RS que sur le Fe qui fixe la SAM.

Ce résultat montre que le couplage spin/azote détecté par RPE HYSORE et l'existence d'une paire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ observée par Mössbauer ont la même origine : la coordination d'une molécule du tampon Tris. Malheureusement, ce phénomène obscurcit l'interprétation des résultats obtenus avec certains mutants et plus particulièrement le mutant R268A. Le remplacement par une alanine de l'arginine complètement conservée dans les

séquences publiées de RimO conduit à la perte de l'activité MTTase et du couplage spin/azote en RPE et aussi, à la perte partielle de la paire Fe-Fe localisée vue en Mössbauer. La structure tridimensionnelle de l'enzyme montre que le résidu R268 se trouve à l'opposé du site vacant présent dans le cluster RS. Par conséquent, la perte du couplage entre l'azote du Tris et le spin du cluster témoigne d'une réorganisation du site actif qui pourrait être compatible avec une hypothétique coordination d'un azote peptidique sur un de Fe du cluster. L'examen du site actif ne permet évidemment pas d'aller plus loin dans la caractérisation d'un tel mécanisme mais par analogie avec ce qui a été récemment mis en évidence avec l'hydrogénase Ni-Fe de *R. eutopha* (voir plus haut) et également dans les clusters P de la nitrogénase, il est possible qu'en présence de SAM, l'azote peptidique du résidu R268 devienne ligand du Fe portant la cystéine C152, provoquant ainsi l'oxydation de ce cluster.

Les résultats obtenus par spectroscopie RPE et Mössbauer avec les deux triples mutants de chaque centre confirment que ces mutants ne sont pas de bons modèles des centres présents dans la protéine sauvage : contrairement à ce qui est observé avec l'enzyme sauvage, le cluster du mutant RimO-S est partiellement réoxydé en présence de SAM et, au contraire, dans ces mêmes conditions, le centre RS du mutant RimO-RS n'est pas réoxydé. *A contrario* ces résultats indiquent que la forte proximité déjà notée des deux centres (8 Å) est constitutive de l'activité de l'enzyme.

Les expériences d'électrochimie réalisées sur RimO permettent d'établir plusieurs faits et d'émettre quelques hypothèses. Tout d'abord, ces expériences montrent la présence d'une seule vague suggérant que les deux centres sont équipotentiels. Cette conclusion est corroborée par la structure qui montre que la distance séparant les deux centres est très faible. Le potentiel mesuré est de -490 mV/ENH en accord avec ceux connus pour les quelques enzymes RS étudiées par électrochimie (Hinckley et al. 2006 ; Booker et al. 2010).

L'ajout de SAM sur la protéine sauvage provoque une diminution importante et difficilement interprétable de l'amplitude du courant détecté et un déplacement du potentiel vers les potentiels positifs. Par contre, il est intéressant de noter que, dans le cas de RimO-RS la SAM modifie le système dans le sens d'une plus forte irréversibilité. Ce résultat, extrapolé à l'enzyme sauvage, pourrait expliquer l'apparente réoxydation du cluster RS (observée en Mössbauer) comme résultant plutôt d'un effet cinétique sur les transferts d'électrons que d'un déplacement du potentiel redox du cluster SAM au-delà du potentiel du dithionite.

Le mutant RimO K161A se réoxyde en présence de SAM et se comporte donc, de ce point de vue, comme l'enzyme sauvage. Ce mutant présente une activité SAM réductase et donc possède un centre RS actif. De ce fait, il est logique que ce dernier présente le même comportement que RimO sauvage. Comme cette dernière, ce mutant reste également capable de fixer le méthylsélénure (donc méthylsulfure). Par ailleurs, la quantification de spin par RPE CW indique que ce mutant est presque entièrement réduit. Ces observations suggèrent donc que ce mutant n'a plus d'activité MTTase du fait que le centre auxiliaire S est totalement réduit, le rendant incompetent pour le couplage radicalaire avec le substrat activé.

Pour conclure, les données obtenues par les analyses spectroscopiques et électrochimiques montrent que la double utilisation de SAM est contrôlée par des mécanismes redox. Les deux centres [4Fe-4S] communiquent électroniquement et, en fonction des co-substrats présents dans l'enzyme, les potentiels de ces centres varient, ce qui permet d'orienter l'utilisation de la SAM vers la méthylation puis vers l'activation radicalaire. La formation de radicaux est un processus nécessitant un fort contrôle en raison de la réactivité intrinsèque de ces espèces. Il est donc nécessaire que tous les éléments réactionnels soient « prêts » avant la formation du radical. Cette étape ne peut se produire qu'en présence du substrat mais aussi du co-substrat méthylsélénure qui, après activation, pourra coupler avec le substrat activé. La présence d'un azote coordonné au centre RS due au tampon Tris provoque la formation du site atypique avec une paire localisée $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$. Bien que reconnu comme artefact, on peut se demander si la nécessaire modulation des potentiels redox de chacun des clusters de RimO ici mise en évidence ne pourrait pas, *in vivo*, être contrôlée par la présence d'un cofacteur azoté. L'expression homologue de RimO *Tm* dans *T. maritima* étant présentement exclue, il serait intéressant de poursuivre cette étude avec RimO de *E. coli*.

III-7) Mécanisme proposé de l'enzyme RimO.

A partir des éléments décrits dans ce chapitre et dans les précédents, un mécanisme de l'enzyme a pu être proposé. Ce mécanisme est présenté ci-dessous (Figure III-7).

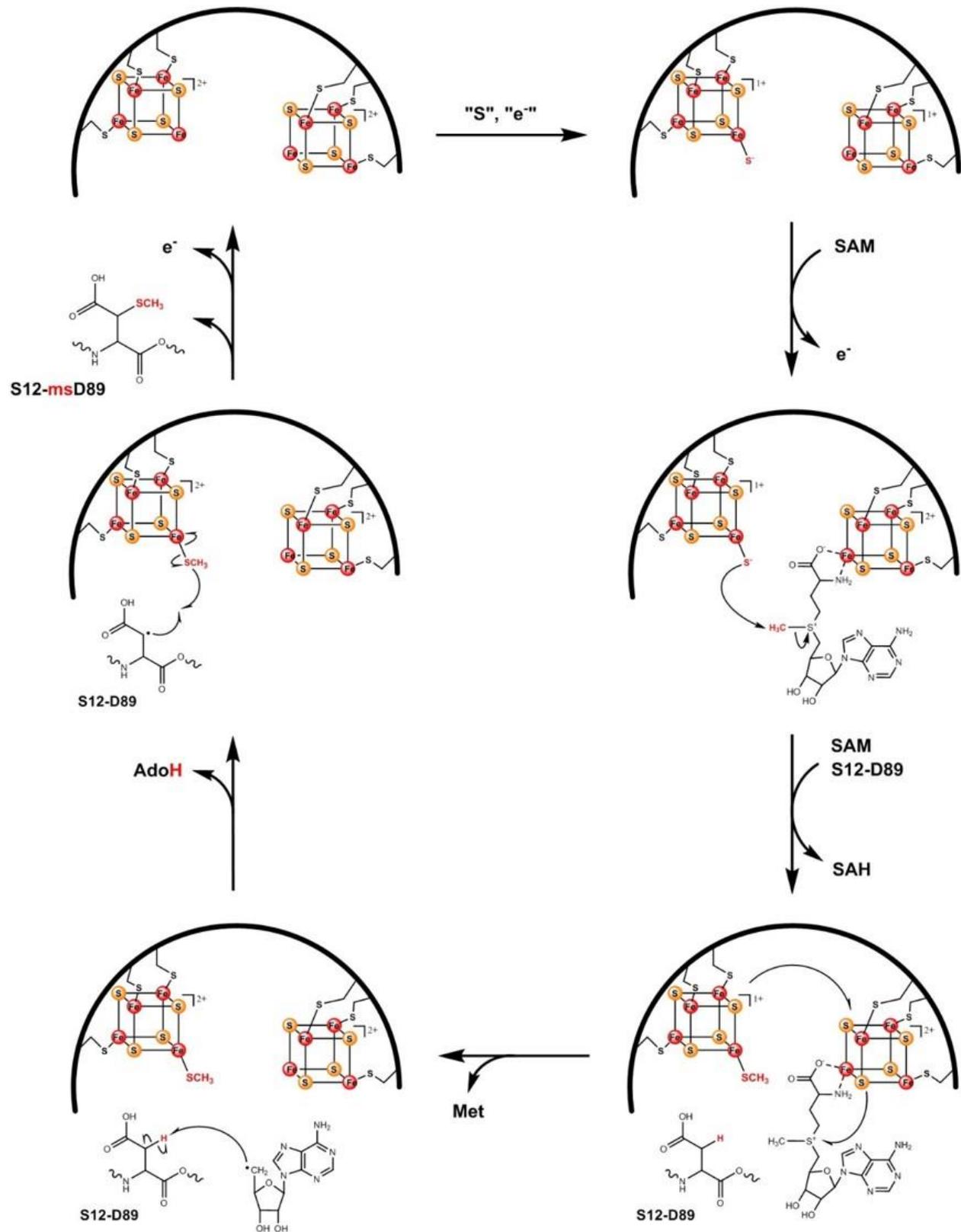


Figure III-7 : Mécanisme proposé pour l'enzyme RimO.

La proposition mécanistique présentée ci-dessus se décompose en plusieurs étapes : la première consiste en une réduction des centres [4Fe-4S] de RimO et une fixation de sulfure sur le centre S. Une première molécule de SAM intervient, réoxyde le centre RS et transfère son méthyle sur le sulfure terminal qui est sur le centre S. Ensuite une seconde molécule de SAM arrive ainsi que le substrat, le centre RS devient à nouveau réductible et peut alors réductolyser la SAM. Le substrat est activé via le radical adénosyle et le thiométhyle est oxydé par le centre S pour former une espèce radicalaire qui est couplée au substrat radicalisé. Le produit final formé sort de la poche catalytique de RimO et un nouveau cycle peut démarrer.

CHAPITRE IV

Formation des complexes RimO-S12D89 et MiaB-i6A37ARNt pour les études de cristallogénèse.

Un des objectifs majeurs de l'étude des MTTases est l'obtention d'une structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X de ces enzymes avec leurs cofacteurs (Fe-S, SAM) et leurs substrats S12D89 pour RimO et i⁶A₃₇ARNt pour MiaB. Dans ce chapitre nous décrivons les conditions utilisées pour la formation optimale de ces complexes et les données biochimiques les caractérisant.

IV-1) Complexe RimO-S12D89-SAM.

IV-1-a. Préparation de l'enzyme.

L'enzyme RimO sauvage est purifiée sous forme *apo* puis reconstituée selon le protocole standard de reconstitution (Voir Matériels & Méthodes III-4). L'*holo*-enzyme reconstituée est ensuite traitée par le DTT (10 mM) à 65°C pendant 3 h puis purifiée par chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex 75.

IV-1-b. Préparation du substrat S12D89-MBP.

La protéine S12 fait partie de la petite sous-unité 23S du complexe ribosomal bactérien (Funatsu et al. 1977). C'est une protéine très hydrophobe (21% d'acides aminés hydrophobes), son point isoélectrique théorique (pI = 11,3) la rend particulièrement difficile à isoler sous forme soluble dans l'eau. Pour contourner ce problème une étiquette MBP (Maltose Binding Protein) a été fusionnée à la protéine S12. En plus du MBP, la construction contient également une étiquette poly-His. La présence de ces deux étiquettes facilite la purification par chromatographie d'affinité. La séquence de la protéine fusion est la suivante (Figure IV-1-b).

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAIEVGGKFEKDTGKIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIIFWAHDFR
GGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPALD
KELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNDAGAKAGLTFVLDLIKXKH
MNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNNGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASP
NKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAF
WYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNLGENLYFQSHMPTINQLIRYGRKPKK
KKSKAPALQGNPQKRGVCIKVSTMPKKPNSALRKIARVRLSNGIEVTAYIPGIGHNLEHSVVLVRGGR
VKDLPGVRYKIIRGALDAAGVEGRRQRSRKYGAKRPKDQKKLEHHHHHH

Figure IV-1-b : Séquence primaire de la protéine MBP-S12 (526 résidus). L'étiquette MBP (en bleu) a été introduite du côté N terminal de S12 et l'étiquette poly-histidine (en vert) se trouve du côté C terminal. La séquence de la protéine S12 (en noir) contient l'aspartate 89 (en rouge souligné) qui est le substrat de RimO.

La construction du vecteur contenant le gène correspondant à cette séquence a été réalisée par les Dr. Farhad Forouhar et Rong Xiao qui l'ont utilisée pour la production et la purification de la protéine MBP-S12.

Pour vérifier la reconnaissance de la protéine MBP-S12 comme substrat de l'enzyme RimO, des tests d'activité enzymatique ont été réalisés. La protéine S12 avec son étiquette MBP peut être thiométhylée par RimO. Le nombre de cycles catalytiques obtenu est supérieur à celui observé avec le substrat mimétique de 20 acides aminés. D'après la quantification par spectrométrie de masse, la réaction de thiométhylation en présence d'un excès de Soufre consomme 100% des 15 équivalents molaires de MBP-S12. RimO est donc capable de réaliser au moins 15 cycles catalytiques.

IV-1-c. Production et purification du complexe.

L'*holo*-enzyme est incubée en anaérobiose à 37°C avec le substrat S12D89-MBP en présence de SAM pour former le complexe enzyme/substrat/co-substrat. De nombreux essais ont été nécessaires pour trouver les conditions optimales de formation du complexe : 15 µM d'*holo*-enzyme RimO, 18 µM de substrat S12D89-MBP (1,2 équivalents molaire) et 150 µM de co-substrat SAM (10 équivalents molaires). Le rendement maximal est obtenu pour un temps d'incubation compris entre 15 et 20 h. Le mélange réactionnel est chromatographié sur Superdex 75 pour séparer les différents constituants en fonction de leur taille. Cette étape permet à la fois l'analyse et la purification du complexe RimO/ S12D89-MBP /SAM (Figure

IV-1-c-1). Il est important de noter que le tampon utilisé pour la production et la purification du complexe doit avoir une force ionique faible (Tris-HCl 10 mM / KCl 10 mM / pH 8,0).

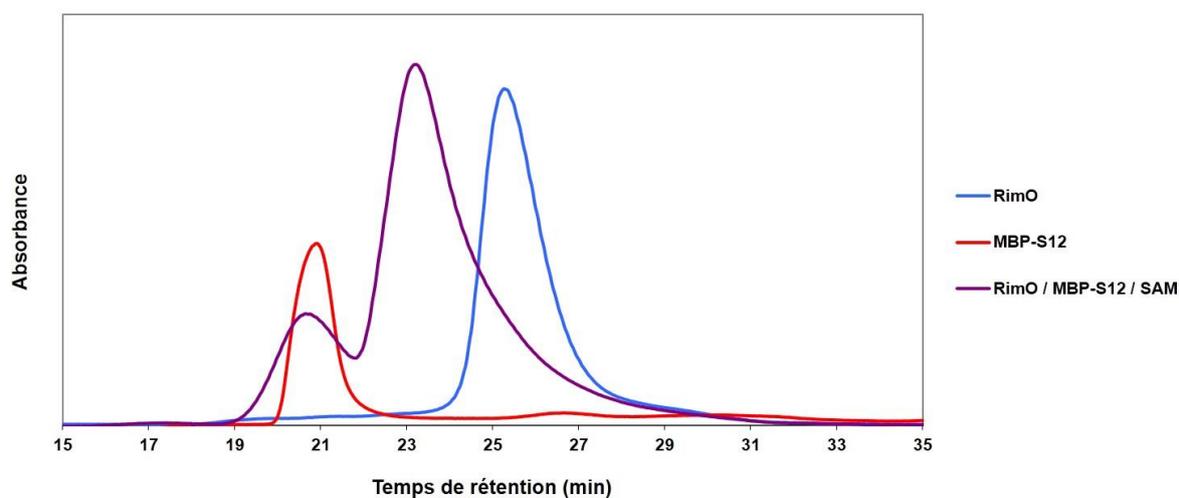


Figure IV-1-c-1 : Chromatogrammes FPLC sur colonne Superdex 75 de l' *holo*-enzyme RimO seule (bleu), de MBP-S12D89 seul (rouge) et du mélange réactionnel RimO + MBP-S12D89 + SAM (violet).

Sur le chromatogramme FPLC présenté en Figure IV-1-c-1, les protéines RimO et S12D89-MBP sont éluées respectivement à 25.5 et 21 min. Le mélange réactionnel est quant à lui élué en deux pics. Le premier (21 min.) correspondant probablement au léger excès du substrat et le second très majoritaire est élué à 23.2 min. Les fractions correspondant au pic principal, le complexe RimO/ S12D89-MBP /SAM, sont rassemblées et analysées par SDS-PAGE 10%. (Figure IV-1-c-2).

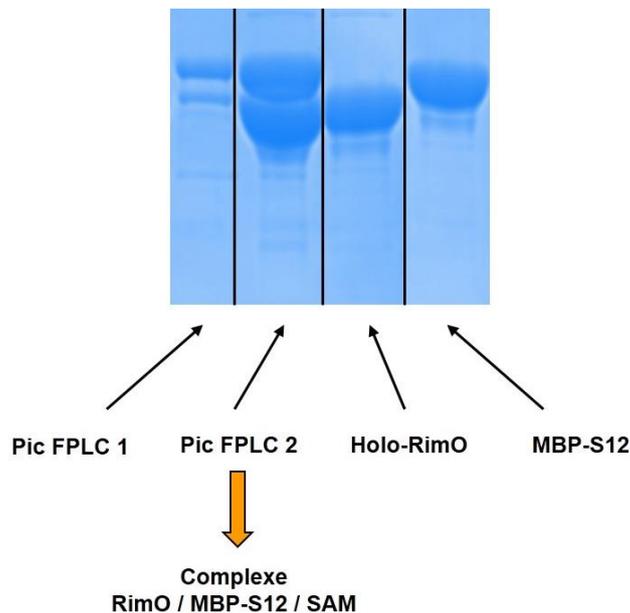


Figure IV-1-c-2 : Analyse par SDS-PAGE d'acrylamide 10% des fractions issues de la purification sur colonne Superdex 75 du mélange RimO + MBP-S12D89 + SAM.

Ce gel analytique montre que le pic FPLC majoritaire du mélange enzyme, substrat et co-substrat contient RimO et S12D89-MBP en une stoechiométrie proche de 1 :1, indiquant que ce pic correspond au complexe attendu. Le temps de rétention du complexe (23.2 min.) peut être expliqué par une modification de son rayon hydrodynamique dans le sens d'un repliement plus compact. Le complexe purifié est dosé par spectroscopie UV-visible (Figure IV-1-c-3).

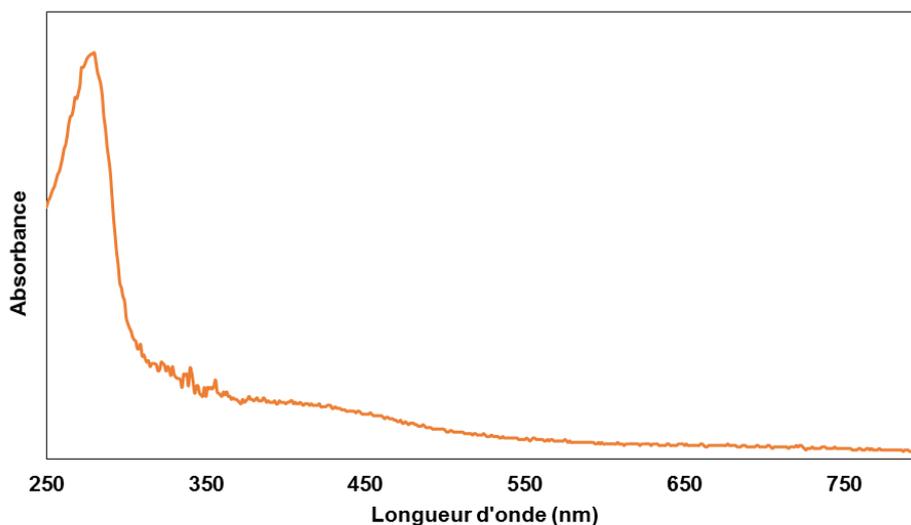


Figure IV-1-c-3 : Spectre UV-visible du complexe RimO/MBP-S12D89/SAM.

L'enzyme RimO reconstituée présente un rapport d'absorbance R(400nm/280nm) de 0,33 (voir Chapitre I). Le spectre du complexe RimO/ S12D89-MBP /SAM ci-dessus montre que ce rapport d'absorbance est de 0,19 (- 42%) en accord avec le coefficient d'extinction molaire à 280 nm du complexe ($172\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Le complexe RimO/ S12D89-MBP /SAM est ensuite traité pendant 12 à 15h par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) pour retirer l'étiquette MBP de S12D89. La TEV reconnaît spécifiquement une séquence de 7 acides aminés Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly (qui a été placée dans la protéine fusion entre la séquence MBP et la séquence S12). Le site de clivage se situe entre la glutamine et la glycine. La digestion est contrôlée par SDS-PAGE 10% (Figure IV-1-c-4). Il faut noter que lorsqu'on réalise la digestion sur la protéine fusion S12D89-MBP seule, la protéine S12 précipite instantanément dès qu'elle n'a plus son étiquette MBP. Sous la forme d'un complexe avec RimO, le MBP peut être clivé sans provoquer la précipitation de S12.

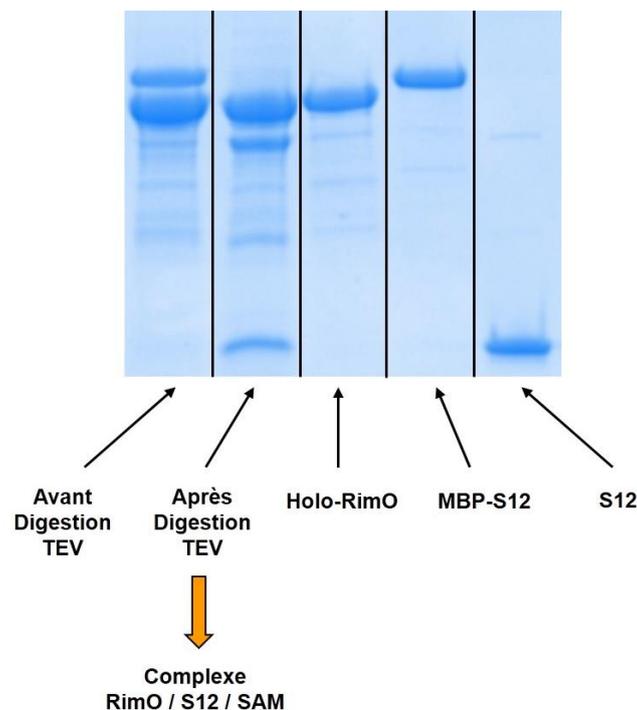


Figure IV-1-c-4 : Analyse de la digestion par la TEV par SDS-PAGE 10%.

Le gel ci-dessus montre une digestion complète du complexe. Après action de la TEV il n'y a plus de protéine fusion S12D89-MBP. Les protéines S12 et MBP sont détectées séparément. Afin de purifier le complexe RimO/S12/SAM, le produit de la réaction de digestion est chromatographié sur une deuxième Superdex 75 (Figure IV-1-c-5).

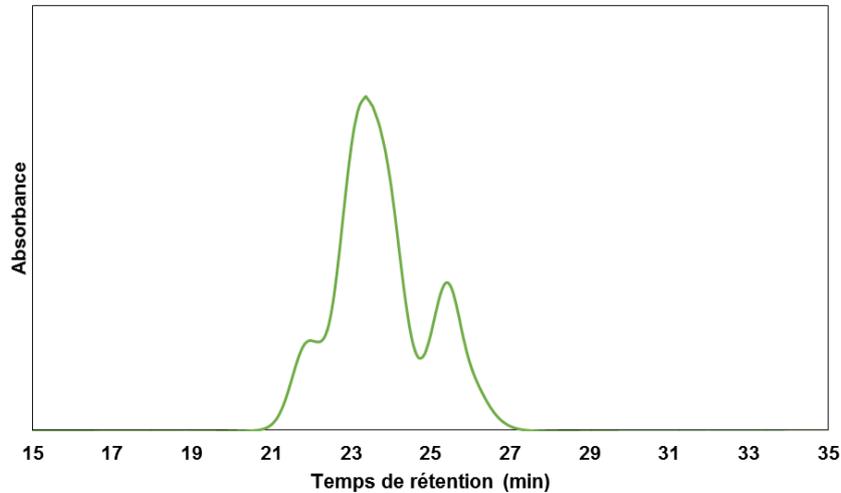


Figure IV-1-c-5 : Chromatogramme FPLC du complexe sur colonne Superdex 75 après digestion par la TEV. Pic majoritaire : RimO/S12D89/SAM.

Le chromatogramme obtenu fait apparaître un pic majoritaire correspondant au complexe RimO/S12D89/SAM élué à 24 min. (+ 0.5 min. par rapport au complexe contenant MBP) en accord avec l'élimination de la protéine MBP. L'épaulement à 22 min. correspond à des formes oligomériques de RimO. Le pic minoritaire à 25.5 min. est constitué des protéines MBP et TEV. Les fractions correspondant au pic principal sont rassemblées et analysées par SDS-PAGE 10% (Figure IV-1-c-6).

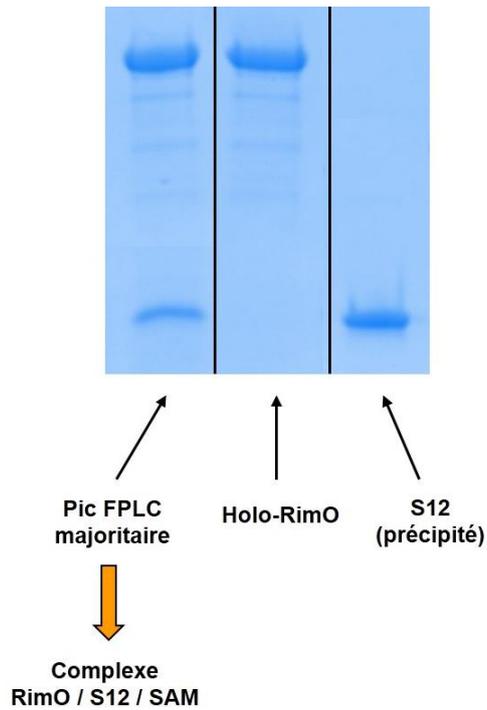


Figure IV-1-c-6 : Analyse par SDS-PAGE 10% des fractions issues de la purification sur colonne Superdex 75 du complexe RimO/MBP-S12D89/SAM après digestion par la TEV.

Ce gel confirme bien la présence de l'*holo*-RimO et de S12 dans le pic principal. Le complexe RimO/S12D89/SAM est dosé par spectroscopie UV-visible (Figure IV-1-c-6).

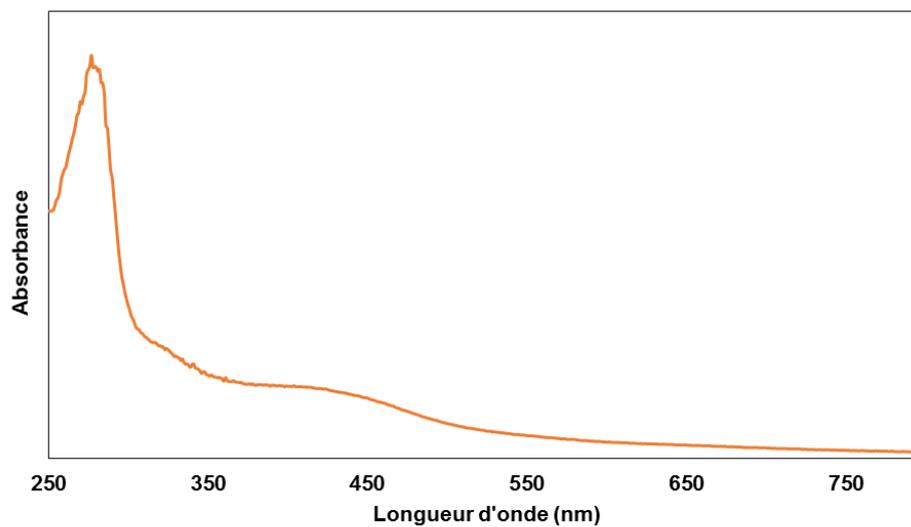


Figure IV-1-c-6 : Spectre UV-visible du complexe RimO/ S12D89 / SAM.

Le rapport d'absorbance $R(400\text{nm}/280\text{nm})$ mesuré à partir de ce spectre est de 0,31. Cela correspond parfaitement au rapport attendu car le coefficient d'extinction molaire théorique sans la protéine MBP est de $105\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Le rapport $R(400\text{nm}/280\text{nm})$ diminue de 6% par rapport à l'*holo*-protéine RimO seule, comme attendu. La stœchiométrie RimO / S12D89 du complexe obtenu est donc de 1/1.

La formation effective du complexe est également suggérée par l'observation suivante : Deux échantillons contenant $50\ \mu\text{M}$ d'*holo*-RimO seule ou de complexe RimO/S12D89/SAM ont été exposés à l'air. Au début de l'expérience les deux solutions présentent une couleur marron qui est due à la présence des centres [4Fe-4S]. Au bout de 20 min, la coloration de l'échantillon d'*holo*-RimO seule a totalement disparue alors que celle du complexe est restée inchangée. Il faut attendre 2 h pour que ce dernier perde entièrement sa coloration.

Le complexe final obtenu est concentré à $160\ \mu\text{M}$ ($10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), congelé dans l'azote liquide et expédié aux Etats-Unis pour l'étude de cristallogénèse réalisée par le Dr. Farhad Forouhar à l'Université de Columbia (New-York).

IV-1-d. Résumé et discussion des résultats pour le complexe RimO/S12D89/SAM.

La production du complexe RimO/S12D89/SAM a été réalisée avec succès. La purification par chromatographie d'exclusion montre un décalage du temps de rétention du complexe par rapport à l'enzyme et au substrat injecté séparément. Cependant, le complexe présente un temps de rétention intermédiaire par rapport à celui de l'*holo*-RimO et à MBP-S12. Le décalage observé est contraire à celui attendu. En effet le rayon hydrodynamique du complexe apparaît, de façon surprenante, inférieur à celui de la protéine MBP-S12 seule. Cela pourrait s'expliquer par un réarrangement structural des deux protéines RimO et MBP-S12 en un complexe plus compact et plus globulaire. Par contre, le temps de rétention du complexe RimO/S12D89/SAM après digestion par la TEV est en accord avec ceux attendus pour les constituants du mélange réactionnel.

La spectroscopie UV-visible a été utilisée tout au long de la production du complexe RimO/S12D89/SAM pour établir la stœchiométrie 1/1 entre l'enzyme et le substrat au sein du complexe et quantifier les différentes espèces. La présence de la SAM au sein du complexe n'a pu être établie. Plusieurs expériences cherchant à observer une interaction ou une fixation de la SAM avec RimO seule n'ont pas donné de résultat concluant jusqu'à présent. Le spectre UV-visible du complexe final ne présente qu'une faible absorbance à 260 nm, en accord avec l'absence de SAM dans ce complexe. Cependant, l'augmentation du rendement de formation de complexe en présence de SAM et les études de « docking » réalisées à partir de la structure de l'*holo*-enzyme RimO montrant que la protéine S12D89 bloquerait l'accès au site actif plaident en faveur de la présence effective de la SAM dans le complexe formé. (Forouhar et al. 2013).

La digestion par la protéase TEV permet de former le complexe RimO/S12D89/SAM à partir du complexe RimO/S12D89-MBP/SAM. Cette digestion ne provoque pas la précipitation de la protéine S12 prouvant que cette dernière est en interaction forte avec RimO probablement via des ponts salins de son domaine TRAM comme indiqué par une étude réalisée à partir de la structure de la forme *apo* (Arragain et al. 2010).

La présence du substrat au sein du complexe induit une protection des centres Fe-S de RimO vis-à-vis de l'oxygène. Cela pourrait être la conséquence d'une accessibilité réduite au site actif de l'enzyme comme évoqué plus haut.

IV-2) Complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM.

IV-2-a. Préparation de l'enzyme.

L'enzyme MiaB est produite, purifiée et reconstituée exactement de la même façon que RimO. Seule l'incubation à 65°C en présence de 10 mM de DTT (permettant l'augmentation du taux de forme monomérique) est plus longue, jusqu'à 5 h.

IV-2-b. Préparation du substrat par transcription *In Vitro*.

L'enzyme MiaB est capable de reconnaître et de thiométyler tous les ARNt dont l'anticodon commence par une uridine à l'exception de l'ARNt Ser4. Les ARNt peuvent être surproduits et isolés mais il est très difficile de les séparer les uns des autres. Pour contourner ce problème de purification, la technique de transcription *in vitro* est utilisée pour produire spécifiquement l'ARNt^{Phe}. Cette technique nécessite un brin d'ADN matrice contenant la séquence codante de l'ARNt précédé d'une séquence promotrice T7, ce brin d'ADN est obtenu par synthèse chimique. La réaction d'élongation est réalisée à 37°C pendant 3 à 5 h avec la T7 RNA Polymérase en présence des quatre nucléotides triphosphate (NTP). Elle peut être suivie visuellement par l'apparition d'un précipité blanc dû au pyrophosphate formé.

La purification du transcrit se fait en deux étapes chromatographiques, impliquant pour la première une colonne échangeuse d'anions (Nucléobond) et pour la seconde une colonne d'exclusion (Superdex 75). Le transcrit est ensuite modifié par l'enzyme MiaA qui permet d'insérer un groupement isopentényle en position 6 sur l'adénine 37 de l'ARNt^{Phe}.

Les tests d'activité réalisés sur cet ARNt^{Phe} (i⁶A) montrent qu'il est reconnu comme substrat de l'enzyme MiaB, mais les turnovers obtenus sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec un mélange des ARNt de *E. coli* enrichi en ARNt^{Phe} utilisé comme substrat. Avec le transcrit, l'enzyme seule réalise entre 1 et 2 cycles catalytiques (contre 3 à 4 avec le substrat naturel) et entre 2 et 4 en présence d'un excès de sulfure (alors qu'avec l'ARNt^{Phe} naturel, MiaB peut réaliser jusqu'à 20-25 cycles catalytiques).

IV-2-c. Production et purification du complexe.

Le protocole de formation du complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM est le même que celui utilisé avec RimO. L'*holo*-enzyme MiaB, le transcrit i⁶A₃₇ARNt et la SAM sont mélangés et incubés à 37°C pour former le complexe enzyme/substrat/co-substrat. Les conditions optimales sont : 15 µM d'*holo*-enzyme MiaB, 18 µM de substrat i⁶A₃₇ARNt (1,2 équivalents molaire) et 150µM de co-substrat SAM (10 équivalents molaires) dans un tampon de force ionique faible (Tris-HCl 10 mM / KCl 10 mM / pH 8,0). Le mélange est incubé 24 h à 37°C pour avoir un rendement maximal. Le complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM est purifié par chromatographie sur colonne d'exclusion (Figure IV-2-c).

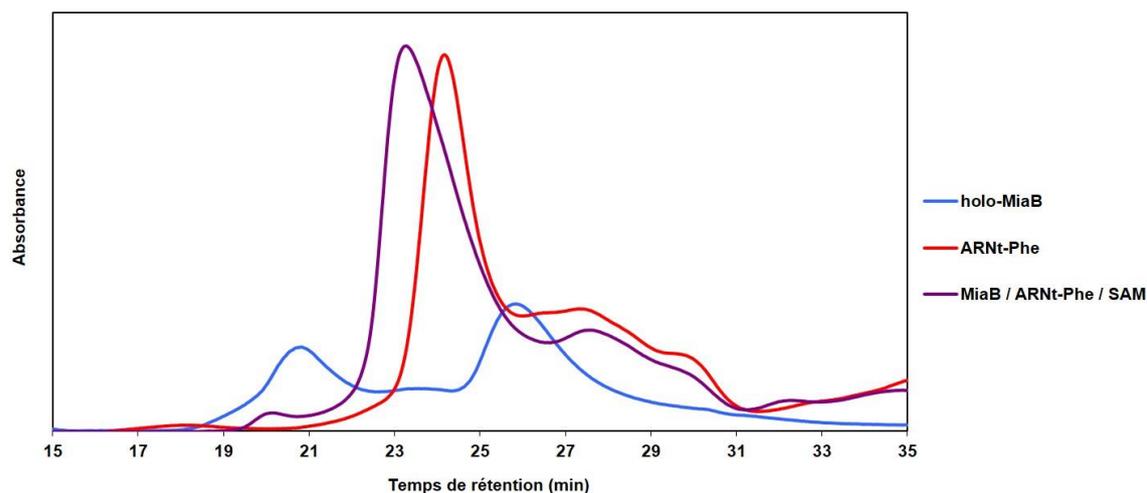


Figure IV-2-c : Chromatogrammes FPLC sur colonne Superdex 75 de l'*holo*-enzyme MiaB seule (bleu), de l'ARNt^{Phe} seul (rouge) et du mélange réactionnel MiaB + i⁶A₃₇ARNt + SAM (violet).

Le complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM présente un temps de rétention inférieur de 1,5 min par rapport à i⁶A₃₇ARNt seul et de 3 min par rapport à l'*holo*-MiaB. Ces décalages traduisent la formation du complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM. Il est important de noter qu'à concentration égale, l'ARNt absorbe environ 5 fois plus que MiaB à 280 nm. Le complexe purifié est dosé et sa stœchiométrie 1/1 vérifiée par mesure de l'absorbance à 260 nm ($\epsilon = 725\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et à 400 nm ($\epsilon = 35\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Ici aussi, la présence de la SAM augmente le rendement de formation du complexe et celle du substrat induit une certaine protection des centres [4Fe-4S] vis-à-vis de l'oxygène.

Le complexe final obtenu est concentré à 200 μM (15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) puis congelé dans l'azote liquide pour être expédié aux Etats-Unis pour l'étude de cristallogénèse.

IV-1-d. Résumé et discussion des résultats pour le complexe MiaB/i⁶A₃₇ARNt/SAM.

La formation du complexe *holo*-MiaB/ARNt-Phe/SAM est mise en évidence par son temps de rétention en chromatographie d'exclusion. Le décalage de ce temps de rétention par rapport à ceux des constituants du complexe est en accord avec l'augmentation de taille du

complexe. Le complexe étant plus gros son rayon hydrodynamique augmente et donc il sort plus rapidement de la colonne d'exclusion.

L'analyse par spectroscopie UV-visible montre que le complexe présente une stoechiométrie enzyme/substrat 1/1. Malheureusement ce résultat ne peut pas être confirmé par analyse sur gel d'acrylamide, les conditions de révélation des protéines et des ARN n'étant pas compatibles.

Comme dans le cas du complexe RimO/S12/SAM, la présence de SAM dans le complexe formé entre MiaB et le substrat $i^6A_{37}ARNt$ n'a pas pu être confirmée d'autant plus que le substrat ARN absorbe très fortement à 260 nm et de même qu'avec RimO, la relative résistance à l'oxygène suggère que l'ARNt permet d'isoler au moins partiellement le site actif de MiaB.

CHAPITRE V

Etude du mécanisme enzymatique de la réaction catalysée par TYW1.

V-1) Rappel des données avant l'étude.

Comme décrit dans l'introduction, l'enzyme TYW1 est impliquée dans la deuxième étape de la voie de biosynthèse de la wybutosine (yW) (Perche-Letuvée et al. 2012 ; Young et al. 2013). Il s'agit d'un nucléoside hypermodifié présent en position 37 de l'ARNt phénylalanine chez les eucaryotes et les archées (Crecy-Lagard et al. 2010). La synthèse de la base yW se fait à partir d'une guanine et implique cinq enzymes différentes : TRM5, TYW1, 2, 3 et 4 (Figure V-1-1).

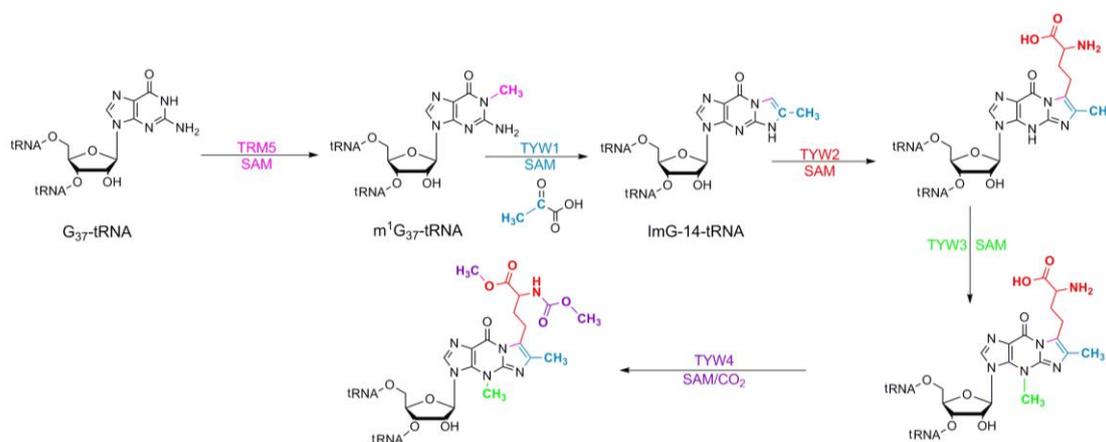


Figure V-1-1 : Réaction de biosynthèse de la wybutosine.

L'ensemble des cinq étapes utilisent la SAM comme cofacteur. La première étape catalysée par la méthyltransférase TRM5 consiste en l'insertion d'un groupement méthyle sur l'azote en position 1 de la guanine 37 pour former m¹G₃₇. Ensuite, TYW1 catalyse la transformation de m¹G en 4-déméthylwyosine (ImG-14), en utilisant la SAM et le pyruvate comme substrats. Cette réaction consiste formellement en l'insertion d'un groupement acétyle qui après condensation avec le N2 de la guanine conduit à la base tricyclique ImG-14.

V-2) Mécanismes proposés.

TYW1 est une enzyme Radical SAM qui, comme RimO et MiaB, possède deux centres [4Fe-4S] liés tous deux par seulement trois cystéines (Suzuki et al. 2007). Le mécanisme de la réaction catalysée par TYW1 est sujet à débat dans la littérature et deux hypothèses mécanistiques ont été proposées (Young et al. 2011 ; Perche-Letuvée et al. 2012 ;). L'étape de formation du radical adénosyle issu de la réductolyse de la SAM par le centre Radical-SAM faisant consensus, elle n'est pas détaillée ici. La première des deux hypothèses a été proposée par Bandarian et al. (Figure V-2-1).

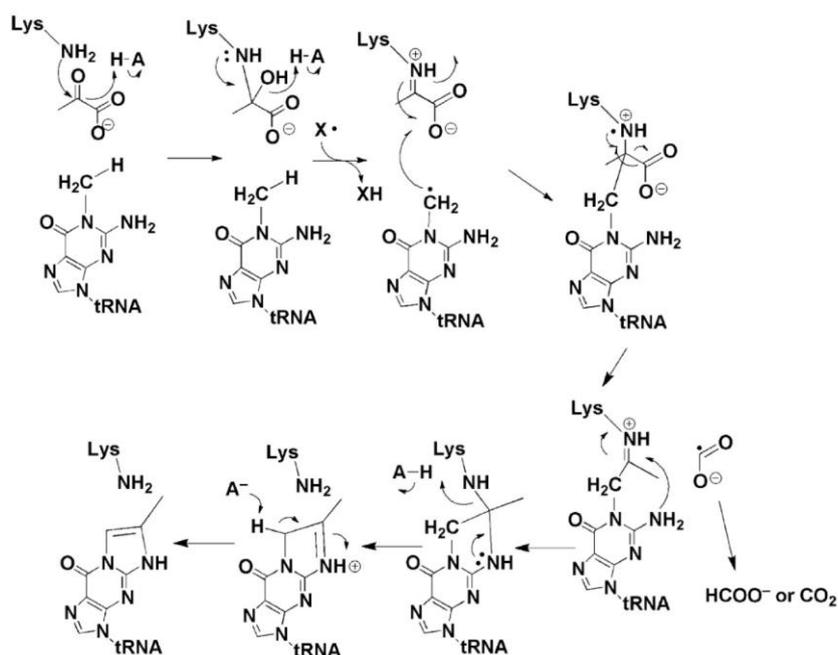


Figure V-2-1 : Mécanisme proposé par Bandarian et al. de la réaction catalysée par TYW1 (Young et al. 2011).

Dans ce mécanisme publié en 2011, il a été proposé que le co-substrat pyruvate interagisse avec la lysine 41, acide aminé absolument nécessaire à l'activité de l'enzyme, pour former une base de Schiff. L'ARNt substrat est ensuite activé par le radical Ado° sur le méthyle en position 1 conduisant au substrat radicalisé. Ce dernier réagit avec le pyruvate en interaction avec la lysine 41 pour former un adduit radicalaire. Cet adduit subit ensuite plusieurs réarrangements, dont une décarboxylation et une cyclisation conduisant à la

formation de la base modifiée ImG-14. Il est important de noter à ce niveau que le centre auxiliaire [4Fe-4S] localisé dans la partie N-terminale de la protéine n'est pas pris en compte malgré le fait que des études *in vivo* aient montré que les cystéines complètement conservées du centre [4Fe-4S] sont absolument nécessaires pour l'activité de l'enzyme.

La seconde hypothèse mécanistique a été proposée par Perche-Letuvée et al. (LCBM). Elle est présentée ci-dessous (Figure V-2-2).

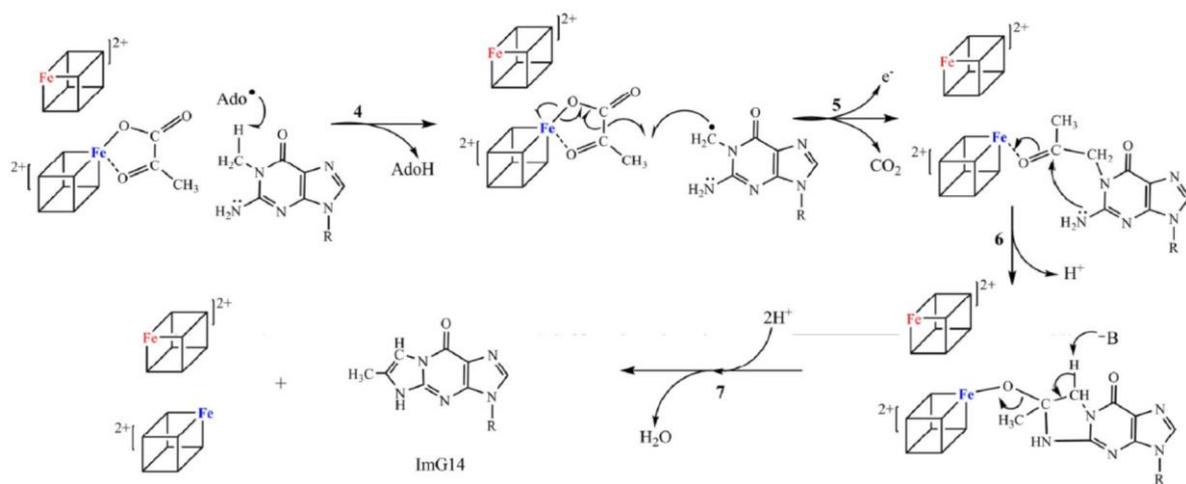


Figure V-2-2 : Mécanisme proposé par Perche-Letuvée et al. pour la réaction catalysée par TYW1 (Perche-Letuvée et al. 2013).

Cette proposition s'oppose à la première au niveau de l'activation du co-substrat, pyruvate. En effet, dans ce mécanisme le pyruvate n'est pas activé par la lysine 41 mais par le centre auxiliaire [4Fe-4S]. Cette hypothèse a été proposée d'abord sur la base de l'absolue nécessité du centre [4Fe-4S] pour l'activité de l'enzyme et ensuite par analogie avec d'autres systèmes similaires comme RimO et MiaB qui possèdent également un centre auxiliaire [4Fe-4S] servant à activer le co-substrat de la réaction qu'ils catalysent. Les études récentes de notre laboratoire ont effectivement montré par spectroscopies RPE et Mössbauer que le co-substrat pyruvate interagissait avec le centre auxiliaire à l'état oxydé comme à l'état réduit. Sur le plan des réarrangements permettant la formation du produit ImG-14, les deux propositions mécanistiques sont similaires.

Après la publication de ce mécanisme, Bandarian, dans une revue de 2013, a modifié sa proposition mécanistique en impliquant cette fois-ci le centre [4Fe-4S] auxiliaire (Figure V-2-3).

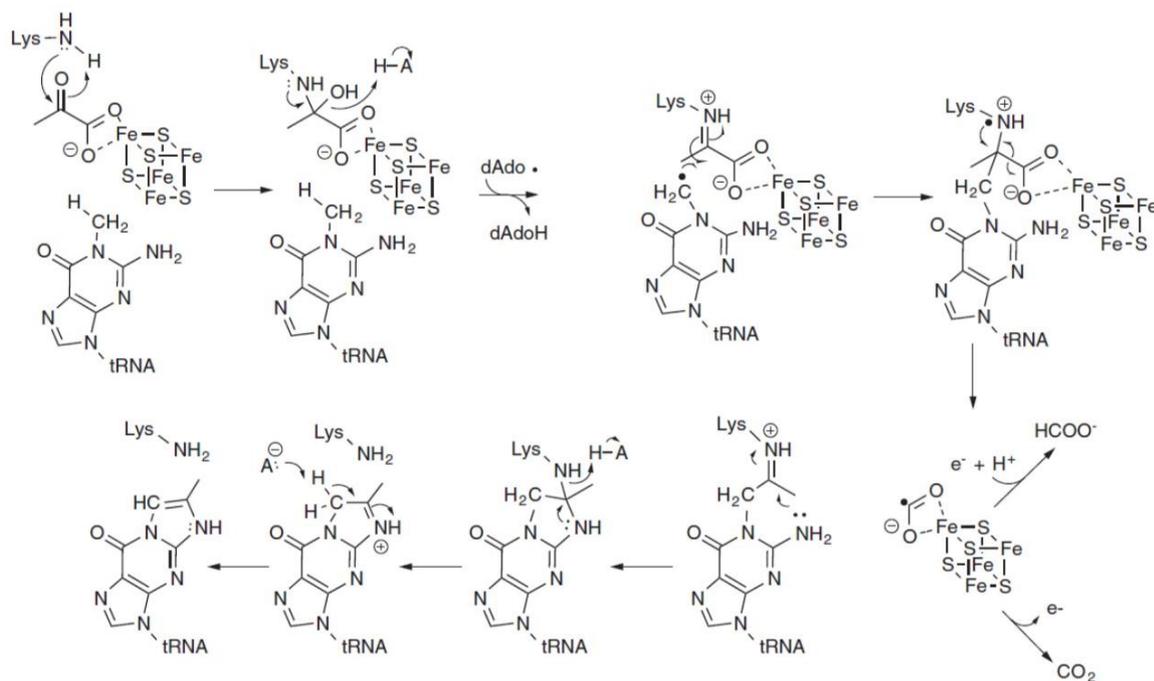


Figure V-2-3 : Mécanisme proposé par Bandarian et al. de la réaction catalysée par TYW1 (Bandarian Curr Op 2013).

Dans ce nouveau schéma réactionnel, il est proposé que la lysine 41 et le centre [4Fe-4S] agissent de concert pour activer le pyruvate. La lysine 41 servant à positionner le pyruvate via la formation d'une base de Schiff, et le centre [4Fe-4S] facilitant l'élimination du groupe carboxylate sous forme de CO₂ ou de formiate. Mis à part ce changement le mécanisme de 2013 est identique à celui de 2011.

Pour essayer d'appréhender en détail le mécanisme de formation de ImG-14 par TYW1 nous avons décidé de travailler avec un substrat marqué sur le méthyle en position 1. Le marquage sur cette position devrait en principe nous permettre de :

- Etudier l'étape d'activation du substrat tRNA par le radical Ado°.
- Suivre le devenir des hydrogènes portés par le méthyl en position 1 lors de la réaction.

V-3) Etude de TYW1 de *Pyrococcus abyssi*.

V-3-a. Préparation de l'ARNt substrat par transcription *in vitro*.

Comme indiqué plus haut le substrat de la réaction catalysée par TYW1 est l'ARNt phenylalanine (ARNt^{Phe}) de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) préalablement méthylé par TRM5 et appelé m¹G₃₇. Pour ce travail nous avons utilisé un ARNt^{Phe} produit par transcription *in vitro* et de ce fait dépourvu de toute modification transcriptionnelle. La qualité du transcrit est déterminée par HPLC/UV-visible qui donne la proportion en base : 15 A, 21 C, 15 U et 25 G.

V-3-b. Etude mécanistique par marquage isotopique.

Pour être substrat de TYW1, l'ARNt doit être méthylé en position 1 de la base G37 par TRM5. Le choix de produire l'ARNt^{Phe} par transcription *in vitro* permet l'utilisation de deux types de substrat pour TYW1 selon que la SAM utilisée par TRM5 est marquée ou non sur son groupement méthyle. Les deux versions de SAM ont été préparées par synthèse enzymatique à partir de la méthionine commerciale non marquée ou marquée ¹³CD₃ sur son groupe méthyle (Voir Matériels & Méthodes VI-1). La pureté isotopique des échantillons (>98%) a été établie par HPLC/MS.

Le marquage de m¹G, produit par TRM5, a été contrôlé par HPLC/MS. Les résultats obtenus sont présentés en Figure V-3-b-1. Le spectre A correspond à la réaction de méthylation conduite avec la SAM non marquée et le spectre B à celle menée avec la SAM (*methyl*-¹³CD₃).

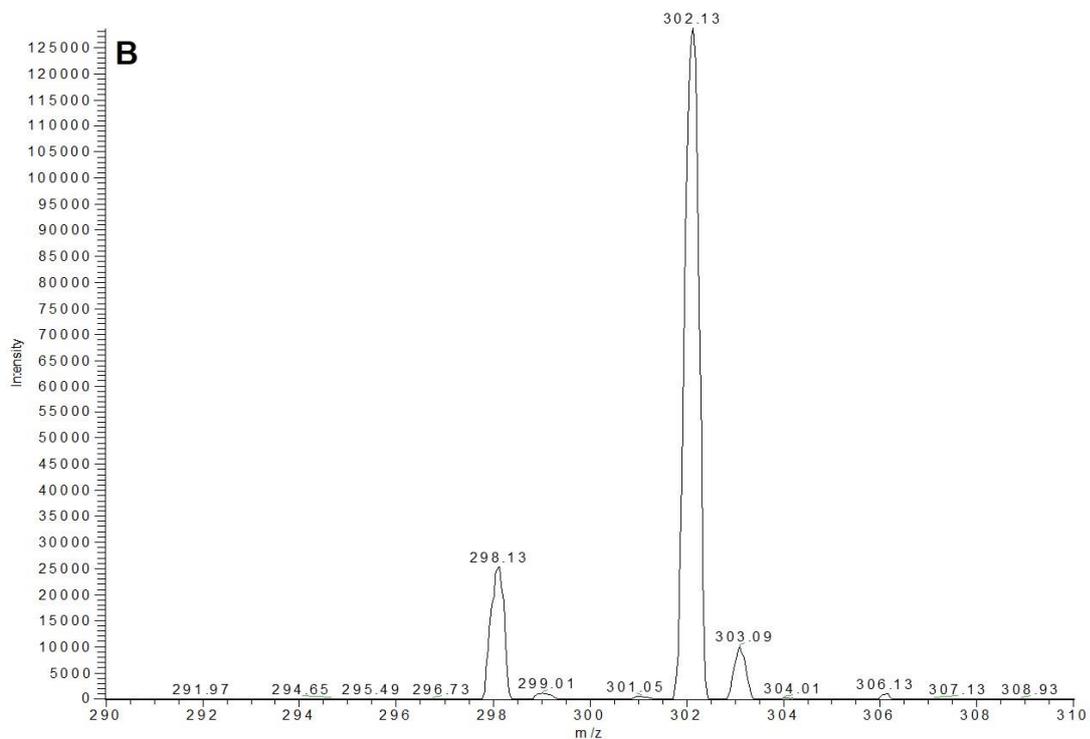
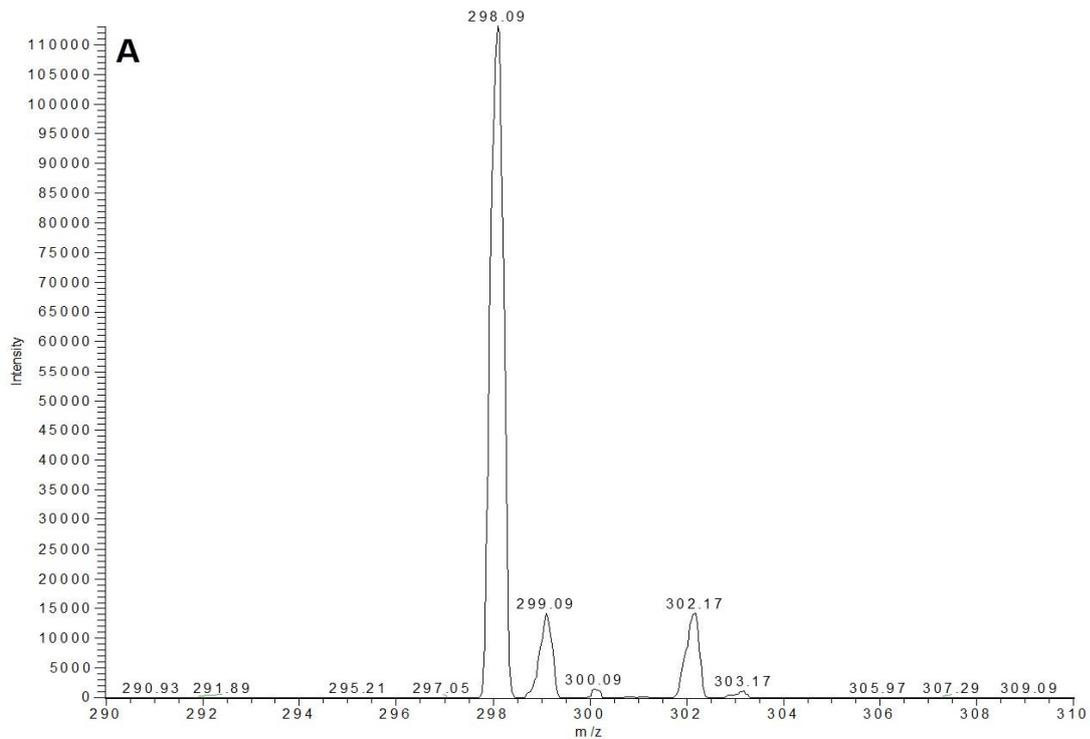


Figure V-3-b-1 : Spectres de masse de la base modifiée m¹G, produit de la réaction catalysée par l'enzyme TRM5 sur le transcrit *in vitro* ARNt-Phe de *S. cerevisiae*. Les analyses sont effectuées après digestion par la nucléase P1 et la phosphatase alcaline. Spectre A : réaction réalisée en présence de SAM non marquée. Spectre B : réaction réalisée en présence de SAM marquée ¹³CD₃ sur le groupement méthyle (marquage à 98%).

Le pic majoritaire du spectre A, détecté à 298 m/z, correspond à la base m¹G. Celui du spectre B, à 302 m/z (soit M+4), correspond à la base m¹G marquée. Le marquage ¹³CD₃ est de 80% alors que la SAM utilisée est marquée à 98%. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de SAM endogène dans le site actif de l'enzyme TRM5.

La réaction de formation de la base ImG-14 est ensuite réalisée par l'*holo*-enzyme TYW1 en conditions anaérobies sur le substrat marqué ¹³CD₃.

Dans un premier temps, la 5'-deoxyadénosine (AdoH) sous-produit de la réaction de TYW1 avec le transcrit m¹G marqué (¹³CD₃) a été analysée par HPLC-masse. Dans ce cas le détecteur utilisé est un quadripole qui permet de visualiser uniquement les éléments d'une masse sélectionnée. Ce système est plus précis qu'un spectre de masse complet notamment au niveau de la proportion en éléments marqué et non marqué (Figure V-3-b-2).

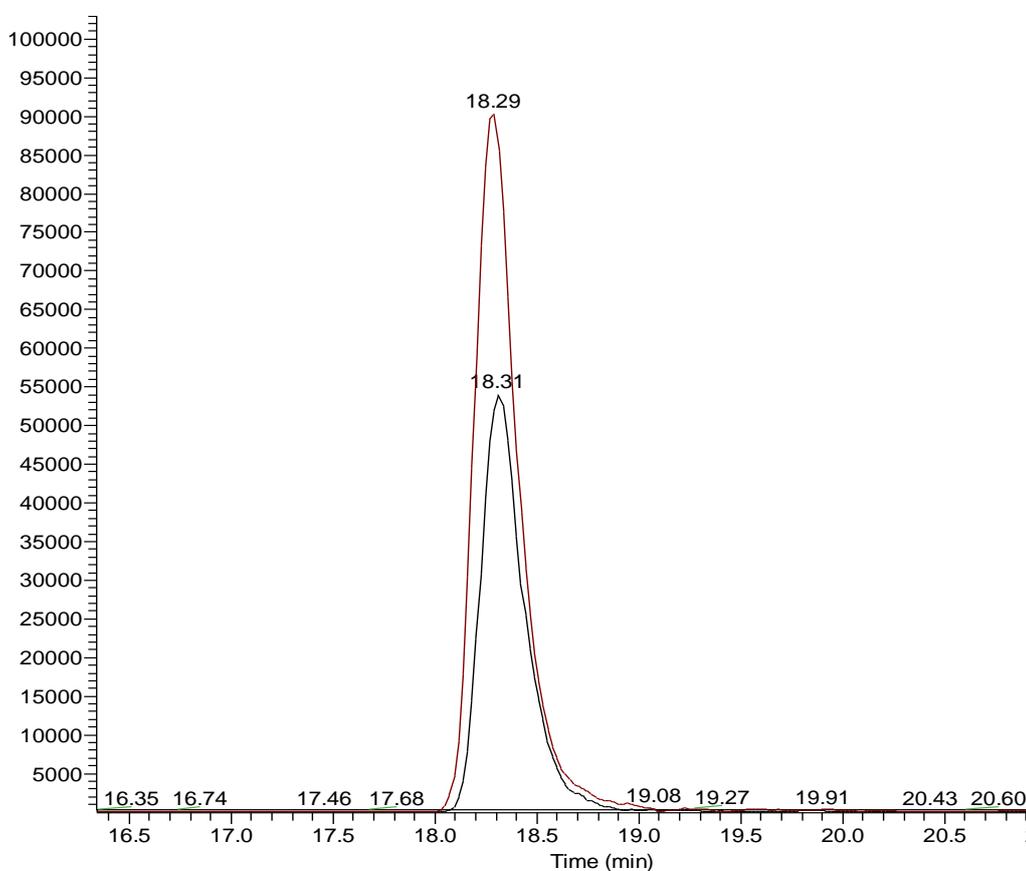


Figure V-3-b-2 : Chromatogrammes de détection par spectrométrie de masse du 5'-désoxydénosyle après élution sur colonne HPLC C18. En rouge : masse détectée de 253 g.mol⁻¹ (AdoD), en noir : masse détectée de 252 g.mol⁻¹ (AdoH). Les unités en abscisse correspondent au temps d'élution sur la colonne HPLC.

Le produit majoritairement détecté (en rouge) apparaît à une masse sélectionnée de 253 g.mol⁻¹ (M+1) et correspond à AdoD. Le pic minoritaire (en noir) est détecté pour une masse de 252 g.mol⁻¹, soit AdoH. Ce résultat montre que le radical 5'-deoxyadenosyle issu de la réductolyse de la SAM arrache un atome d'hydrogène sur le méthyle 1. La quantification montre que AdoD et AdoH sont produit dans un rapport 60 :40. Le substrat étant marqué à 80% ceci pourrait traduire la présence d'un effet isotopique : le substrat préférentiellement utilisé par TYW1 ne contenant pas de marquage au deutérium, sa consommation serait donc plus rapide.

Dans un deuxième temps, ImG-14 a été analysé par spectrométrie de masse après digestion du transcrit par la nucléase P1 et déphosphorylation par la phosphatase alcaline (Figure V-3-b-3).

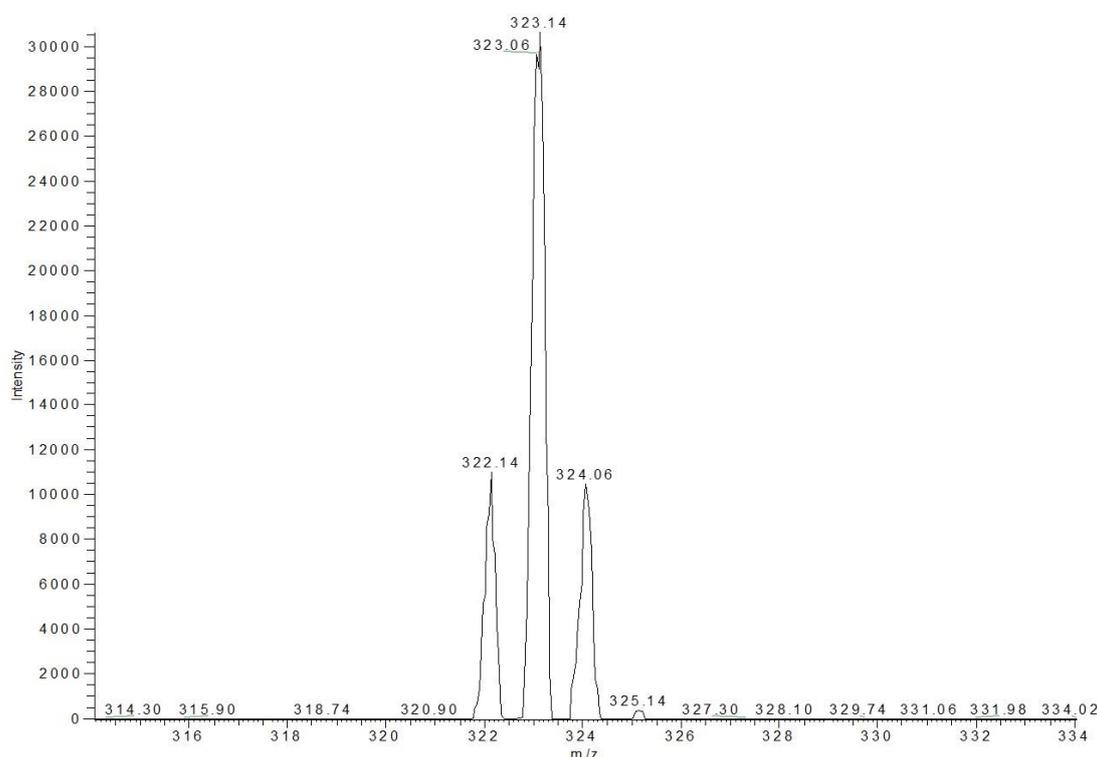


Figure V-3-b-3 : Spectre de masse de la base modifiée ImG-14, produit de la réaction catalysée par l'enzyme TYW1 sur le transcrit *in vitro* ARNt^{Phe} de *S. cerevisiae*. Les analyses sont effectuées après digestion par la nucléase P1 et la phosphatase alcaline. La réaction est réalisée sur un substrat marqué à 80% par ¹³CD₃. La réaction est effectuée en conditions anaérobies.

Le pic principal à 323 m/z correspond à ImG-14 ayant une unité de masse supplémentaire par rapport à l'espèce produite en utilisant un substrat non marqué. Or, selon les deux mécanismes proposés plus haut, le produit de la réaction devrait conserver le carbone et un hydrogène du méthyle de m1G. Ce résultat implique donc que, durant la formation de ImG-14, les deutériums ont été échangés par des protons du milieu. Par ailleurs, le marquage ^{13}C du produit final est de 60% alors que le substrat était marqué à 80%. Ce résultat peut, là encore, être expliqué par un effet isotopique sur la cinétique de la réaction. Les autres pics détectés sont dus au marquage incomplet du substrat et à la distribution isotopique naturelle.

Pour vérifier la présence d'un échange avec les protons du milieu réactionnel, la réaction de formation de ImG-14 par TYW1 a été réalisée dans D_2O . Toutes les solutions ont été préparées ou échangées dans D_2O et TYW1 a été reconstituée en tampon deutérié. Le produit de la réaction a été isolé, digéré et analysé par spectrométrie de masse (Figure V-3-b-4).

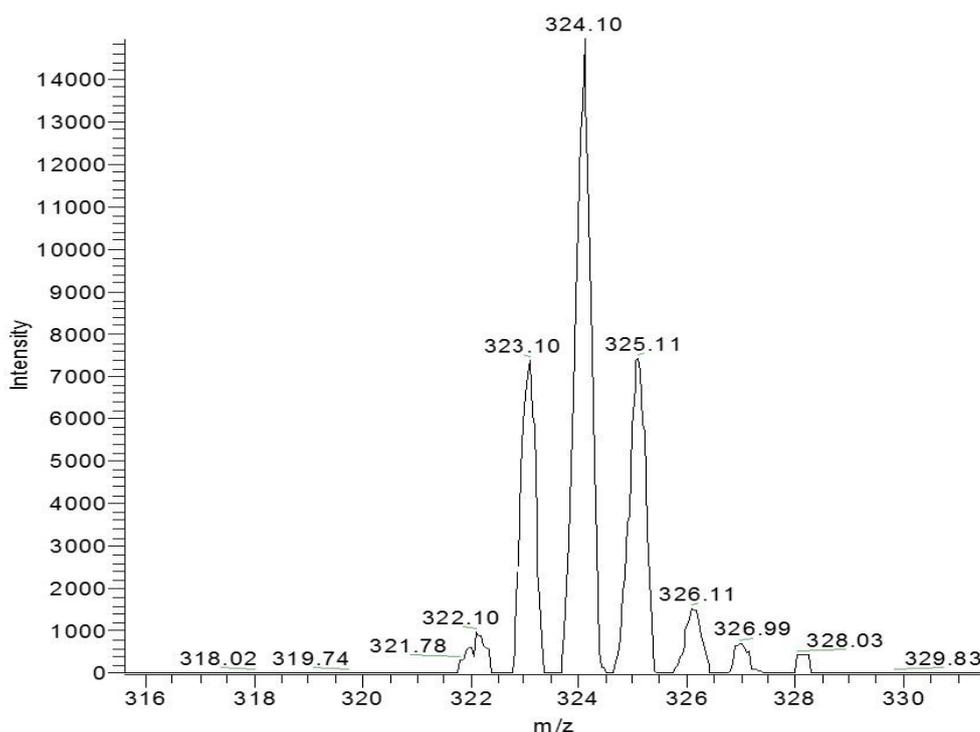


Figure V-3-b-4 : Spectre de masse de la base modifiée ImG-14, produit de la réaction catalysée par l'enzyme TYW1 sur le transcrit *in vitro* ARN^{tPhe} de *S. cerevisiae* et réalisé dans D_2O . Le transcrit substrat est marqué à 80% par $^{13}\text{CD}_3$. La réaction est menée en conditions anaérobies dans un tampon deutéré (>98%). Les analyses sont effectuées après digestion par la nucléase P1 et la phosphatase alcaline.

Le pic majoritaire à 324 m/z est issu de la base ImG-14 contenant un ^{13}C et un D (M+2 par rapport au produit sans marquage). Comme indiqué ci-dessus la réaction de catalyse est conduite en tampon deutérié. L'analyse par ms, elle, utilise un tampon non deutérié. Comme le produit final n'échange pas son D, ceci signifie que l'échange avec le solvant se produit durant la catalyse au niveau d'un intermédiaire réactionnel. Comme précédemment, le marquage est de 60%, probablement à cause de l'effet isotopique et les autres pics détectés sont dus au marquage incomplet du substrat et à la distribution isotopique naturelle.

Quel pourrait être cet intermédiaire ? Les mécanismes proposés dans la littérature font apparaître plusieurs candidats. L'intermédiaire encadré en rouge dans la Figure V-3-b-5) est compatible avec l'échange D/H observé.

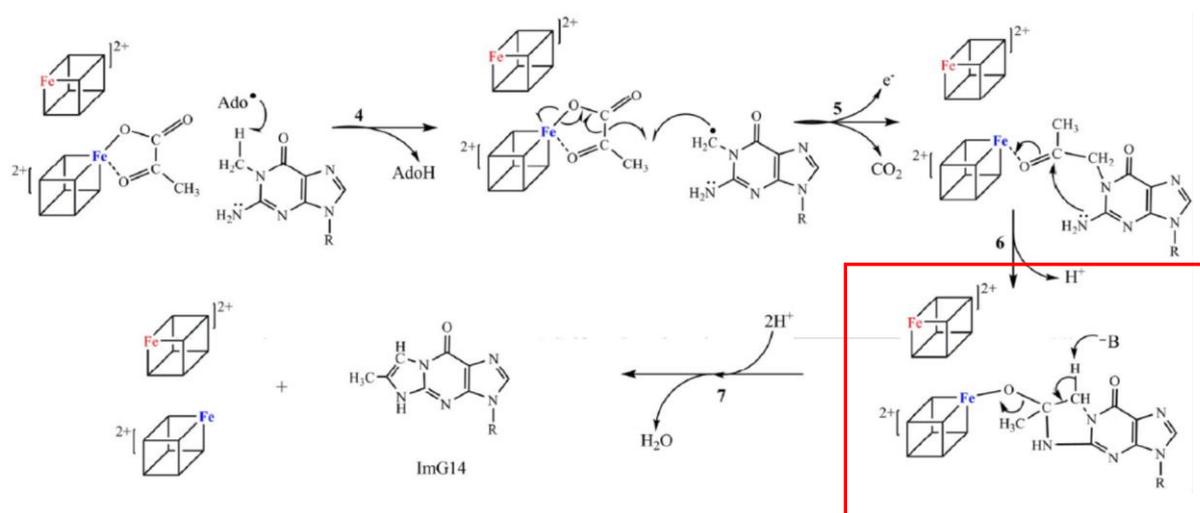


Figure V-3-b-5 : Mécanisme proposé par Perche-Letuvée et al. en 2013 de la réaction catalysée par TYW1 (Perche-Letuvée JBC 2013). L'intermédiaire réactionnel pouvant échanger un hydrogène du méthyle en position 1 avec le solvant est encadré en rouge.

Le fait d'observer cet échange conforte les deux hypothèses mécanistiques mais ne permet pas de trancher entre elles puisque cet intermédiaire est commun aux deux mécanismes.

V-3-c. Etude du rôle de la lysine 41.

D'après le mécanisme proposé par Bandarian (Figure V-2-1) la lysine 41 réagirait avec le pyruvate pour former une base de Schiff. (Frey et al. 2001). Dans ce cas, elle devrait pouvoir être piégée par réduction chimique avec un borohydrure pour former une amine liant le pyruvate à la protéine de façon covalente (Figure V-3-c).

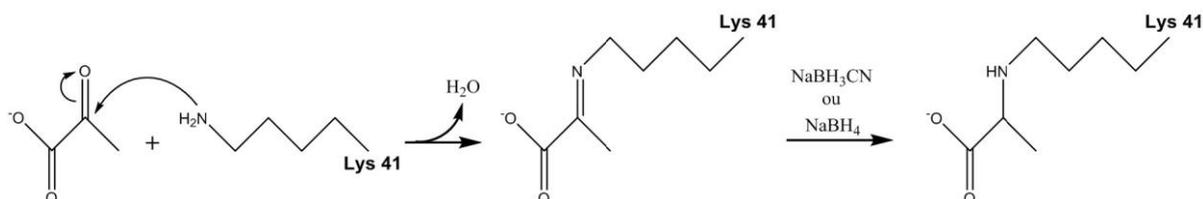


Figure V-3-c : Mécanisme de formation de l'adduit entre la lysine 41 et le pyruvate réduit par NaBH₄ ou NaBH₃CN. Un échantillon contenant 50 μ M d'holoprotéine TYW1 est incubé avec 10 équivalents de pyruvate puis réduit avec 40 équivalents de borohydrure de sodium. La réaction a lieu en conditions anaérobies.

L'*holo*-TYW1 (50 μ M) a été incubée 15 min en boîte à gants avec 10 équivalents de pyruvate dans un tampon Tris pH : 8,0 puis réduite avec 40 équivalents de NaBH₄ (ou NaBH₃CN) 0,5 M dans NaOH 50 mM. L'analyse a été réalisée par spectrométrie de masse de la protéine après digestion trypsique. Les résultats ne montrent aucun gain de masse par rapport à l'enzyme seule ce qui signifie qu'il n'y a pas eu formation d'adduit dans les conditions utilisées. Cette expérience ne permet donc pas de mettre en évidence un rôle d'ancrage du pyruvate au site actif par formation d'une base de Schiff.

V-4) Discussion.

L'objectif dans ce chapitre était de compléter l'étude, déjà entamée au laboratoire, du mécanisme réactionnel de formation de la base ImG-14 catalysée par l'enzyme TYW1. Grâce à des expériences de marquage isotopique, nous avons montré que l'activation radicalaire du substrat m1G par le radical 5'-désoxyadénosyle (issu de la réductolyse de la SAM par le centre [4Fe-4S] radical-SAM de TYW1) se fait par abstraction d'un hydrogène du méthyle en position 1. Ces études de marquage isotopique ont aussi permis de montrer qu'un des intermédiaires dans la réaction est capable d'échanger avec le solvant les hydrogènes issus du

méthyle en position 1 du substrat. Cela conforte les hypothèses mécanistiques décrites dans la littérature qui présentent chacune un intermédiaire ayant des hydrogènes labiles sur cette position.

Les réactions de formations de m¹G et de ImG-14 font apparaitre la présence d'un effet isotopique dû au fait que la vitesse de la réaction enzymatique est plus grande avec un substrat non marqué par rapport à un substrat marqué par un isotope plus lourd. Ceci se traduit par une consommation plus rapide du substrat non marqué conduisant à une augmentation du produit non marqué au début de la réaction. Cet effet peut être mis en évidence par une étude cinétique de la réaction qui reste à faire. En ce qui concerne le rôle de la lysine 41, nos résultats ne permettent pas de conclure qu'elle serait impliquée dans la fixation du pyruvate comme proposé par Bandarian. Au contraire ce résidu pourrait moduler le potentiel redox du centre [4Fe-4S] auxiliaire et permettre ainsi l'activation du pyruvate par polarisation du groupement carbonyle du pyruvate. Une autre possibilité serait que, grâce à sa capacité à faire des liaisons hydrogène, cette lysine puisse servir à positionner le pyruvate dans le site actif de TYW1.

CONCLUSION GENERALE

Du fait de leur grande plasticité en termes d'états redox et de combinaisons possibles entre atomes de Fer et de Soufre, les centres Fe-S sont au cœur d'un nombre important de processus biologiques comme la respiration et la photosynthèse ou encore comme régulateurs du métabolisme ou de l'expression génique. On sait maintenant depuis une vingtaine d'année qu'ils ont également un rôle clé comme catalyseurs redox de nombreuses réactions. La découverte en 2001 de la superfamille « Radical SAM » a ouvert un champ immense de nouvelles réactions métaboliques souvent très complexes qui font intervenir la chimie radicalaire. Au sein de cette famille il existe une classe d'enzymes qui réalisent des réactions d'insertion d'atomes de Soufre ou de fragment carboné dans des liaisons C-H peu réactives. Ces enzymes procèdent par une double activation, celle, radicalaire, de leur substrat sous forme d'un radical et également celle, (radicalaire ou non), des atomes de Soufre ou des fragments devant être insérés. Ces deux réactions d'activation sont assurées par deux clusters [4Fe-4S] différents et la réaction d'insertion proprement dite résulte du couplage de ces deux réactions.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié principalement la thiométhyltransférase RimO qui catalyse l'insertion d'un groupement thiométhyle en beta d'un résidu aspartate de la protéine ribosomale S12. Cette modification est nécessaire pour un assemblage correct du ribosome. Le cycle catalytique de cette enzyme montre qu'elle utilise deux molécules de SAM pour deux réactions totalement différentes. Une première molécule est utilisée pour effectuer un transfert de méthyle tandis que la seconde est utilisée pour former un radical 5'-deoxyadénosyle. Cette situation est quasiment inédite en biologie et nous a amené à essayer de comprendre comment ces enzymes contrôlent leur réactivité pour catalyser ces deux réactions à chaque cycle. Cette question est attachée à celle plus générale du contrôle des intermédiaires radicalaires formés par ce type d'enzyme.

Le point de départ de notre étude reposait sur deux observations faites par spectroscopie RPE HYSCORE et par spectroscopie Mössbauer. La RPE montrait la présence d'un azote à distance de coordination d'un des deux clusters que possède l'enzyme. De plus, la spectroscopie Mössbauer montrait qu'un des clusters contenait une paire de Fe à valence localisée : un des Fe était ferreux et l'autre ferrique. Curieusement MiaB, une autre

thiométhyltransférase étudiée au laboratoire ne présentait aucune de ces particularités. Nous avons fait l'hypothèse que ces particularités spectroscopiques pouvaient offrir un lien permettant de comprendre comment l'enzyme contrôlait ses deux activités.

Nous avons donc préparé différents mutants de RimO dans le but d'identifier le ou les clusters responsables de ces particularités et essayer de montrer quels résidus proches de ces clusters sont essentiels dans la régulation de l'activité enzymatique. Nous avons d'abord montré que ces particularités spectroscopiques étaient portées par le cluster RS, le cluster responsable de l'activité SAM réductase conduisant à la formation du radical adénosyle. Nous avons ensuite essayé d'identifier quels résidus possédant un azote dans leur chaîne latérale pouvaient rendre compte des particularités spectroscopiques observées. Nous avons établi que le résidu R268, complètement conservé dans toutes les séquences connues de RimO était apparemment responsable du couplage spin azote vu en RPE. Ce résidu est essentiel pour l'activité SAM réductase de l'enzyme. Cependant les résultats permettant cette conclusion étaient entachés par une certaine ambiguïté : en effet le mutant correspondant (R268A) présentait toujours un site différencié en Mössbauer avec cependant des paramètres différents de ceux de la protéine sauvage. Nous avons élucidé en fin de thèse la raison de ces divergences en montrant que les deux particularités spectroscopiques de RimO étaient dues à la coordination complètement inattendue d'une molécule de Tris utilisé comme tampon. De fait en tampon TEA, la protéine réduite ne montre aucun spin nucléaire proche et le spectre Mössbauer de l'enzyme oxydée montre la présence de centres $4\text{Fe-4S}]2+$ ne présentant que des paires délocalisées. Ces résultats semblent donc infirmer notre hypothèse que le contrôle de la réactivité de l'enzyme pouvait être relié à une localisation de valence d'un des fers du cluster RS.

La deuxième étape de notre étude consistait à étudier l'impact de la SAM sur la réactivité de l'enzyme. Les études antérieures avaient montré que RimO (comme MiaB) avait une activité méthyltransférase en absence de substrat. Cette activité était indépendante de la présence d'électrons mais plus forte en présence de ceux-ci. En utilisant les mêmes outils spectroscopiques que plus haut nous avons montré que l'action de la SAM sur la protéine réduite conduisait à la réoxydation spécifique du cluster RS. En particulier la spectroscopie Mössbauer montre, en tampon Tris, l'apparition de la paire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ due au tampon et en tampon TEA, un signal identique à celui observé avec l'enzyme oxydée en présence de SAM. La réoxydation spécifique du cluster RS rend ce centre aveugle en spectroscopie RPE

HYSORE et explique la disparition du couplage avec l'azote du Tris observé dans ce tampon.

Ces résultats montrent que l'utilisation de la SAM est contrôlée par le potentiel redox du cluster RS. En absence de SAM, les deux clusters sont réductibles *in vivo* et réduits *in vitro*. En présence de SAM, le potentiel redox du cluster RS devient très négatif (non détectable par électrochimie) et la SAM coordonnée au centre RS ne peut être reductolysée. Par contre elle peut réagir avec un nucléophile proche, un ion sulfure coordonné sur le centre II selon notre hypothèse. Il est intéressant de noter qu'un contrôle redox analogue a été mis en évidence avec l'enzyme TYW1, le deuxième sujet d'étude de cette thèse, mais dans ce cas ce n'est pas le cluster RS mais le cluster additionnel qui est régulé.

Ce travail devrait se poursuivre selon deux directions. La première serait d'identifier les déterminants structuraux permettant d'expliquer le déplacement important du potentiel redox du centre RS vers des valeurs négatives. La deuxième piste devrait montrer un déplacement du potentiel du centre RS en sens inverse en présence du substrat et/ou du deuxième substrat. Ainsi serait confirmé de façon concluante que RimO en particulier et les enzymes d'insertion radicalaire contrôlent leur réactivité par ce qui est convenu d'appeler un « redox switch ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ahrens-Botzong, A.; Janthawornpong, K.; Wolny, J. A.; Tambou, E. N.; Rohmer, M.; Krasutsky, S.; Poulter, C. D.; Schünemann, V.; Seemann, M., Biosynthesis of isoprene units: Mössbauer spectroscopy of substrate and inhibitor binding to the [4Fe-4S] cluster of the LytB/IspH enzyme. *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (50), 11976-9.

Anantharaman, V.; Koonin, E. V.; Aravind, L., TRAM, a predicted RNA-binding domain, common to tRNA uracil methylation and adenine thiolation enzymes. *FEMS Microbiol Lett* **2001**, *197* (2), 215-21.

Anton, B. P.; Russell, S. P.; Vertrees, J.; Kasif, S.; Raleigh, E. A.; Limbach, P. A.; Roberts, R. J., Functional characterization of the YmcB and YqeV tRNA methylthiotransferases of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*(18), 6195-205.

Anton, B. P.; Saleh, L.; Benner, J. S.; Raleigh, E. A.; Kasif, S.; Roberts, R. J., RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (6), 1826-31.

Arragain, S.; Garcia-Serres, R.; Blondin, G.; Douki, T.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Forouhar, F.; Neely, H.; Montelione, G. T.; Hunt, J. F.; Mulliez, E.; Fontecave, M.; Atta, M., Post-translational modification of ribosomal proteins: structural and functional characterization of RimO from *Thermotoga maritima*, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase. *J Biol Chem* **2010**, *285* (8), 5792-801.

Arragain, S.; Garcia-Serres, R.; Blondin, G.; Douki, T.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Forouhar, F.; Neely, H.; Montelione, G. T.; Hunt, J. F.; Mulliez, E.; Fontecave, M.; Atta, M., Post-translational modification of ribosomal proteins: structural and functional characterization of RimO from *Thermotoga maritima*, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase. *J Biol Chem* **2010**, *285* (8), 5792-801.

Arragain, S.; Handelman, S. K.; Forouhar, F.; Wei, F. Y.; Tomizawa, K.; Hunt, J. F.; Douki, T.; Fontecave, M.; Mulliez, E.; Atta, M., Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthiotransferase for biosynthesis of 2-methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladenosine in tRNA. *J Biol Chem* **2010**, *285* (37), 28425-33.

Atta, M.; Arragain, S.; Fontecave, M.; Mulliez, E.; Hunt, J. F.; Luff, J. D.; Forouhar, F., The methylthiolation reaction mediated by the Radical-SAM enzymes. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1824* (11), 1223-30.

Atta, M.; Mulliez, E.; Arragain, S.; Forouhar, F.; Hunt, J. F.; Fontecave, M., S-Adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules. *Curr Opin Struct Biol* **2010**, *20* (6), 684-92.

Ayala-Castro, C.; Saini, A.; Outten, F. W., Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2008**, *72* (1), 110-25, table of contents.

B

Bandyopadhyay, S.; Chandramouli, K.; Johnson, M. K., Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem Soc Trans* **2008**, *36* (Pt 6), 1112-9.

Banerjee, R., Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B12-dependent mutases. *Chem Rev* **2003**, *103* (6), 2083-94.

Banerjee, R.; Ragsdale, S. W., The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **2003**, *72*, 209-47.

Barquera, B.; Zhou, W.; Morgan, J. E.; Gennis, R. B., Riboflavin is a component of the Na⁺-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (16), 10322-4.

Batie, C. J.; Kamin, H., The relation of pH and oxidation-reduction potential to the association state of the ferredoxin/ferredoxin:NADP⁺ reductase complex. *J Biol Chem* **1981**, *256* (15), 7756-63.

Beinert, H., Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* **1983**, *131* (2), 373-8.

Beinert, H.; Holm, R. H.; Münck, E., Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **1997**, *277* (5326), 653-9.

Booker, S. J., Anaerobic functionalization of unactivated C-H bonds. *Curr Opin Chem Biol* **2009**, *13* (1), 58-73.

Booker, S. J.; Grove, T. L., Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes. *F1000 Biol Rep* **2010**, *2*, 52.

Broderick, J. B.; Duffus, B. R.; Duschene, K. S.; Shepard, E. M., Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev* **2014**, *114* (8), 4229-317.

Buckel, W.; Kung, J. W.; Boll, M., The benzoyl-coenzyme A reductase and 2-hydroxyacyl-coenzyme A dehydratase radical enzyme family. *Chembiochem* **2014**, *15* (15), 2188-94.

C

Campbell, Z. T.; Weichsel, A.; Montfort, W. R.; Baldwin, T. O., Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the beta subunit. *Biochemistry* **2009**, *48* (26), 6085-94.

Can, M.; Armstrong, F. A.; Ragsdale, S. W., Structure, function, and mechanism of the nickel metalloenzymes, CO dehydrogenase, and acetyl-CoA synthase. *Chem Rev* **2014**, *114* (8), 4149-74.

Chen, D.; Frey, P. A., Identification of lysine 346 as a functionally important residue for pyridoxal 5'-phosphate binding and catalysis in lysine 2, 3-aminomutase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **2001**, *40* (2), 596-602.

Cheng, V. W.; Tran, Q. M.; Boroumand, N.; Rothery, R. A.; Maklashina, E.; Cecchini, G.; Weiner, J. H., A conserved lysine residue controls iron-sulfur cluster redox chemistry in *Escherichia coli* fumarate reductase. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1827* (10), 1141-7.

Cicchillo, R. M.; Iwig, D. F.; Jones, A. D.; Nesbitt, N. M.; Baleanu-Gogonea, C.; Souder, M. G.; Tu, L.; Booker, S. J., Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry* **2004**, *43* (21), 6378-86.

Cicchillo, R. M.; Lee, K. H.; Baleanu-Gogonea, C.; Nesbitt, N. M.; Krebs, C.; Booker, S. J., *Escherichia coli* lipoyl synthase binds two distinct [4Fe-4S] clusters per polypeptide. *Biochemistry* **2004**, *43* (37), 11770-81.

Crain, A. V.; Broderick, J. B., Flavodoxin cofactor binding induces structural changes that are required for protein-protein interactions with NADP(+) oxidoreductase and pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1834* (12), 2512-9.

Crécy-Lagard, V.; Brochier-Armanet, C.; Urbonavicius, J.; Fernandez, B.; Phillips, G.; Lyons, B.; Noma, A.; Alvarez, S.; Droogmans, L.; Armengaud, J.; Grosjean, H., Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA: an ancient and highly diverse pathway in Archaea. *Mol Biol Evol* **2010**, *27* (9), 2062-77.

D

Desmarais, W. T.; Bienvenue, D. L.; Bzymek, K. P.; Holz, R. C.; Petsko, G. A.; Ringe, D., The 1.20 Å resolution crystal structure of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* complexed with tris: a tale of buffer inhibition. *Structure* **2002**, *10* (8), 1063-72.

Duschene, K. S.; Broderick, J. B., The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme. *FEBS Lett* **2010**, *584* (6), 1263-7.

F

Fedor, J. G.; Rothery, R. A.; Giraldi, K. S.; Weiner, J. H., Q-site occupancy defines heme heterogeneity in *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI). *Biochemistry* **2014**, *53* (11), 1733-41.

Fish, W. W., Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **1988**, *158*, 357-64.

Fontecave, M., Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat Chem Biol* **2006**, *2* (4), 171-4.

Fontecave, M.; Atta, M.; Mulliez, E., S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* **2004**, 29(5), 243-9.

Fontecave, M.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Mulliez, E., Biological radical sulfur insertion reactions. *Chem Rev* **2003**, 103 (6), 2149-66.

Forouhar, F.; Arragain, S.; Atta, M.; Gambarelli, S.; Mouesca, J. M.; Hussain, M.; Xiao, R.; Kieffer-Jaquinod, S.; Seetharaman, J.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Mulliez, E.; Hunt, J. F.; Fontecave, M., Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nat Chem Biol* **2013**, 9 (5), 333-8.

Frey, P. A.; Essenberg, M. K.; Abeles, R. H., Studies on the mechanism of hydrogen transfer in the cobamide coenzyme-dependent dioldehydrase reaction. *J Biol Chem* **1967**, 242 (22), 5369-77.

Frey, P. A.; Hegeman, A. D.; Reed, G. H., Free radical mechanisms in enzymology. *Chem Rev* **2006**, 106 (8), 3302-16.

Funatsu, G.; Yaguchi, M.; Wittmann-Liebold, B., Primary structure of protein S12 from the small Escherichia coli ribosomal subunit. *FEBS Lett* **1977**, 73 (1), 12-7.

G

Gambarelli, S.; Luttringer, F.; Padovani, D.; Mulliez, E.; Fontecave, M., Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase by S-adenosylmethionine. *Chembiochem* **2005**, 6 (11), 1960-2.

Gehrke, C. W.; Kuo, K. C., Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **1989**, 471, 3-36.

Grove, T. L.; Livada, J.; Schwalm, E. L.; Green, M. T.; Booker, S. J.; Silakov, A., A substrate radical intermediate in catalysis by the antibiotic resistance protein Cfr. *Nat Chem Biol* **2013**, 9 (7), 422-7.

H

Haller, T.; Buckel, T.; Rétey, J.; Gerlt, J. A., Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by Escherichia coli. *Biochemistry* **2000**, 39 (16), 4622-9.

Halpern, J., Mechanisms of coenzyme B12-dependent rearrangements. *Science* **1985**, 227 (4689), 869-75.

Heering, H. A.; Bultink, Y. B.; Hagen, W. R.; Meyer, T. E., Reversible super-reduction of the cubane [4Fe-4S](3+;2+;1+) in the high-potential iron-sulfur protein under non-

denaturing conditions. EPR spectroscopic and electrochemical studies. *Eur J Biochem* **1995**, 232 (3), 811-7.

Hinckley, G. T.; Frey, P. A., Cofactor dependence of reduction potentials for [4Fe-4S]^{2+/1+} in lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry* **2006**, 45 (10), 3219-25.

Hu, Y.; Ribbe, M. W., A journey into the active center of nitrogenase. *J Biol Inorg Chem* **2014**, 19 (6), 731-6.

Hubrich, M.; Jeschke, G.; Schweiger, A., The generalized hyperfine sublevel coherence transfer experiment in one and two dimensions. *J Chem Phys* **1996**, 104, 2172.

J

Jarrett, J. T., The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2003**, 7 (2), 174-82.

Jarrett, J. T., The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase. *Arch Biochem Biophys* **2005**, 433 (1), 312-21.

Jenner, L. B.; Demeshkina, N.; Yusupova, G.; Yusupov, M., Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, 17 (5), 555-60.

Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D. ; Johnson, M. K., Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **2005**, 74, 247-81.

K

Kim, H. J.; McCarty, R. M.; Ogasawara, Y.; Liu, Y. N.; Mansoorabadi, S. O.; LeVieux, J.; Liu, H. W., GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme. *J Am Chem Soc* **2013**, 135 (22), 8093-6.

Krebs, C.; Broderick, W. E.; Henshaw, T. F.; Broderick, J. B.; Huynh, B. H., Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: a Mössbauer spectroscopic study. *J Am Chem Soc* **2002**, 124 (6), 912-3.

L

Lancaster, C. R.; Kröger, A.; Auer, M.; Michel, H., Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* **1999**, 402 (6760), 377-85.

Landgraf, B. J.; Arcinas, A. J.; Lee, K. H.; Booker, S. J., Identification of an intermediate methyl carrier in the radical S-adenosylmethionine methylthiotransferases RimO and MiaB. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (41), 15404-16.

Layer, G.; Grage, K.; Teschner, T.; Schünemann, V.; Breckau, D.; Masoumi, A.; Jahn, M.; Heathcote, P.; Trautwein, A. X.; Jahn, D., Radical S-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN: functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-adenosyl-L-methionines. *J Biol Chem* **2005**, *280* (32), 29038-46.

Layer, G.; Heinz, D. W.; Jahn, D.; Schubert, W. D., Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8* (5), 468-76.

Lee, K. H.; Saleh, L.; Anton, B. P.; Madinger, C. L.; Benner, J. S.; Iwig, D. F.; Roberts, R. J.; Krebs, C.; Booker, S. J., Characterization of RimO, a new member of the methylthiotransferase subclass of the radical SAM superfamily. *Biochemistry* **2009**, *48* (42), 10162-74.

Lee, S. C.; Lo, W.; Holm, R. H., Developments in the biomimetic chemistry of cubane-type and higher nuclearity iron-sulfur clusters. *Chem Rev* **2014**, *114* (7), 3579-600.

Leutbecher, U.; Albracht, S. P.; Buckel, W., Identification of a paramagnetic species as an early intermediate in the coenzyme B12-dependent glutamate mutase reaction. A cob(II)amide? *FEBS Lett* **1992**, *307* (2), 144-6.

Lewis, J. C.; Coelho, P. S.; Arnold, F. H., Enzymatic functionalization of carbon-hydrogen bonds. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (4), 2003-21.

Licht, S. S.; Booker, S.; Stubbe, J., Studies on the catalysis of carbon-cobalt bond homolysis by ribonucleoside triphosphate reductase: evidence for concerted carbon-cobalt bond homolysis and thiyl radical formation. *Biochemistry* **1999**, *38* (4), 1221-33.

Lill, R., Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **2009**, *460* (7257), 831-8.

Lipscomb, W. N.; Sträter, N., Recent Advances in Zinc Enzymology. *Chem Rev* **1996**, *96* (7), 2375-2434.

M

Macleod, K. C.; Holland, P. L., Recent developments in the homogeneous reduction of dinitrogen by molybdenum and iron. *Nat Chem* **2013**, *5* (7), 559-65.

Marsh, E. N.; Patterson, D. P.; Li, L., Adenosyl radical: reagent and catalyst in enzyme reactions. *Chembiochem* **2010**, *11* (5), 604-21.

Massey, V., The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans* **2000**, *28* (4), 283-96.

Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S., Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev* **2004**, *104* (9), 3947-80.

Moore, J. A.; Poulter, C. D., Escherichia coli dimethylallyl diphosphate : tRNA dimethylallyltransferase : a binding mechanism for recombinant enzyme. *Biochemistry* **1997**, *36* (3), 604-14.

N

Noma, A.; Kirino, Y.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, T., Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *EMBO J* **2006**, *25* (10), 2142-54.

O

Ollagnier-de Choudens, S.; Nachin, L.; Sanakis, Y.; Loiseau, L.; Barras, F.; Fontecave, M., SufA from *Erwinia chrysanthemi*. Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **2003**, *278*(20), 17993-8001.

P

Pandelia, M. E.; Bykov, D.; Izsak, R.; Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Bill, E.; Neese, F.; Lubitz, W., Electronic structure of the unique [4Fe-3S] cluster in O₂-tolerant hydrogenases characterized by ⁵⁷Fe Mossbauer and EPR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (2), 483-8.

Perche-Letuvée, P.; Kathirvelu, V.; Berggren, G.; Clemancey, M.; Latour, J. M.; Maurel, V.; Douki, T.; Armengaud, J.; Mulliez, E.; Fontecave, M.; Garcia-Serres, R.; Gambarelli, S.; Atta, M., 4-Demethylwyosine synthase from *Pyrococcus abyssi* is a radical-S-adenosyl-L-methionine enzyme with an additional [4Fe-4S](+2) cluster that interacts with the pyruvate co-substrate. *J Biol Chem* **2012**, *287* (49), 41174-85.

Pierrel, F.; Björk, G. R.; Fontecave, M.; Atta, M., Enzymatic modification of tRNAs: MiaB is an iron-sulfur protein. *J Biol Chem* **2002**, *277* (16), 13367-70.

Q

Que, L., The oxo/peroxo debate: a nonheme iron perspective. *J Biol Inorg Chem* **2004**, *9* (6), 684-90.

R

Ratnatilleke, A.; Vrijbloed, J. W.; Robinson, J. A., Cloning and sequencing of the coenzyme B(12)-binding domain of isobutyryl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*, reconstitution of mutase activity, and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1999**, *274* (44), 31679-85.

Reed, G. H., Radical mechanisms in adenosylcobalamin-dependent enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8* (5), 477-83.

Roche, B.; Aussel, L.; Ezraty, B.; Mandin, P.; Py, B.; Barras, F., Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1827* (3), 455-69.

Rouault, T. A.; Tong, W. H., Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6* (4), 345-51.

S

Saunders, A. H.; Griffiths, A. E.; Lee, K. H.; Cicchillo, R. M.; Tu, L.; Stromberg, J. A.; Krebs, C.; Booker, S. J., Characterization of quinolinate synthases from *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Pyrococcus horikoshii* indicates that [4Fe-4S] clusters are common cofactors throughout this class of enzymes. *Biochemistry* **2008**, *47* (41), 10999-1012.

Shepard, E. M.; Mus, F.; Betz, J. N.; Byer, A. S.; Duffus, B. R.; Peters, J. W.; Broderick, J. B., [FeFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry* **2014**, *53* (25), 4090-104.

Shisler, K. A.; Broderick, J. B., Emerging themes in radical SAM chemistry. *Curr Opin Struct Biol* **2012**, *22* (6), 701-10.

Shisler, K. A.; Broderick, J. B., Glycyl radical activating enzymes: structure, mechanism, and substrate interactions. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *546*, 64-71.

Silakov, A.; Grove, T. L.; Radle, M. I.; Bauerle, M. R.; Green, M. T.; Rosenzweig, A. C.; Boal, A. K.; Booker, S. J., Characterization of a cross-linked protein-nucleic acid substrate radical in the reaction catalyzed by RlmN. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (23), 8221-8.

Sofia, H. J.; Chen, G.; Hetzler, B. G.; Reyes-Spindola, J. F.; Miller, N. E., Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29* (5), 1097-106.

Solomon, E. I.; Scott R. A.; R. Bruce King B., Computational Inorganic and Bioinorganic Chemistry. *Book* **2009**.

Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H., Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* **1996**, *96* (7), 2841-2888.

Stripp, S. T.; Soboh, B.; Lindenstrauss, U.; Brausseman, M.; Herzberg, M.; Nies, D. H.; Sawers, R. G.; Heberle, J., HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)₂CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry* **2013**, *52* (19), 3289-96.

Sucharitakul, J.; Tinikul, R.; Chaiyen, P., Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *555-556*, 33-46.

Suzuki, Y.; Noma, A.; Suzuki, T.; Senda, M.; Senda, T.; Ishitani, R.; Nureki, O., Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *J Mol Biol* **2007**, *372* (5), 1204-14.

U

Ugulava, N. B.; Sacanell, C. J.; Jarrett, J. T., Spectroscopic changes during a single turnover of biotin synthase: destruction of a [2Fe-2S] cluster accompanies sulfur insertion. *Biochemistry* **2001**, *40* (28), 8352-8.

Urbonavicius, J.; Stahl, G.; Durand, J. M.; Ben Salem, S. N.; Qian, Q.; Farabaugh, P. J.; Björk, G. R., Transfer RNA modifications that alter +1 frameshifting in general fail to affect -1 frameshifting. *RNA* **2003**, *9* (6), 760-8.

V

Van Berkel, W. J.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W., Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* **2006**, *124* (4), 670-89.

W

Walsby, C. J.; Ortillo, D.; Yang, J.; Nnyepi, M. R.; Broderick, W. E.; Hoffman, B. M.; Broderick, J. B., Spectroscopic approaches to elucidating novel iron-sulfur chemistry in the "radical-Sam" protein superfamily. *Inorg Chem* **2005**, *44*(4), 727-41.

Walters, E. M.; Garcia-Serres, R.; Jameson, G. N.; Glauser, D. A.; Bourquin, F.; Manieri, W.; Schürmann, P.; Johnson, M. K.; Huynh, B. H., Spectroscopic characterization of site-specific [Fe(4)S(4)] cluster chemistry in ferredoxin:thioredoxin reductase: implications for the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (26), 9612-24.

Walters, E. M.; Garcia-Serres, R.; Naik, S. G.; Bourquin, F.; Glauser, D. A.; Schürmann, P.; Huynh, B. H.; Johnson, M. K., Role of histidine-86 in the catalytic mechanism of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochemistry* **2009**, *48* (5), 1016-24.

Wang, S. C.; Frey, P. A., Binding energy in the one-electron reductive cleavage of S-adenosylmethionine in lysine 2,3-aminomutase, a radical SAM enzyme. *Biochemistry* **2007**, *46* (45), 12889-95.

Y

Yang, J.; Naik, S. G.; Ortillo, D. O.; García-Serres, R.; Li, M.; Broderick, W. E.; Huynh, B. H.; Broderick, J. B., The iron-sulfur cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme in whole cells: cluster interconversion and a valence-localized [4Fe-4S]²⁺ state. *Biochemistry* **2009**, *48* (39), 9234-41.

Young, A. P.; Bandarian, V., Pyruvate is the source of the two carbons that are required for formation of the imidazoline ring of 4-demethylwyosine. *Biochemistry* **2011**, *50* (49), 10573-5.

Young, A. P.; Bandarian, V., Radical mediated ring formation in the biosynthesis of the hypermodified tRNA base wybutosine. *Curr Opin Chem Biol* **2013**, *17* (4), 613-8.

Z

Zelder, O.; Beatrix, B.; Leutbecher, U.; Buckel, W., Characterization of the coenzyme-B12-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium* produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **1994**, *226* (2), 577-85.

Zhang, Y.; Zhu, X.; Torelli, A. T.; Lee, M.; Dzikovski, B.; Koralewski, R. M.; Wang, E.; Freed, J.; Krebs, C.; Ealick, S. E.; Lin, H., Diphthamide biosynthesis requires an organic radical generated by an iron-sulphur enzyme. *Nature* **2010**, *465* (7300), 891-6.