



Etude structurale et fonctionnelle de la Quinolinate Synthase : une protéine fer-soufre cible d'agents antibactériens

Carine Rousset

► **To cite this version:**

Carine Rousset. Etude structurale et fonctionnelle de la Quinolinate Synthase : une protéine fer-soufre cible d'agents antibactériens. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. <tel-00576109>

HAL Id: tel-00576109

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00576109>

Submitted on 12 Mar 2011

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.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES ET GEOGRAPHIE
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie / Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Carine ROUSSET

Le 4 Mai 2009

**Etude Structurale et Fonctionnelle de la
Quinolinate Synthase : une protéine fer-soufre
cible d'agents antibactériens**

Composition du jury

Président : Prof. Franck FIESCHI
Rapporteurs : Prof. Jean-Pierre MAHY
Prof. Olivier PLOUX
Examineur : Dr. Bertrand GAKIERE
Invité : Prof. Juan-Carlos FONTECILLA-CAMPS
Directeur : Prof. Marc FONTECAVE
Co-directrice : Dr. Sandrine OLLAGNIER-DE CHOUDENS

**Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
CEA – Grenoble
iRTSV/LCBM – CNRS – Université Joseph Fourier**

*« Il faut toujours viser la lune
car même en cas d'échec on atterrit au milieu des étoiles »*

Oscar Wilde

*« Une personne qui n'a jamais commis
d'erreurs n'a jamais innové »*

Albert Einstein

*À mes parents
Mon frère*

Pour leur soutien et leurs encouragements

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Fontecave de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, et de m'avoir ainsi permis d'y effectuer ma thèse.

Je remercie également, Sandrine Ollagnier-de Choudens, qui m'a encadrée durant ces 3 années de thèse. Mon arrivée a été une « surprise » pour toi et ses trois années n'ont pas été un long fleuve tranquille mais j'ai beaucoup appris aussi bien professionnellement que personnellement. Travailler sur un sujet quasi vierge n'a pas toujours été chose facile, mais ceci m'a permis de toucher à beaucoup de domaines et d'acquérir une riche expérience. Tu m'as inculqué une rigueur et une acidité au travail qui me seront j'en suis sûre précieuses pour la suite, je te remercie également pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit et également lors de la préparation de la soutenance et pour tes conseils judicieux.

Je tiens à remercier les différentes personnes qui ont collaboré à mon travail

*Je souhaiterais tout d'abord remercier Olivier Hamelin pour le travail effectué en chimie. Je remercie Michel Thérisod qui m'a fourni la plupart de molécules chimiques que j'ai testées et qui m'a accueilli au sein de son laboratoire en plein mois d'août dans un laboratoire quasi désert. Un grand merci à Claudine Darnault et Juan-Carlos Fontecilla pour tous les essais de cristallisation de la protéine. Merci également à Stewart Cole qui a effectué les tests *in vivo* de molécules chimiques. Merci à toutes les personnes qui ont effectués les différentes analyses : Yiannis Sanakis pour les analyses Mossbauer, Serge Gambarelli pour les analyses Hyscore et également à Frédéric Barras et Ménico Rizzi qui nous ont fourni les plasmides codant pour la Quinolinate Synthase d'*E.coli* et de *M. tuberculosis* et pour terminer Marinus et Elizabeth Pilon-Smith pour la collaboration concernant la Quinolinate Synthase d'*A. thaliana*.*

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Franck Fieschi, Jean-Pierre Mahy, Olivier Ploux, Bertrand Gakière, Juan-Carlos Fontecilla-Camps pour avoir accepté de juger mon travail et pour les corrections qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Il me reste à remercier l'ensemble des membres du Laboratoire, l'ensemble des permanents pour toutes les discussions scientifiques et les séances de motivation quand la science marche moins bien.

Je souhaite également remercier toutes personnes dont j'ai fait la connaissance au laboratoire et avec qui j'ai partagé de bons moments, Maité, Alexia, Emilie, Carole M., Carole B., Guni, Caroline R., Sigolène, Florence (ma co-bureau), Pascal, Pierre, Aziz, Yohan, Eric, Simon, Pierre-André, Cécile, Silke, Adeline, Vinita, Chantal.

Sommaire

Abréviations	p18
Introduction Bibliographique	p24
I- Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide	p26
I-1 <u>Structure</u>	p26
I-2 <u>Propriétés physico-chimiques du NAD</u>	p27
I-3 <u>Les différentes fonctions du NAD</u>	p28
a- Rôle dans le métabolisme rédox.....	p28
b- Rôle dans le métabolisme non rédox.....	p30
I-4 <u>Concentration physiologique du NAD et sa localisation cellulaire chez les eucaryotes</u>	p32
a- Localisation cellulaire.....	p32
b- Concentration en NAD.....	p33
II- La biosynthèse du NAD	p33
II-1 <u>Les voies principales ou <i>de novo</i></u>	p34
a- La voie <i>de novo</i> chez la bactérie.....	p34
b- La voie principale <i>de novo</i> chez les eucaryotes.....	p36
c- De l'acide quinolinique au NAD.....	p38
d- Aspects structuraux de la voie de biosynthèse <i>de novo</i> chez la bactérie.....	p41
II-2 <u>Les voies de secours ou de recyclage</u>	p43
a- Chez les procaryotes, les eucaryotes et les plantes (à l'exception des mammifères).....	p43
b- Chez les mammifères.....	p46
II-3 <u>La régulation de la biosynthèse du NAD</u>	p48
a- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NadR.....	p48
b- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NiaR.....	p49
c- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NrtR.....	p50
II-4 <u>La voie de biosynthèse du NAD comme un modèle de l'évolution</u>	p52
III- Le NAD comme une cible pharmacologique	p52
III-1 <u>Le NAD comme cible de l'isoniazide</u>	p52
III-2 <u>L'inhibition ou l'activation d'enzymes NAD dépendantes</u>	p53
III-3 <u>L'inhibition d'enzyme de la biosynthèse du NAD</u>	p53

III-4	<u>Les antibiotiques et les résistances</u>	p56
IV-	Le système quinolinate synthase	p57
IV-1	<u>Historique : Mise en évidence de NadA et NadB comme des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse <i>de novo</i> du NAD</u>	p57
IV-2	<u>Découverte des substrats</u>	p58
IV-3	<u>Caractérisation de la L-Aspartate oxydase (NadB)</u>	p62
IV-4	<u>La quinolinate synthase : une enzyme sensible à l’oxygène</u>	p65
IV-5	<u>Purification et premières caractérisation de la quinolinate synthase</u>	p66
a-	Purification de la protéine sous forme d’une apoprotéine.....	p66
b-	Purification de la protéine sous forme métallée (holoenzyme).....	p67
IV-6	<u>Aspects structuraux : Première structure tridimensionnelle de la quinolinate synthase</u>	p68
IV-7	<u>Le « complexe quinolinate synthase NadA-NadB »</u>	p69
IV-8	<u>Un mécanisme complexe : les différentes propositions</u>	p70
a-	La première hypothèse de mécanisme.....	p70
b-	La seconde hypothèse de mécanisme.....	p71
	Objectifs de la thèse	p73
	Matériels et Méthodes (M&M)	p76
I-	Matériels Biologiques	p78
II-1	Les ADN génomiques.....	p78
II-2	Les souches bactériennes.....	p78
II-3	Les plasmides utilisés.....	p79
II-4	Les milieux de cultures.....	p80
II-	Matériels Chimiques	p81
III-	Matériels de Biologie Moléculaire	p83
III-1	Transformation des souches <i>Escherichia coli</i>	p83
III-1-1	<u>Préparation de cellules compétentes</u>	p83
III-1-2	<u>Transformation des cellules compétentes</u>	p83

III-2	Préparation d'ADN plasmidique.....	p84
III-3	Amplification d'un fragment d'ADN par PCR.....	p84
III-3-1	<u>Amplification de fragments d'ADN pour le clonage</u>	p84
III-3-2	<u>Amplification de plasmides entiers pour l'insertion de mutations dans le gène cloné</u>	p85
III-4	Purification d'ADN.....	p87
III-5	Analyse d'ADN sur gel d'agarose.....	p87
III-6	Clonage.....	p88
III-6-1	<u>Préparation du fragment d'ADN</u>	p88
i-	Préparation du fragment d'ADN obtenu par PCR.....	p88
ii-	Préparation du plasmide.....	p88
iii-	Ligation.....	p88
IV-	Méthodes de Biochimie	p89
IV-1	La surexpression des protéines.....	p89
IV-2	Préparation d'extraits cellulaires.....	p89
IV-2-1	<u>Par cycles congélation-décongélation</u>	p89
IV-2-2	<u>Par sonication</u>	p90
IV-3	Purification des protéines.....	p90
IV-3-1	<u>Purification des protéines NadA sauvage et mutée d'<i>E. coli</i>, NadA de <i>M. tuberculosis</i>, NadA d'<i>A. thaliana</i> ainsi que NadB d'<i>E. coli</i></u>	p90
IV-3-2	<u>Purification de la protéine NadA de <i>Thermotoga maritima</i></u>	p91
IV-4	Reconstitution chimique du cluster [Fe-S] de la quinolinate synthase de <i>T. maritima</i>	p91
IV-5	Préparation de l'apoprotéine.....	p92
IV-6	Reconstitution de la protéine NadB avec du FAD.....	p92
IV-7	Mesure d'activités enzymatiques.....	p92
IV-7-1	<u>Mesure de l'activité quinolinate synthase (NadA) <i>in vitro</i></u>	p92
i-	Génération enzymatique d'iminoaspartate.....	p93
ii-	Génération chimique d'iminoaspartate.....	p94
IV-7-2	<u>Mesure de l'activité quinolinate synthase (NadA) <i>in vivo</i> par test de complémentation</u>	p95
IV-7-3	<u>Mesure de l'activité L-Aspartate oxydase (NadB) : suivi de la réduction du cytochrome c</u>	p96

IV-7-4	<u>Mesure de l'activité Glycérophosphate déshydrogénase (GPDH)</u>	p98
IV-7-5	<u>Mesure de l'activité Glyceraldéhyde-3-P déshydrogénase (GAPD)</u>	p99
IV-8	Dosage des ponts disulfures dans NadA par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH).....	p100
IV-9	Réduction des ponts disulfure par le dithiothréitol (DTT).....	p101
IV-10	Analyses Biochimiques.....	p102
IV-10-1	<u>Dosage des protéines par la méthode de Bradford</u>	p102
IV-10-2	<u>Dosage des protéines par dosage des acides aminés</u>	p102
IV-10-3	<u>Electrophorèse des protéines : SDS-PAGE</u>	p103
IV-10-4	<u>Dosage du fer</u>	p104
IV-10-5	<u>Dosage du soufre</u>	p105
V-	Tests de croissance de différentes mycobactéries en présence de molécules chimiques	p107
VI-	Techniques physico-chimiques-Méthodes analytiques	p108
VI-1	Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse.....	p108
VI-2	La spectroscopie d'absorption UV-visible.....	p108
VI-3	La spectroscopie Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).....	p110
VI-4	La spectroscopie Hyscore.....	p111
VI-5	La spectroscopie Mössbauer.....	p113
VI-6	Dosage des métaux par ICP-MS.....	p115
	Liste des Tampons	p116
	Résultats	p119
	Résultats : Chapitre I	p116
I-	Obtention des protéines NadA et NadB	p122
I-1	<u>Obtention des différents plasmides et surexpression des protéines NadA et NadB</u>	p122
I-2	<u>Purification et caractérisation biochimique et spectroscopique des protéines</u>	p123
I-2-1	La L-Aspartate oxydase (NadB) d' <i>E. coli</i>	p123

I-2-2	Les différentes quinolinate synthases.....	p125
	a-NadA d' <i>E. coli</i> : protéines sauvage et mutée.....	p125
	b-NadA de <i>M. tuberculosis</i>	p130
	c-SufE3 d' <i>A. thaliana</i>	p133
	d-NadA de <i>T. maritima</i>	p139
I-2-3	Mesure de la concentration des protéines : dosage des acides aminés.....	p144
II-	Mesure des activités enzymatiques.....	p144
II-1	<u>L'activité L-Aspartate oxydase (NadB)</u>	p144
II-2	<u>L'activité quinolinate synthase (NadA)</u>	p146
II-2-1	Cinétique de formation de l'acide quinolinique.....	p148
II-2-2	Génération chimique d'iminoaspartate.....	p148
II-2-3	Influence du rapport NadA/NadB sur l'activité quinolinate synthase.....	p149
II-2-4	Les différentes constantes cinétiques de la quinolinate synthase d' <i>E. coli</i>	p149
a-	K_m et V_{max}	p149
b-	L'activité spécifique.....	p150
III-	Etude des ligands du centre [4Fe-4S].....	p152
III-1	<u>Caractérisation biochimique et spectroscopique des protéines mutées</u>	p153
III-1-1	Purification et détermination des quantités de Fe et de S.....	p153
III-1-2	Analyse en spectroscopie UV-visible.....	p154
III-1-3	Détermination de l'état d'oligomérisation des protéines NadA sauvage et mutées.....	p156
III-2	<u>Mesure de l'activité des protéines NadA (sauvage et mutées)</u>	p157
III-2-1	Mesure de l'activité quinolinate synthase <i>in vitro</i>	p157
III-2-2	Mesure de l'activité quinolinate synthase <i>in vivo</i> par complémentation.....	p159
III-3	<u>Etude du rôle des cystéines Cys291 et Cys294</u>	p163
III-3-1	Mesure des ponts disulfures : système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH).....	p164
III-3-2	Lien entre activité enzymatique et pont disulfure.....	p163
a-	Mesure d'activité enzymatique après réduction avec le système Trx/Trr/NADPH.....	p166
b-	Mesure d'activité enzymatique après réduction avec du DTT.....	p166

Discussion.....p168

Résultats : Chapitre II.....p182

I- **Les constantes cinétiques de la quinolinate synthase d'*E. coli* et de *M. tuberculosis***.....p185

II- **La quinolinate synthase comme une cible d'agents antibactériens**.....p187

II-1 **Choix et tests des différentes molécules inhibitrices sur la quinolinate synthase d'*E. coli***.....p187

a- Les différentes familles de molécules testées.....p187

b- Mise au point du test d'inhibition.....p191

c- Résultats.....p191

II-2 **Le PGH comme inhibiteur de la quinolinate synthase d'*E. coli***.....p195

a- Spécificité de l'inhibition.....p195

b- Détermination des constantes cinétiques.....p197

c- Le centre [4Fe-4S] comme cible du PGH ?.....p202

II-3 **Test *in vitro* du PGH sur la quinolinate synthase de *M. tuberculosis***.....p206

II-4 **Test *in vivo* de trois molécules inhibitrices (PGH, PnGH et PmGH) sur différentes mycobactéries**.....p208

Discussion.....p209

Résultats : Chapitre III.....p216

I- **Un centre [Fe-S] essentiel à l'activité de NadA : implication dans la catalyse ?**.....p220

II-1 **Existe-t-il une interaction entre le DHAP et le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase**.....p221

a- Analyse par spectroscopie RPE.....p221

b- Analyse par spectroscopie Hyscore.....p221

c- Analyse par spectroscopie Mössbauer.....p223

II-2 <u>Le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase a-t-il un rôle dans les étapes de déshydratation</u>	p225
a- Analyse par spectroscopie RPE du centre [4Fe-4S] ⁺ de la quinolinate synthase en présence des deux substrats.....	p225
b- Analyse par spectroscopie Mössbauer de NadA en présence des deux substrats.....	p226
II- <u>Etude du mécanisme réactionnel de la quinolinate synthase</u>	p228
II-1 <u>Le Glyceraldéhyde 3-phosphate est substrat de NadA</u>	p228
II-2 <u>Mise en évidence d'une nouvelle activité pour la quinolinate synthase</u>	p229
II-2-1 Conversion du DHAP en Glyceraldéhyde 3-phosphate.....	p230
a- Mesure de l'activité GPDH.....	p230
b- Mesure de l'activité GAPD c'est-à- dire de la formation de G-3P à partir du DHAP.....	p232
II-2-2 Conversion du G-3P en DHAP.....	p234
II-3 <u>Le PGH inhibe t-il l'activité quinolinate synthase lors de l'utilisation du G-3P ?</u>	p237
Discussion	p239
Conclusion générale	p249
Références Bibliographiques	p256
Publications	p271

Abréviations

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ADP-Ribose	Adénosine diphosphate ribose
ADPc	Adénosine diphosphate ribose cyclique
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
APS	Ammonium PerSulfate
ARN	Acide RiboNucléique
AS	Ammonium sulfate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BBP	Bleu de Bromophénol
BET	Bromure d'Ethidium
BSA	Albumine Sérique Bovine
CaCl₂	Chlorure de Calcium
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DMPD	DiMéthyl Phénylène Diamine
DTT	DiThioThreitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine TétraAcétique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
G-3P	Glycéraldéhyde 3-phosphate
HCl	Acide Chloridrique
HTH	Helix Turn Helix
IA	Iminoaspartate
IPP	Inhibiteur de la pompe à proton
IPTG	IsoPropyl- β -D-ThioGalactopyranoside
L-Asp	L-Aspartate
LB	Luria Bertani
L-Trp	L-Tryptophane
Na	Acide Nicotinique
NaAD	Acide nicotinique adénine dinucléotide
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ⁺ et NADH)

NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP ⁺ et NADPH)
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NaMN	Acide Nicotinique Mononucléotide
NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
Ni-NTA	Nickel- Acide NitiloTriacétique
Nm	Nicotinamide
NMN	Nicotinamide mononucléotide
OAA	Oxaloacétique acid
PCA	Acide PerChlorique
PEI	Polyéthylène Imine
PPi	Pyropvphosphate inorganique
PRPP	5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphate
QA	Acide quinolinique
RNm	N-Ribosylnicotinamide
SAM	S-Adénosyl Méthionine
TEMED	N, N, N', N'-TétraMéthylEthylène Diamine
TFA	Trifluoro acetic acid
Trx	Thiorédoxine

Enzymes

ARTs	Adénosine diphosphate ribosyltransférase
FBPA	Fructose bisphosphate aldolase
GAPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshyrogénase
GPDH	Glycérophosphate déshydrogénase
GST	Glutathion S-transférase
HAD	3-Hydroxyxanthranilate 3,4-dioxygénase
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
KFA	Kynurénine formamidase
KMO	Kynurénine 3-monooxygénase
KYN	Kynuréninase

NadA	Quinolinate synthase
NadB	L-Aspartate Oxydase
NadC	Quinolinate phosphoribosyltransférase
NadD	Acide nicotinique adényltransférase
NadE	NAD synthétase
NadF	NAD kinase
NadR_K	Ribosylnicotinamide kinase
NadR_A	Nicotinamide mononucléotide adényltransférase
NadR, NiaR, NrtR	Régulateur de la biosynthèse du NAD
NadV	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
Nmnat1,2,3	Nicotinamide adényltransférase
PARPs	Poly-(ADP-ribose) polymérase
PncA	Nicotinamidase
PncB	Acide nicotinique phosphoribosyltransférase
PnuC	Transporteur de nicotinamide ribonucléoside
TDO	Tryptophane 2,3-dioxygénase
TIM	Triose phosphate isomérase
Trr	Thiorédoxine réductase

Unité/Référence

Å	Angström
DO	Densité Optique
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
Da	Dalton
kDa	KiloDalton
mL	MilliLitre
mM	MilliMolaire
mV	MilliVolt
µL	MicroLitre
µM	MicroMolaire
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pb	Paire de Bases

Rpm Tours par minute

Constantes

AS Activité spécifique en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$
CMI Concentration minimale d'inhibition en μM
IC₅₀ Concentration d'inhibiteur (μM) pour laquelle l'AS de l'enzyme est de 50 %
K_i Constante d'inhibition
K_m Constante de Michaelis-Menten
V_{max} Vitesse maximale (nmoles/min)

Techniques

FPLC Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC Chromatographie Liquide Haute Pression
Hyscore Hyperfine Sublevel CORRElation spectroscopy
ICP-MS Inductively coupled Plasma Mass Spectrometer
PCR Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
RPE Résonance Paramagnétique Electronique
SDS-PAGE Sodium Dodécyl Sulfate polyAcrylamide Gel Electrophoresis
UV Ultra Violet

Introduction bibliographique

Introduction
bibliographique

Depuis le début du siècle de nombreux scientifiques ont contribué à la découverte du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) ainsi qu'à la résolution de sa structure et de sa fonction. Parmi eux 4 lauréats avec prix Nobel. Le premier à identifier un composé de faible masse moléculaire (664 Da) dans des extraits de levure essentiels à la fermentation des sucres est Sir Arthur Harden en 1904 (Harden A., 1906). Il appellera ce composé « Cozymase ». C'est Hans von Euler-Chelpin qui entre 1920 et 1935 réussit à isoler ce cozymase et à mettre en évidence qu'il s'agit de deux nucléotides reliés par un pont pyrophosphate. En 1936, Otto Warburg identifie sa fonction redox (Warburg O., 1936). En 1940, Arthur Kornberg est le premier à mettre en évidence une enzyme impliquée dans la biosynthèse du NAD (Kornberg A., 1948). C'est en 1959 que Jack Preiss et Phillip Handler décrivent trois enzymes et deux intermédiaires stables impliquées dans la synthèse du NAD à partir de l'acide nicotinique. En leur honneur, cette voie de biosynthèse est communément appelée voie « Preiss-Handler » (Preiss, 1958 a, b). Sir Arthur Harden était loin de s'imaginer que plus de 100 ans plus tard, ce cozymase serait toujours au centre d'autant d'intérêts (Berger F., 2004).

I- Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide

I-1 Structure

Le **Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD)** est composé de deux nucléotides reliés par un pont phosphate. Un des nucléotides contient une adénine tandis que l'autre contient un nicotinamide (Figure 1). Le NAD existe sous deux formes : NAD^+ qui constitue la forme oxydée et NADH qui constitue la forme réduite. Le NAD désigne le couple NAD^+/NADH sans différenciation entre la forme oxydée et réduite (Pollak N., 2007).

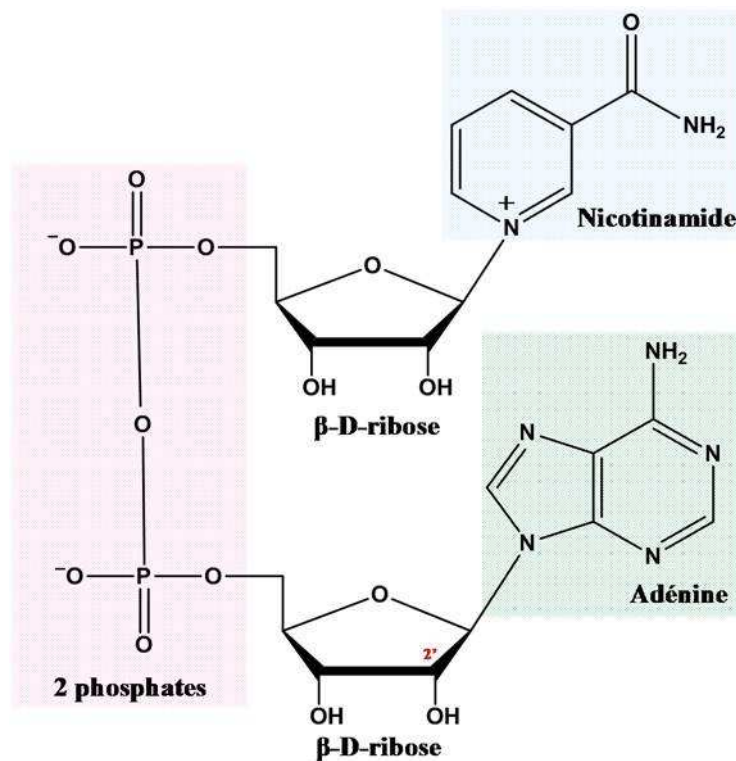


Figure 1 : Structure chimique du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+).

Le NAD existe aussi sous une forme phosphorylée (NADP) au niveau du 2'hydroxyle du sucre du nucléotide portant l'adénine. D'une manière générale le NADP , comme le NAD, existe sous deux formes : $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, et il possède les mêmes fonctions redox que le NAD. La différence se fait au niveau de leur utilisation dans la cellule : **le NADP** est le plus souvent utilisé comme agent de réduction dans les **processus de biosynthèse** (photosynthèse, synthèse des acides gras...), alors que **le NAD** est impliqué dans **les voies de catabolisme** ou il agit comme oxydant.

I-2 Propriétés physico-chimiques du NAD

Dans le métabolisme cellulaire cette molécule est capable d'accepter ou de donner des électrons dans des réactions rédox. Ce transfert d'électrons est réalisé au niveau de la partie nicotinamide du NAD. La réduction du NAD^+ correspond à l'apport de deux électrons et d'un hydrogène sous la forme d'un hydrure ($2e^- + \text{H}^+$) au niveau du C-4 du noyau nicotinamide du NAD (Figure 2) (Metzler D.E., 2001).

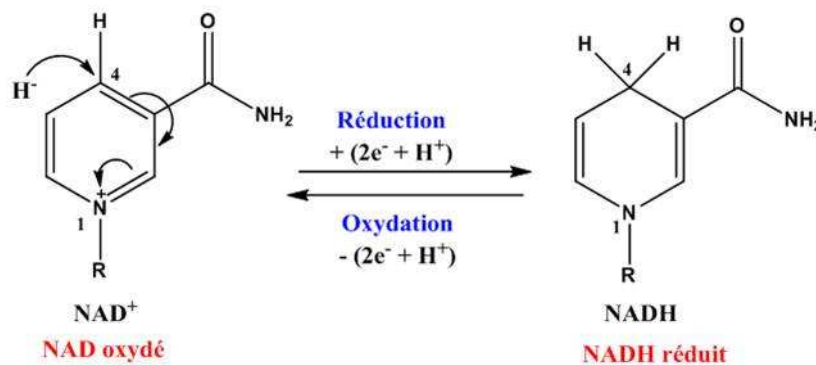


Figure 2 : Réaction d'oxydoréduction du NAD, le NAD^+ est réduit en NADH et de façon réversible le NADH est oxydé en NAD^+ , R = partie adénine dinucléotide.

Dans la cellule, le NAD^+ est un agent d'oxydation et le NADH est un agent de réduction. Le potentiel standard du couple NAD^+/NADH est de $E^\circ = -320 \text{ mV}$ (par rapport ENH, pH 7). L'équilibre entre la forme oxydée et réduite est appelé **rapport NAD^+/NADH** . Ce rapport est une composante importante de ce qui est communément appelé **état rédox de la cellule**. La mesure de ce rapport permet de mettre en évidence les activités métaboliques ainsi que la « bonne santé » de la cellule. En général, il est constant dans un même compartiment cellulaire. Dans les cellules vivant en aérobiose, le coenzyme est plus souvent oxydé d'où un rapport $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ de 8 à 10. Le potentiel réel d'oxydoréduction du couple NAD^+/NADH est alors plus élevé soit E° égal à -250 à -290 mV (par rapport ENH) (Schafer F., 2001).

Les molécules de NAD^+ et de NADH absorbent fortement dans les UV grâce à leur partie adénine ce qui permet de déterminer facilement leur présence et leur quantité dans un milieu donné. Le NAD^+ possède un maximum d'absorbance à 260 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{260 \text{ nm}} = 16\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Le NADH possède en plus de cette bande d'absorbance un second pic d'absorbance à 340 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{340 \text{ nm}}$ de $6\,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cette différence d'absorbance dans l'UV des deux formes, oxydée

et réduite, permet de les quantifier facilement lors des tests enzymatiques (Dawson M.C., 1987).

I-3 Les différentes fonctions du NAD

Le NAD a plusieurs rôles essentiels dans le métabolisme cellulaire. Pendant de nombreuses années, l'unique fonction décrite du NAD était son action comme cofacteur dans les réactions rédox. Depuis quelques années, son implication dans de nombreux processus non rédox a été décrite, il est ainsi le substrat des ADN ligases bactériennes, des sirtuines ainsi que des ADP-ribosyltransférases.

a- Rôle dans le métabolisme rédox

- **Coenzyme des oxydoréductases**

Le rôle principal du NAD dans le métabolisme rédox est représenté par une grande famille d'enzymes appelées **oxydoréductases**. Parmi ces enzymes, on peut citer par exemple l'alcool déshydrogénase, la lactate déshydrogénase, la NAD-ubiquinone réductase. Le type de réaction catalysée est résumé dans la Figure 3 (Metzler D.E., 2001).

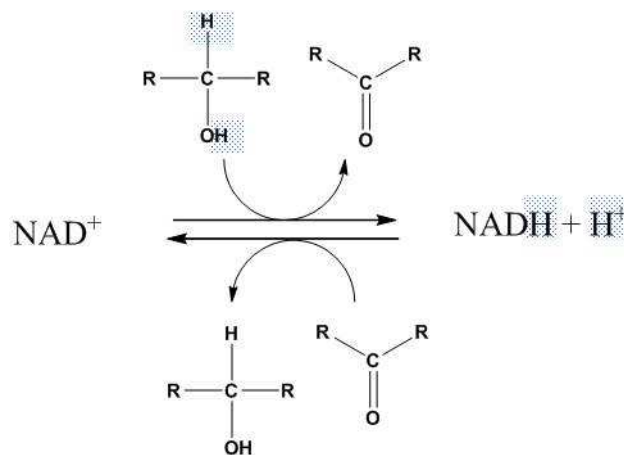


Figure 3 : Exemple de réaction catalysée par une oxydoréductase NAD dépendante : cas de l'alcool déshydrogénase. Lors de la réduction du NAD⁺, l'un des atomes d'hydrogène de l'alcool va être lié au NAD⁺ qui est alors converti en NADH, l'autre hydrogène est libéré sous la forme d'un proton.

Sauf quelques exceptions, le NAD^+ (ou NADH) se lie à la protéine, au niveau d'un motif caractéristique « **motif de Rossmann** », ce motif de repliement contient au minimum trois feuillets β reliés par deux hélices α dans l'ordre β - α - β - α - β (Figure 4) (Lesk A.M., 1995).

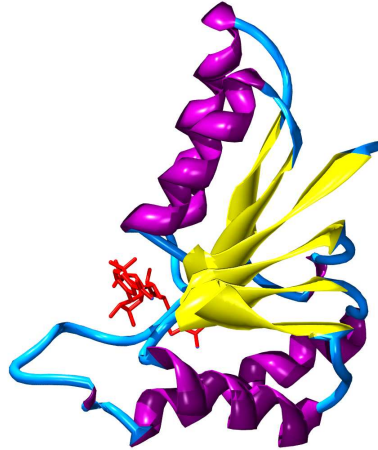


Figure 4 : Le motif de Rossmann : Exemple de la lactate déshydrogénase de *Cryptosporidium parvum*, le NAD^+ apparaît en rouge, les feuillets β en jaune et les hélices α en violet (Lesk A.M., 1995).

La NAD(P) transdéshydrogénase est un membre particulier de la famille des oxydoréductases. Cette enzyme présente chez de nombreuses bactéries, située dans la mitochondrie chez les eucaryotes, est un complexe constitué de deux sous unités α et β . Codée par l'opéron *pntA-pntB*, elle couple la réaction de réduction du NADP^+ en NADPH avec la réaction d'oxydation du NADH en NAD^+ (Figure 5). Elle joue ainsi un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre cellulaire qui existe entre les réactions de catabolisme liées à la production de NADH et les réactions d'anabolisme liées à la consommation de NADPH (Johansson T.C., 2005).

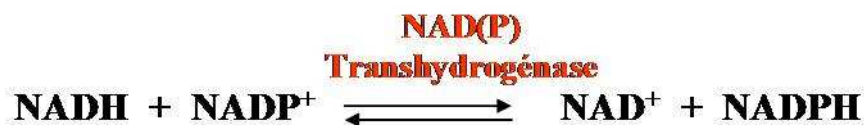


Figure 5 : Réaction catalysée par la NAD(P) transdéshydrogénase.

- **Rôle central des oxydoréductases dans le métabolisme cellulaire**

Les réactions redox catalysées par les oxydoréductases sont essentielles dans le métabolisme cellulaire. Elles jouent un rôle prédominant dans les **réactions de libération d'énergie à partir des nutriments**. Une grande partie de l'énergie produite dans les voies de catabolisme (des protéines, des lipides et des sucres) se retrouve contenue dans le NADH. Cette énergie est convertie en ATP dans la mitochondrie au cours de la respiration cellulaire.

Ainsi chaque mole de NADH consommée par la mitochondrie peut fournir l'énergie nécessaire à la formation de 3 molécules d'ATP lors de l'étape ultime de phosphorylation oxydative (Figure 6) (Rich P.R., 2003).

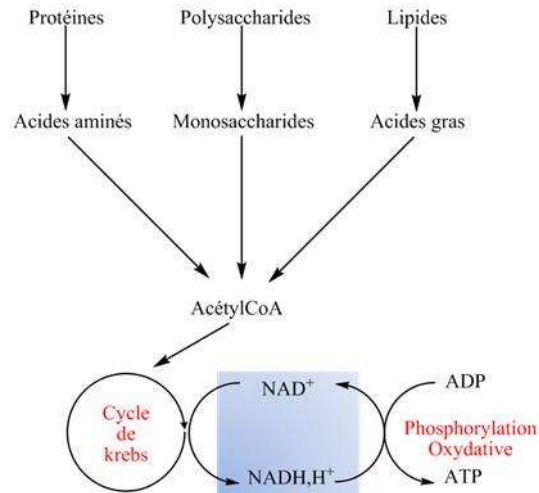


Figure 6 : Schéma simplifié montrant la place centrale du NAD dans le métabolisme redox comme lien entre le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

b- Rôle dans le métabolisme non redox

De récentes études ont permis de mettre en évidence la place centrale qu'occupe le NAD dans la régulation de diverses voies métaboliques. En effet, le NAD sert de **substrat dans de nombreuses réactions non redox** en tant que substrat des ADP-ribosyltransférases, des sirtuines ainsi que des ADN ligases bactériennes. Il sert également de précurseur dans la formation de l'ADP-ribose cyclique (Ziegler M., 2000 ; Belenky P., 2006).

- **Le NAD comme substrat des réactions d'ADP-ribosylation**

Le NAD⁺ est utilisé lors de réactions de transfert d'ADP-ribose. Les enzymes qui effectuent ces réactions sont les **ADP-ribosyltransférases (ARTs)** et les **poly-(ADP-ribose) polymérase (PARPs)** (Diefenbach J., 2005). Elles ajoutent une partie ADP-ribose sur des protéines et/ou forment des polymères d'ADP-ribose. On peut trouver des réactions de mono-, ou de poly-ADP-ribosylation (Figure 7, Cas 1). Cette modification constitue une modification post-traductionnelle appelée **ADP-ribosylation**. Les ADP-ribosylations sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont la plus grande partie a lieu dans le noyau, les plus importants étant liés à la réparation de l'ADN ou au maintien des télomères (Burkle A., 2005).

- **Le NAD comme précurseur de l'ADP-ribose cyclique**

Une autre fonction de ce coenzyme dans la signalisation cellulaire est son utilisation comme un précurseur dans la formation **d'ADP-ribose cyclique via l'ADP-ribose synthase** (Figure 7, Cas 2). L'ADPc ribose joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du calcium en entraînant sa libération des stocks intracellulaires par liaison avec une classe de récepteurs à la ryanodine. Le Ca^{2+} libéré du réticulum endoplasmique va entre autres choses déclencher la contraction des muscles striés (Guse A.H., 2004a,b).

- **Le NAD comme substrat des sirtuines**

Les **sirtuines** forment une famille de désacétylases NAD-dépendantes présentes chez les eucaryotes, les procaryotes ainsi que les archaebactéries. Le membre le plus connu de cette famille est Sir2 pour **Silent information regulator**, qui a été très étudié chez *Saccharomyces cerevisiae* (chez *E. coli*, elle est appelée CobB) (North B., 2004). Par la désacétylation d'histones et de facteurs de transcription (Figure 7, Cas 3), les sirtuines provoquent un remodelage de la structure chromatinienne et modulent l'activité transcriptionnelle contrôlant ainsi des phénomènes clés comme l'apoptose et le vieillissement cellulaire. De récentes études pointent Sir2 comme un « régulateur universel » de la longévité (Trapp J., 2006).

- **Le NAD comme substrat de Ligases NAD dépendantes**

Cette activité enzymatique n'est retrouvée que chez les bactéries. Chez les eucaryotes, l'activité des ligases est ATP dépendante (Schär P., 1997). Cette activité enzymatique est portée chez *E. coli* ou *Salmonella* par LigA et est impliquée dans la réparation de l'ADN en reformant la liaison pyrophosphate de l'ADN. De façon plus détaillée (Figure 7, Cas 4), la partie AMP du NAD est transférée sur une lysine située dans le site actif de LigA. L'étape suivante est un transfert de l'AMP au niveau de la lésion de l'ADN à réparer, une fois la liaison phosphodiester reformée, l'AMP est libéré et l'ADN est alors réparé (Wilkinson A., 2001).

Nous venons de voir que le NAD est le substrat de quatre types de réactions qui sont illustrées dans la Figure 7. On constate que la consommation du NAD mène dans trois réactions sur quatre à la libération de nicotinamide. Il est important de garder cette information à l'esprit puisque ce nicotinamide libéré peut être recyclé lors de la biosynthèse du NAD, comme nous le verrons plus loin.

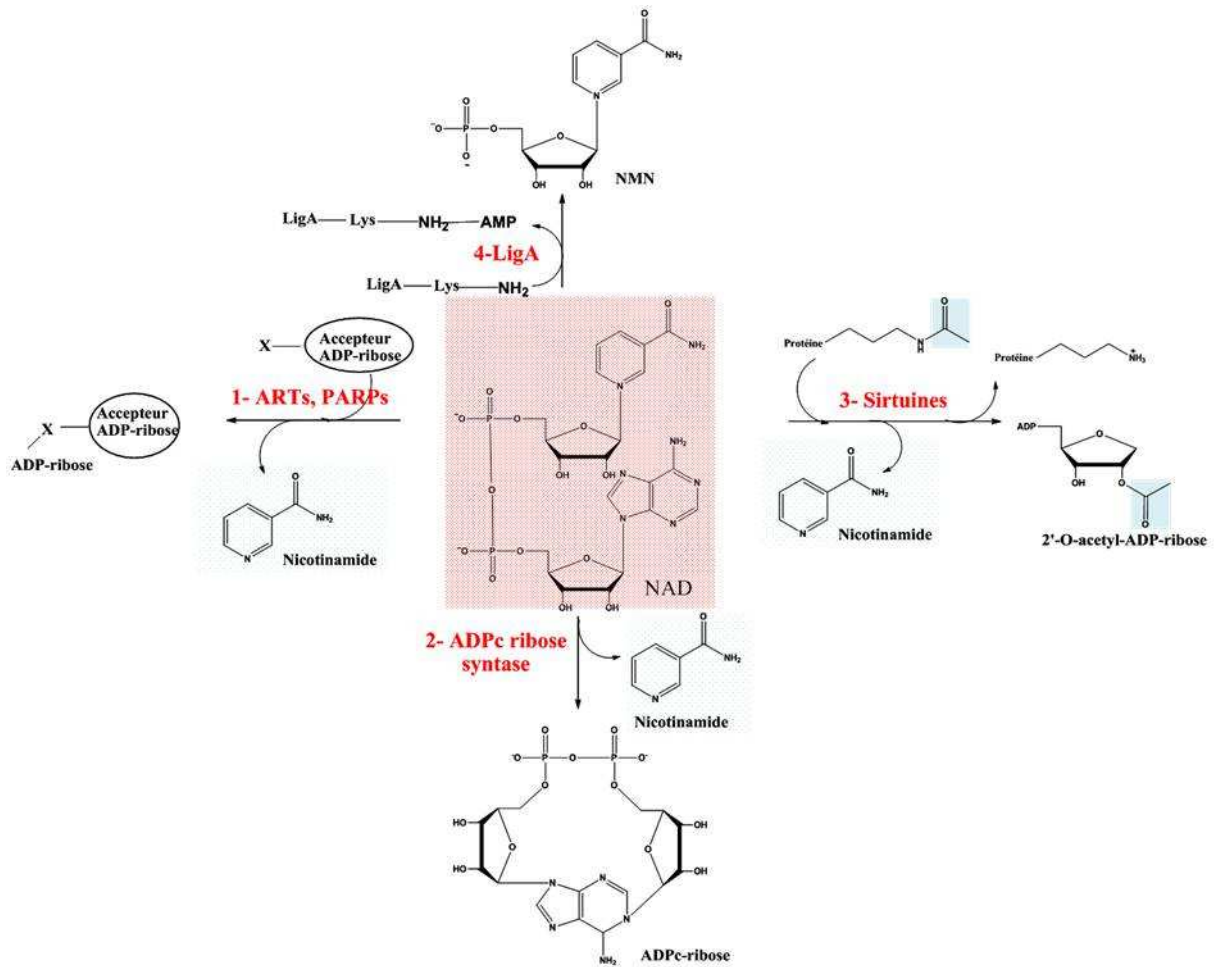


Figure 7 : Résumé des différentes utilisations du NAD comme substrat. Cas 1 : Réaction d'ADP-ribosylation (X est une protéine accepteur d'ADP-ribosyle ; Cas 2 : Formation de l'ADPc-ribose ; Cas 3 : Les sirtuines vont transférer un groupement acétylé porté par une lysine de la protéine sur la partie ADP-ribose du NAD aboutissant à la libération de nicotinamide, à la formation de 2'-O-acétyl-ADP-Ribose et à la génération de protéine désacétylée ; Cas 4 : Substrat des ligases bactériennes (Belenky P., 2006).

I-4 Concentration physiologique du NAD et sa localisation cellulaire chez les eucaryotes

a- Localisation cellulaire

Peu de données sont disponibles sur la localisation du NAD au niveau cellulaire, cependant de récentes études ont montré qu'il existait des réserves de NAD dans certains compartiments cellulaires (Sauve A.A., 2008). La majorité du NAD est vraisemblablement synthétisée dans le noyau et peut diffuser passivement à travers le pore nucléaire pour être redistribué au niveau du cytoplasme. On sait notamment qu'une majorité de NAD se retrouve dans la mitochondrie (Yang H., 2007).

b- Concentration en NAD

Les concentrations de NAD et de NADH dans les différents organes et compartiments cellulaires ne sont pas précisément connues. La concentration en NAD⁺ dans le cytosol et dans des érythrocytes a été estimée à 0.3 mM (Yamada K., 2006) et entre 1 et 2 mM chez la levure (Blinova K., 2008).

Il apparaît donc que la concentration est variable dans les différents compartiments cellulaires mais également en fonction du tissu dans lequel il se trouve. De nombreuses études sont en développement dans ce domaine, en effet étant donné les nombreux rôles du NAD dans le métabolisme cellulaire autres que le métabolisme redox, il est important de pouvoir le quantifier et le localiser précisément.

II- La biosynthèse du NAD

L'intérêt d'étudier la voie de biosynthèse du NAD n'est apparu que très récemment. En effet, longtemps la seule fonction connue du NAD était son rôle redox, qui n'entraînait pas de dégradation de la molécule. Mais depuis la découverte de l'utilisation du NAD comme substrat et donc de la consommation de ce dernier, un effort considérable a été fourni afin d'acquérir une meilleure connaissance sur les enzymes de sa biosynthèse ainsi que de leur régulation (Rodionov D.A., 2008a,b ; Magni G., 1999 ; Foster J.W., 1980).

La biosynthèse du NAD est réalisée selon deux voies métaboliques (Figure 8) :

- **une voie principale *de novo* à partir d'acides aminés.**
- **une voie de secours qui recycle des métabolites comme le nicotinamide ou l'acide nicotinique.**

Ainsi en fonction des organismes et des conditions métaboliques, trois précurseurs du NAD peuvent être utilisés : **l'acide quinolinique (QA), l'acide nicotinique (Na) ou encore le nicotinamide (Nm).**

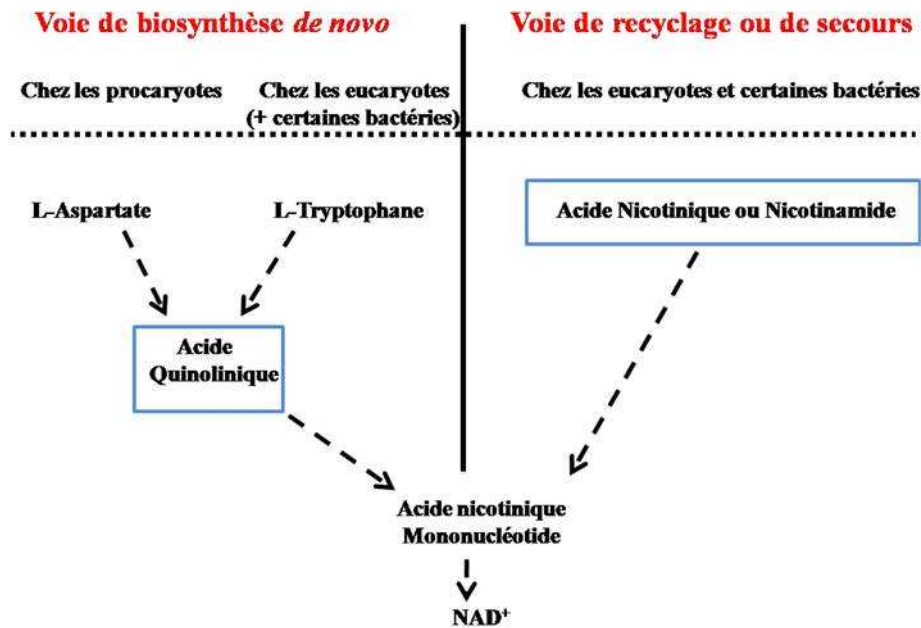


Figure 8 : Vue globale simplifiée des différentes voies de biosynthèse de NAD chez les eucaryotes et les procaryotes.

II-1 Les voies principales ou de novo :

Le précurseur de cette voie *de novo* est l'**acide quinolinique**. Chez les eucaryotes, à l'exception des plantes, il est synthétisé à partir du **L-Tryptophane** alors que chez les procaryotes, il est synthétisé à partir du **L-Aspartate** (Figure 8).

a- La voie principale de novo chez les bactéries.

La biosynthèse du NAD *de novo* pour la plupart des bactéries est réalisée à partir du **L-Aspartate**. La conversion du L-Aspartate en acide quinolinique se passe en deux étapes : premièrement l'oxydation du L-Aspartate en un intermédiaire instable l'iminoaspartate (IA), suivi de la condensation de l'IA avec un intermédiaire de la glycolyse : le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) conduisant à la formation de l'acide pyridine-2,3-dicarboxylique ou acide quinolinique (QA).

La première étape est catalysée par la L-Aspartate oxydase (NadB), la seconde par la quinolinate synthase (NadA) (Figure 9).

- **La L-Aspartate oxydase (NadB) :**

Produit du gène *nadB*, cette enzyme est une flavoprotéine, à Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) liée de façon non covalente à la protéine. Contrairement aux autres aminoxydases, NadB est stéréospécifique et n'utilise que le L-Aspartate comme substrat (Nasu S., 1982a). Durant la réaction d'oxydation du L-Aspartate en Iminoaspartate, NadB est capable d'utiliser soit l'oxygène soit le fumarate comme accepteurs d'électrons selon les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose dans lesquelles se trouve la bactérie (Figure 9) (Nasu S., 1982a).

Chez *T. maritima* ainsi que chez *A. fulgidus*, le gène *nadB* est absent de leur génome. Dans ce cas, la conversion du L-Aspartate en Iminoaspartate est réalisée par la L-Aspartate déshydrogénase qui utilise le NAD ou le NADP comme cofacteur (Sakuraba H., 2008).

- **La quinolinate synthase (NadA)**

La quinolinate synthase, produit du gène *nadA* est une métalloprotéine à centre fer-soufre [Fe-S] (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005). Elle catalyse une réaction complexe puisqu'il s'agit de la condensation entre l'iminoaspartate (IA) et le DiHydroxyAcétone Phosphate (DHAP) pour former un produit cyclique, l'acide quinolinique (QA) (Figure 9). Les différentes caractéristiques structurales et fonctionnelles de NadA seront détaillées dans la seconde partie de mon introduction ainsi que dans la partie « Résultats », puisqu'elles constituent le cœur de mon travail de thèse.

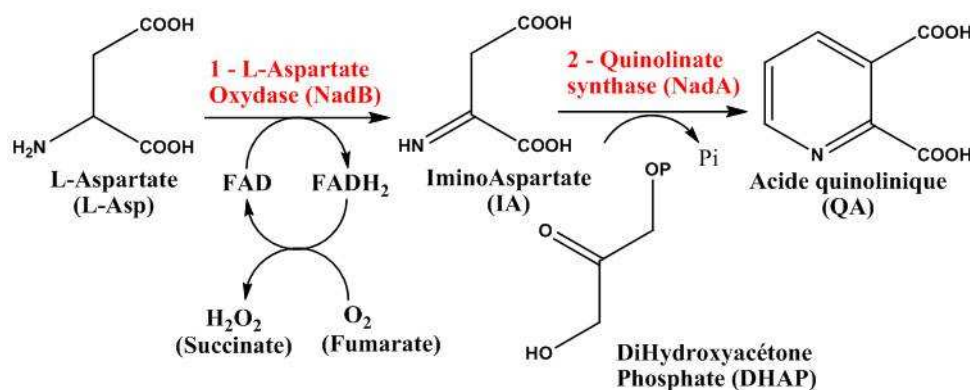


Figure 9 : Formation de l'acide quinolinique à partir du L-Aspartate chez les procaryotes.

b- La voie principale de novo chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes mais également chez quelques exceptions bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia fungorum*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Thermobifida fusca*, *Ralstonia metallidurans*...) (Kurnasov O., 2003a, b), la synthèse d'acide quinolinique est réalisée via une voie aérobie à partir du **L-Tryptophane**. Cette voie nommée **voie des kynurénines** est constituée de 5 étapes enzymatiques suivies d'une cyclisation spontanée conduisant à la formation d'acide quinolinique (Figure 10).

- **La Tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) ou l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO)**

Deux types d'enzymes contenant un hème sont capables de catalyser cette première étape consistant à l'oxydation du L-Tryptophane (L-Trp) en N-formylkynurénine. La première enzyme est la Tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) (Kotake Y., 1936), la seconde enzyme est l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Higuchi K., 1967). La principale différence entre ces deux enzymes est leur spécificité de substrat. La TDO utilise spécifiquement le L-Trp alors que l'IDO est capable d'oxyder des analogues du tryptophane (D-Trp, tryptamine, sérotonine...). Les détails du mécanisme ont été apportés récemment par la résolution des structures tridimensionnelles de chacune des enzymes (Forouhar F., 2007).

- **La kynurénine formamidase (KFA)**

La seconde enzyme est la kynurénine formamidase (KFA) qui va déformyler la N-formylkynurénine en L-kynurénine. Peu d'informations biochimiques et structurales sont disponibles sur cette enzyme. Ce manque de données est lié au fait que le gène codant pour l'enzyme est resté très longtemps inconnu, mais également au fait que la formylkynurénine possède la capacité de s'hydrolyser spontanément en L-kynurénine conduisant de nombreux chercheurs à penser que cette étape était catalysée de façon non enzymatique. L'enzyme a récemment été purifiée et caractérisée et des mesures d'activité réalisées (Wogulis M., 2008). Cette enzyme qui ne contient pas de cofacteur n'a pas encore été cristallisée mais on peut noter qu'elle possède des homologies de séquence avec des estérases ainsi que des lipases.

- **La kynurénine 3-monooxygénase (KMO)**

La L-kynurénine est oxydée en 3-hydroxykynurénine par la kynurénine 3-monooxygénase (KMO). Cette monooxygénase contient un FAD lié de façon non covalente et utilise le NADPH pour la régénération de son cofacteur. La présence de cette enzyme chez un organisme n'est pas toujours associée à la synthèse d'acide quinolinique. En effet, chez les insectes, la 3-hydroxykynurénine est converti en acide xanthurénique (Han Q., 2007) et chez *Pseudomonas* c'est un intermédiaire dans la synthèse des sidérophores de type quinolobactine (Matthijs S., 2004).

- **La kynuréninase (KYN)**

La 3-hydroxykynurénine est hydrolysée par une kynuréninase (KYN) en acide 3-hydroxyanthranilique, avec la libération de L-alanine. La kynuréninase est l'enzyme la plus étudiée de la superfamille des aspartate aminotransférases, enzymes qui sont PLP-dépendantes, ou le PLP est lié de façon covalente à la protéine au niveau d'un résidu lysine (Koushik S.V., 1998).

- **La 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (HAD)**

L'acide 3-hydroxyanthranilique est ensuite oxydé en acide 2-amino-3-carboxymuconique semi aldéhyde par la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (HAD), une extradiol-dioxygénase à fer. Chacune des deux sous unités de l'enzyme contient deux sites de fixation du fer : l'un des atomes de fer est catalytique et est lié à la protéine par deux résidus histidines et un résidu glutamate, l'autre atome de fer est quant à lui coordonné par quatre cystéines formant un centre [FeS₄] de type rubrédoxine dont la fonction est inconnue (Solomon E.I., 2000).

- **Dernière étape non enzymatique**

La dernière étape est une cyclisation spontanée du α -amino- β -carboxymuconique semialdéhyde en acide quinolinique (Colabroy K.L., 2005).

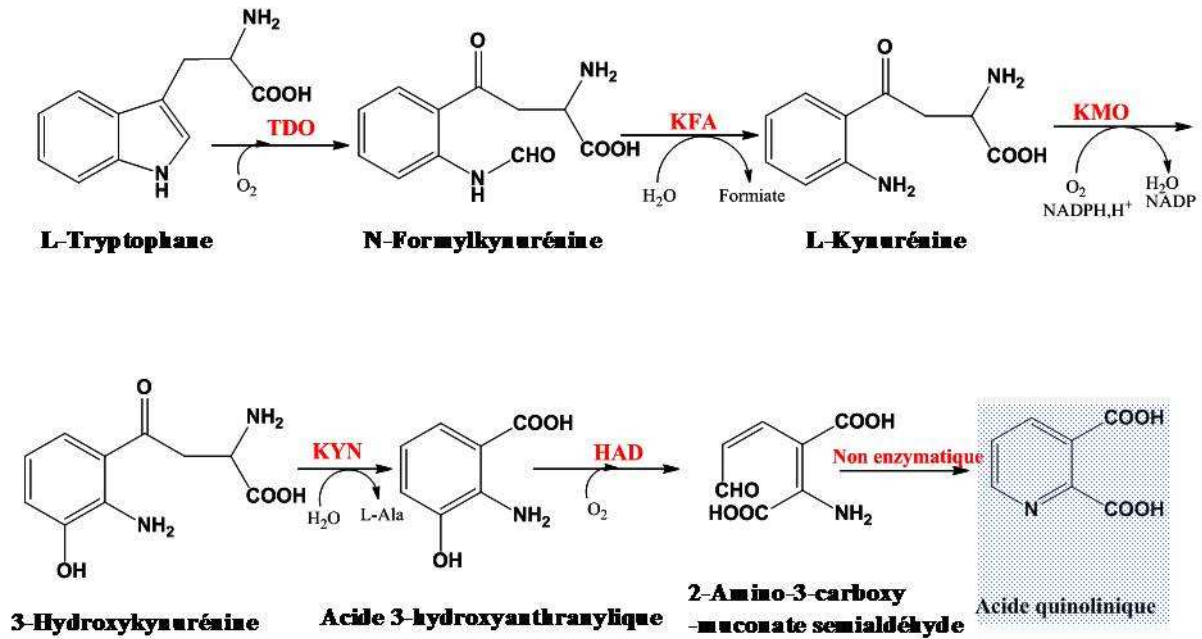


Figure 10 : Formation de l'acide quinolinique chez les eucaryotes et certaines bactéries à partir du L-Tryptophane. TDO = Tryptophane 2,3-dioxygénase, KFA = Kynurénine formamidase, KMO = kynurénine 3-monooxygénase, KYN = kynuréninase, HAD = 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase.

c- De l'acide quinolinique au NAD

- **La quinolinate phosphoribosyltransférase (NadC)**

Qu'il soit formé à partir du L-Aspartate ou du L-Tryptophane, l'acide quinolinique va ensuite être pris en charge par l'acide quinolinique phosphoribosyltransférase (NadC) pour conduire à la formation de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) ; en d'autres termes, cette enzyme est commune à la voie de biosynthèse *de novo* des eucaryotes (Foster A., 1985) et des procaryotes (Bhatia R., 1996). Plus précisément, NadC effectue le couplage spécifiquement de la partie phosphoribosyle du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) avec l'acide quinolinique (Figure 11). Elle fonctionne selon un mécanisme séquentiel ordonné avec tout d'abord la liaison du QA suivie de celle du PRPP. Le départ du groupement PPI du PRPP est activé par la coordination d'ions Mg^{2+} menant à la formation d'un intermédiaire oxocarbénium qui réagit avec l'acide quinolinique menant à la formation d'un quinolinate mononucléotide instable (Figure 11) qui subit une rapide décarboxylation donnant l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) (Liu H., 2007).

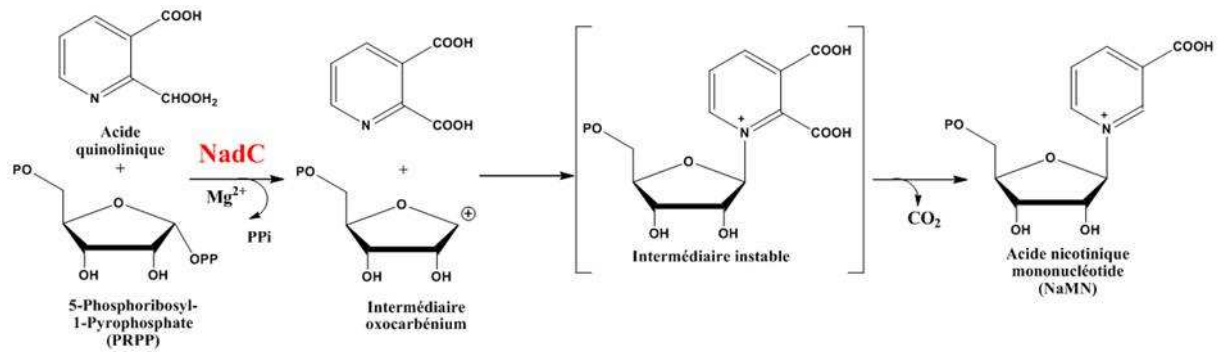


Figure 11 : Réaction catalysée par l'acide quinolinique phosphoribosyltransférase (NadC) aboutissant à la formation de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN).

- **Du NaMN au NAD**

L'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) formé est ensuite pris en charge par différentes enzymes pour conduire à la formation du NAD. **Ces enzymes sont communes avec la voie de secours ou de recyclage.**

- *L'acide nicotinique adényltransférase (NadD)*

L'acide nicotinique mononucléotide adényltransférase (NadD) catalyse l'adénylation de l'acide nicotinique mononucléotide pour former l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) (Figure 12). Cette réaction nécessite l'énergie de l'ATP et consiste en une attaque nucléophile du groupement phosphorylé en 5' du NaMN sur le phosphate en α de l'ATP facilitée par la liaison d'ions Mg^{2+} . Chez *E. coli*, il a été montré que l'enzyme était capable d'utiliser à la fois le NaMN et le Nicotinamide mononucléotide (NMN) comme substrat, avec une importante préférence pour le NaMN (> à 1000 fois basé sur une comparaison des valeurs k_{cat}/K_m pour chacun des substrats) (Magni G., 2004). Moyennant donc quelques exceptions, cette affinité à transformer préférentiellement le NaMN est retrouvée dans tout le règne bactérien. Le gène *nadD* a été identifié comme essentiel chez quelques modèles bactériens (par exemple *M. tuberculosis*) et il est considéré comme étant une cible intéressante pour le développement de nouveaux agents anti-infectieux.

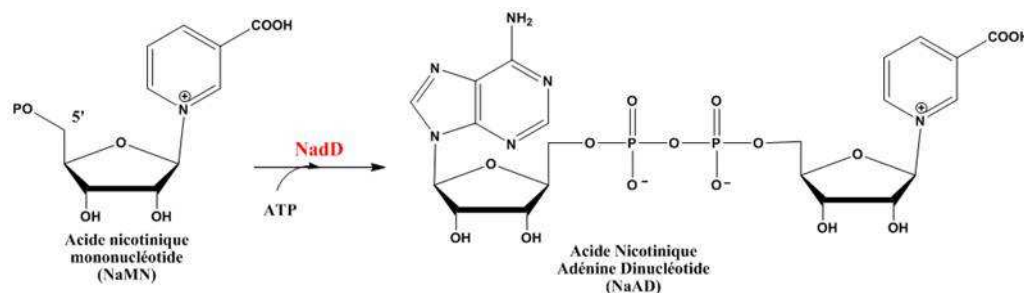


Figure 12 : Réaction catalysée par l'acide nicotinique mononucléotide adényltransférase (NadD) aboutissant à la formation de l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD).

- La NAD synthétase (NadE)

La NAD synthétase (NadE) convertit l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) en Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) en transformant la fonction acide de la partie acide nicotinique du NaAD en fonction amide (Figure 13). Le Mg^{2+} est essentiel dans cette activité puisqu'il va activer le groupement phosphate de l'ATP, stabiliser le groupement partant PPi mais également faciliter l'attaque de l'ammoniac (NH_3) (Ozment C., 1999).

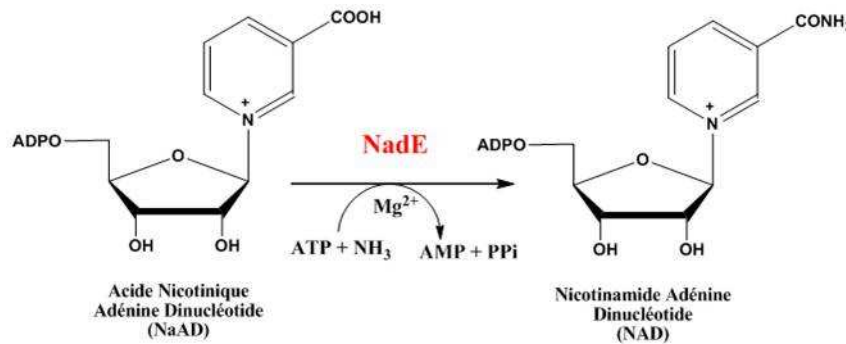


Figure 13 : Réaction d'amidification de l'acide nicotinique adénine dinucléotide par la NAD synthétase (NadE) pour former le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

- La NAD kinase (NadF) : Formation du NADP

L'unique façon de synthétiser le cofacteur NADP à partir du NAD passe par la phosphorylation de ce dernier grâce à la NAD kinase (NadF) en utilisant l'ATP (Figure 14). Chez *Salmonella*, il a été montré une régulation allostérique de l'enzyme permettant de moduler l'équilibre des pools cellulaires en NAD et en NADP en fonction des besoins cellulaires (par exemple en conditions de stress) (Cheng W., 1994 ; Zerez C.R., 1987).

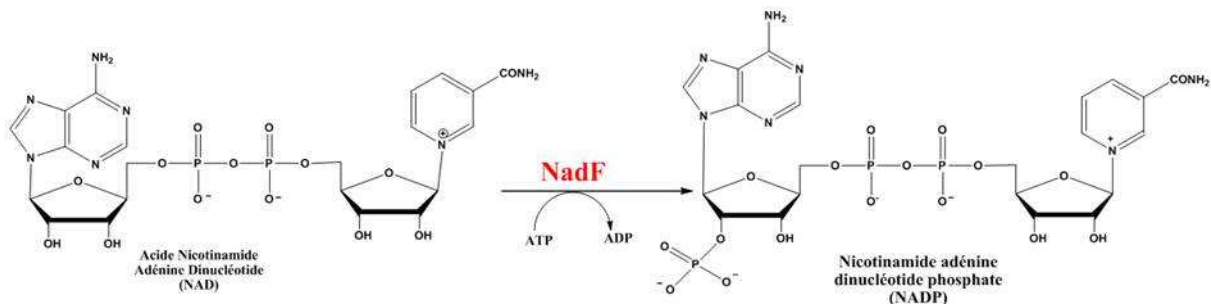


Figure 14 : Réaction de phosphorylation du NAD menant à la formation du NADP par NadF.

Sur le schéma ci-dessous sont résumés les différents intermédiaires formés ainsi que les différentes enzymes utilisées lors de la biosynthèse *de novo* du NAD. Les enzymes notées en bleu et en fuschia sont les enzymes menant à la formation d'acide quinolinique par la voie

principale de biosynthèse du NAD. Les enzymes indiquées en noir et vert sont les enzymes nécessaires à la conversion de l'acide quinolinique en NAD ; celles décrites en vert sont communes avec la voie de secours décrite paragraphe II-2.

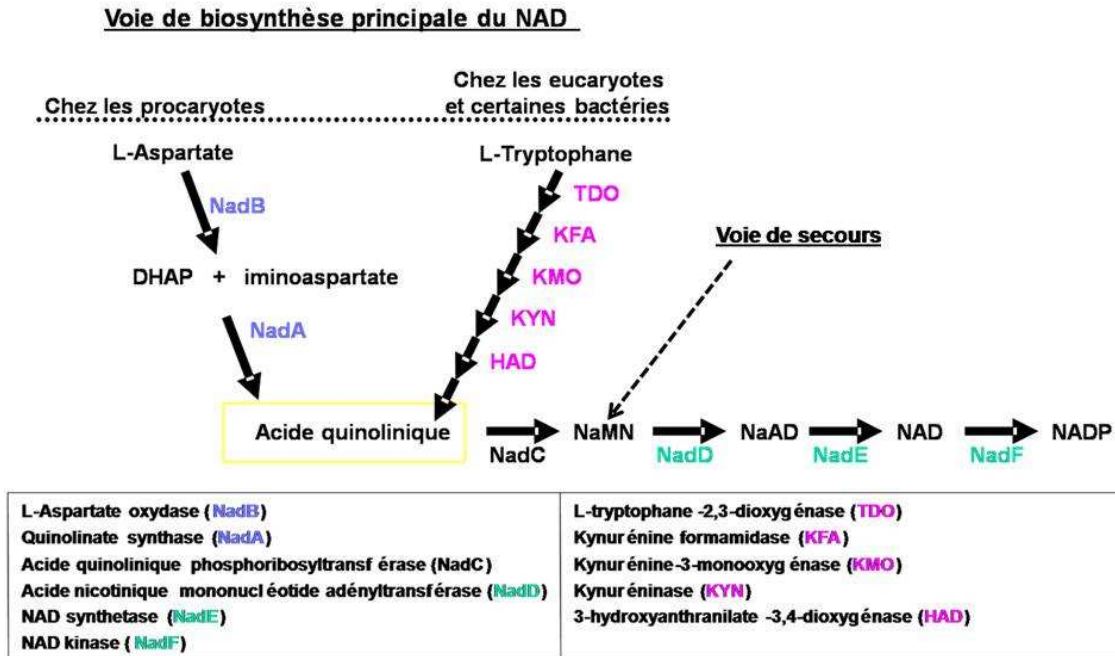


Figure 15 : Résumé des différentes étapes de la voie principale de formation du NAD chez les eucaryotes et les procaryotes passant par un intermédiaire central : l'acide quinolinique.

d- Aspects structuraux de la voie de biosynthèse de novo chez la bactérie

M. Rizzi est un des cristallographes qui a résolu la structure tridimensionnelle de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse du NAD. En 2002, il propose une analyse structurale des enzymes de la biosynthèse du NAD (voie principale) chez la bactérie (Rizzi M., 2002). Toutes les enzymes possèdent une structure cristallographique à l'exception de la quinolinate synthase (Figure 16).

Il note que les quatre enzymes (NadB, NadC, NadD, NadE) n'ont aucun repliement caractéristique en commun. Cette observation n'est pas très surprenante étant donné la diversité des réactions qu'elles catalysent. Cependant, le point commun retrouvé chez ces différentes enzymes est un haut degré de flexibilité conformationnelle. Le cas le plus frappant est celui de la L-Aspartate oxydase (NadB) qui lors de la liaison de son cofacteur FAD subit un fort changement conformationnel. Cette propriété de grande flexibilité conformationnelle peut s'expliquer par la nécessité de « protéger » le produit instable de la réaction qu'elle catalyse qui est l'iminoaspartate.

II-2 Les Voies de secours ou de recyclage

En plus de la voie principale « *de novo* », la plupart des organismes possèdent **une voie de recyclage** capable de synthétiser du NAD à partir de la **vitamine B3** provenant de l'alimentation ou des métabolites issus de la dégradation du NAD ou encore de certains autres nucléotides présents dans la cellule. La vitamine B3 est une vitamine hydrosoluble qui correspond à deux molécules : l'acide nicotinique (Na) et son amide (le nicotinamide ou Nm). Elle est également connue sous le nom de vitamine PP pour « Pellagra Preventive » car une carence en cette vitamine est responsable de la pellagre dont les symptômes sont des dermatites, des diarrhées et la démence (Elvehjem C.A., 1974).

a- Chez les procaryotes, les eucaryotes et les plantes (à l'exception des mammifères)

• **Voie de secours utilisant des pyridines (Nm et Na)**

Dans certaines conditions métaboliques de déficience en NAD (voie *de novo* non fonctionnelle par exemple), les différents organismes doivent absolument recharger le pool de NAD et cela est réalisé par l'utilisation de nicotinamide provenant de la dégradation du NAD comme je l'ai déjà mentionné Figure 7. Il a également été mis en évidence chez *E. coli* (Rowe J.J., 1985) ainsi que *Salmonella* une utilisation du nicotinamide et d'acide nicotinique provenant du milieu extérieur (donc de l'organisme hôte de la bactérie), même si le(s) transporteur(s) correspondant responsable(s) de cet(ces) import(s) reste(nt) inconnu(s) à ce jour. Une simple diffusion passive du Na et du Nm reste possible (Figure 17) (Rodionov D.A., 2008).

- La nicotinamidase (PncA)

Le nicotinamide est converti en acide nicotinique par la **nicotinamidase (PncA)** (Figure 17) (Frothingham R., 1996). Cette étape d'hydrolyse du nicotinamide est une étape obligatoire chez la plupart des bactéries, puisqu'elles sont incapables d'utiliser le Nm directement. La résolution de la structure de PncA (chez *Pyrococcus horikoshii*) a apporté des informations importantes pour la compréhension de son mécanisme réactionnel : la présence d'une triade catalytique (Cys-Lys-Asp) retrouvée chez d'autres amidases a été mise en évidence. L'interaction d'un ion Zn^{2+} avec cette triade serait à l'origine du transfert d'un proton et de l'activation du thiolate de la cystéine du site actif pour l'attaque nucléophile sur la liaison amide du nicotinamide entraînant la libération d'ammoniac et la formation de l'acide nicotinique. Le Zn^{2+} agirait comme un acide de Lewis (Du X., 2001).

- L'acide nicotinique phosphoribosyltransférase (PncB)

Chez de nombreuses bactéries le gène *pncB* se situe dans le même opéron / régulon que *pncA* (Osterman A.L., 2007). **L'acide nicotinique phosphoribosyltransférase (PncB)** codée par ce gène transfère l'acide nicotinique sur le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) pour former l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN). La réaction chimique catalysée par cette enzyme est très semblable à la réaction catalysée par NadC (excepté l'étape de décarboxylation). La caractéristique remarquable et propre à PncA est son habilité à augmenter l'efficacité de la catalyse en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Ceci permet de déplacer l'équilibre de cette réaction réversible presque entièrement vers la formation du produit NaMN (Gross J., 1996).

- Conversion du NaMN en NAD (NadD et NadE)

De façon similaire à ce que l'on trouve dans la voie de biosynthèse principale *de novo*, l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) est pris en charge par **la nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NadD)** puis **la NAD synthétase (ou NadE)** pour former du NAD.

• Voie de secours utilisant des pyridines nucléosides (RNm)

L'existence d'une voie de secours impliquant l'absorption et l'utilisation de nicotinamide ribonucléoside (RNm) exogène a été mise en évidence chez des mutants de *Salmonella* déficients dans les voies de biosynthèse du NAD : voie *de novo* et voie de secours à partir du nicotinamide. Cette nouvelle voie de secours implique les gènes *pnuC* et *nadR* (Figure 17).

- L'entrée des pyridines nucléosides : il existe une voie de secours des pyridines exogènes. En effet, le nicotinamide ribonucléoside (RNm) peut entrer dans la cellule par l'intermédiaire d'un **transporteur de nicotinamide ribonucléoside (PnuC)**. Ce nicotinamide ribonucléoside est produit à l'extérieur de la cellule vraisemblablement à partir du NAD, via le NMN généré par une enzyme non identifiée à ce jour. Le NMN formé va être transformé sous l'action d'une **phosphatase (AphA)** en nicotinamide ribonucléoside (RNm). Ce dernier va alors pouvoir entrer dans la cellule via PnuC et rejoindre la voie de secours des pyridines nucléosides (Figure 17) (Merdanovic M., 2005). Des études de génomique ont permis de montrer que la protéine impliquée dans cette voie de secours des pyridines nucléosides, et

capable de convertir du RNm en NAD, est la protéine **NadR**. Elle est constituée de trois domaines : le domaine NadR_R dont le rôle dans la régulation sera développé dans le paragraphe II-3 suivant, un domaine NadR_K possédant une activité ribosylnicotinamide kinase ainsi qu'un domaine NadR_A ayant une activité NMN adényltransférase.

- Domaine Ribosylnicotinamide kinase (NadR_K)

L'activité ribosylnicotinamide kinase portée par le domaine NadR_K consiste en la phosphorylation du nicotinamide ribonucléoside pour donner du nicotinamide mononucléotide (NMN) (Figure 17). La découverte de cette activité étant très récente, le mécanisme réactionnel n'a pas encore été élucidé. NadR_K possède une grande spécificité de substrat, puisqu'en effet elle n'est capable d'utiliser que du nicotinamide ribonucléoside (et pas de l'acide nicotinique ribonucléoside) (Grose J.H., 2005).

- Domaine Nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NadR_A)

Ce domaine de NadR, capable de former du NAD à partir de nicotinamide mononucléotide (NMN) en présence d'ATP possède un repliement caractéristique de type Rossmann. L'analyse des interactions du NAD dans ce site actif a permis d'observer une interaction clé avec la partie nicotinamide appuyant l'observation d'une stricte préférence pour la transformation du NMN par rapport à l'analogue NaMN, à la différence de ce qui peut être observé pour l'enzyme NadD (Grose J.H., 2005 ; Kurnasov O.V., 2002 ; Raffaelli N., 1999).

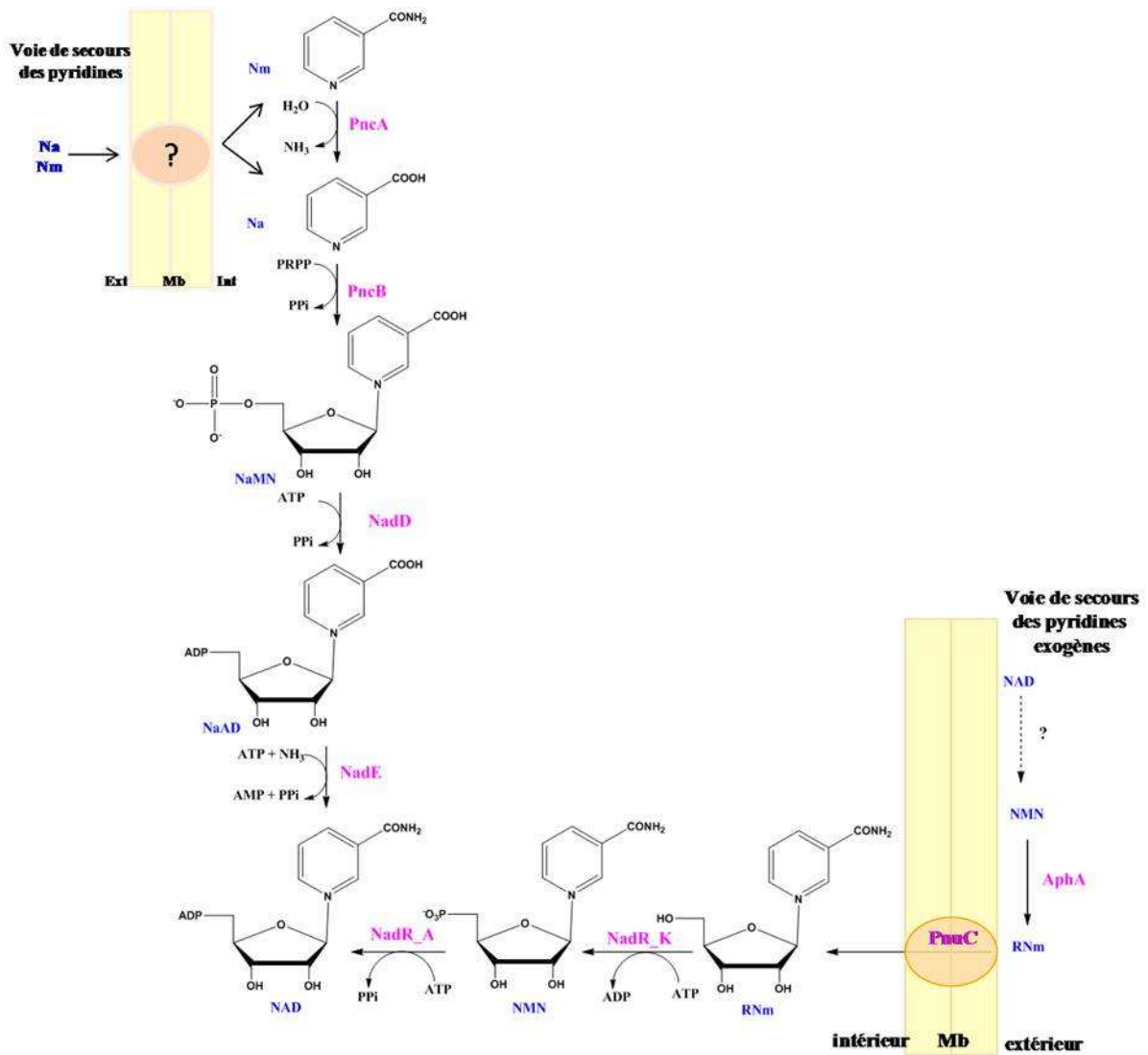


Figure 17 : Schéma des différentes étapes de la voie de secours ou de recyclage chez les procaryotes, les plantes et les eucaryotes à l'exception des mammifères à partir du nicotinamide disponible dans la cellule mais également à partir des pyridines et de pyridines nucléosides exogènes.

b- Chez les mammifères.

- **Voie de secours utilisant des pyridines (Nm et Na)**

La particularité de la voie de secours chez les mammifères est l'absence d'une activité nicotinamidase (**PncA**) permettant la désamination du nicotinamide en acide nicotinique (Figure 18).

- La nicotinamide phosphoribosyltransférase (NadV)

Une activité enzymatique unique chez les mammifères et certaines bactéries (*Haemophilus ducreyi*) ainsi que chez les bactériophages permet le couplage du nicotinamide avec du PRPP par une **nicotinamide phosphoribosyltransférase (NadV)** pour former

directement le nicotinamide mononucléotide (NMN) (Gerdes S.Y., 2006 ; Miller E.S., 2003). Cette enzyme a aussi la capacité de catalyser le couplage de l'acide nicotinique avec le PRPP formant de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) suivant le substrat disponible dans la bactérie (Figure 18). Cette enzyme qui est l'équivalent de PncB chez les procaryotes a donc deux substrats possibles : le Na ou le Nm.

- La nicotinamide adényltransférase (Nmnat-1, Nmnat-2, Nmnat-3)

Cette enzyme présente chez tous les mammifères, est retrouvée chez l'homme sous la forme de trois isoformes : Nmnat-1 est nucléaire, Nmnat-2 se trouve dans l'appareil de Golgi, Nmnat-3 est mitochondriale. Cette enzyme ne possède pas de spécificité de substrat, elle est capable d'utiliser à la fois l'acide nicotinique mononucléotide et le nicotinamide mononucléotide menant à la formation de l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) dans le cas de l'utilisation d'acide nicotinique mononucléotide et à la formation de NAD lors de la transformation de nicotinamide mononucléotide (NMN). Il est intéressant de noter que cette enzyme est l'équivalent de NadD et NadR_K chez les procaryotes et qu'une fois de plus, l'enzyme de mammifères est capable d'utiliser deux substrats (Figure 18). Lorsque la nicotinamide adényltransférase (Nmnat) utilise l'acide nicotinique mononucléotide, l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) formé est transformé en NAD via l'action de la **NAD synthétase (NadE)** (Raffaelli N., 2002).

- **La voie de secours utilisant des pyridines nucléosides** existe également chez les mammifères. Chez l'homme, deux isoformes de la nicotinamide kinase (NrK1 et NrK2) ont été clonés mais peu d'informations biochimiques ou mécanistiques sont à ce jour disponibles (Tempel W., 2007). Le nicotinamide ribonucléoside (RNm) est pris en charge par la nicotinamide ribosylkinase (NrK) qui forme du NMN. Le NMN formé est ensuite transformé en NAD par les nicotinamide adényltransférases (Nmnat-1, Nmnat-2, Nmnat-3) (Figure 18).

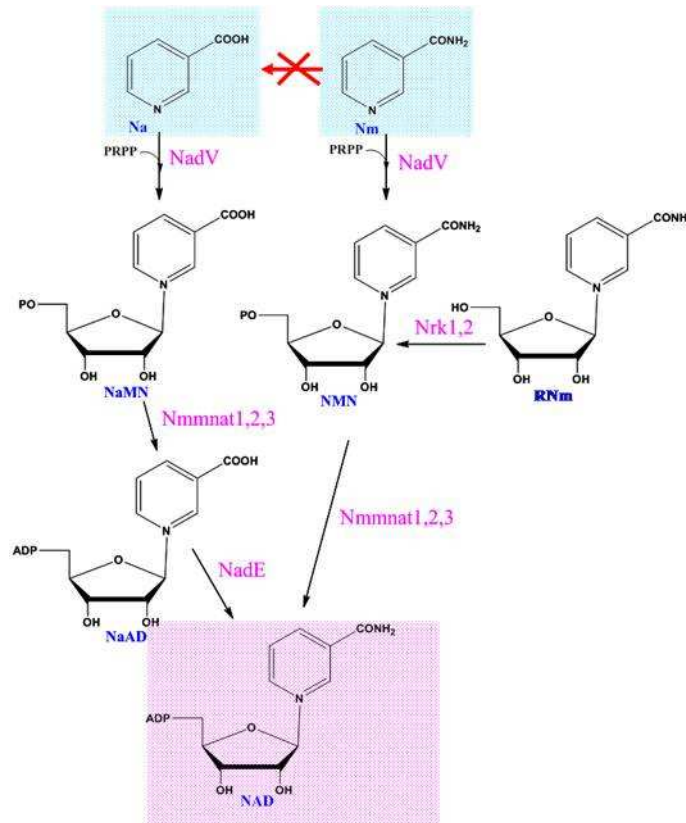


Figure 18 : Schéma des différentes étapes de la voie de secours ou de recyclage chez les mammifères à partir du nicotinamide et de l'acide nicotinique présents dans la cellule. La conversion Nm→Na n'existe pas.

II-3 La régulation de la biosynthèse du NAD

a- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NadR

C'est chez *Salmonella typhimurium* que l'étude de la régulation du métabolisme du NAD a été la plus largement rapportée (Foster J.W., 1990 ; Foster J.W., 1993). C'est donc cet organisme que je vais prendre comme exemple même si ce système de régulation se retrouve aussi chez la plupart des entérobactéries comme *E. coli*, les *Salmonella*, les *Yersinia*, les *Shigella* et les *Erwinia*.

La biosynthèse du NAD est contrôlée au niveau transcriptionnel par une protéine trifonctionnelle : **NadR**. Cette protéine NadR est constituée de trois domaines comme je l'ai déjà mentionné (Figure 19A) :

- un domaine N-terminal présentant un motif caractéristique HTH (Helix Turn Helix) qui constitue le domaine de liaison à l'ADN et qui confère l'activité régulatrice à la protéine.
- un domaine central nommé domaine « NMN adényltransférase » possédant un domaine de liaison avec le NAD (=NadR_A).

- un domaine C-terminal (=NadR_K) qui possède une activité ribosylnicotinamide kinase.

La régulation transcriptionnelle portée par le domaine N-terminal se déroule de la façon suivante (Figure 19B) : le NAD présent dans la cellule se lie à la protéine NadR au niveau de son domaine NadR_A, cette interaction provoque la dimérisation de la protéine qui se lie sur l'ADN par son domaine N-terminal au niveau d'un site spécifique situé en amont du promoteur des gènes *nadA*, *nadB*, *pnuC*, *pncB* et *nadR* réprimant ainsi la transcription de ces gènes ainsi que sa propre transcription. En absence de NAD, c'est l'ATP qui se lie à la protéine NadR au niveau du même site de liaison du NAD qui reste alors sous forme monomérique et est ainsi incapable d'interagir avec l'ADN. Il y a alors dérégulation et les gènes *nadA*, *nadB*, *pnuC*, *pncB* et *NadR* sont transcrits afin d'assurer la biosynthèse du NAD (Penfound T., 1999).

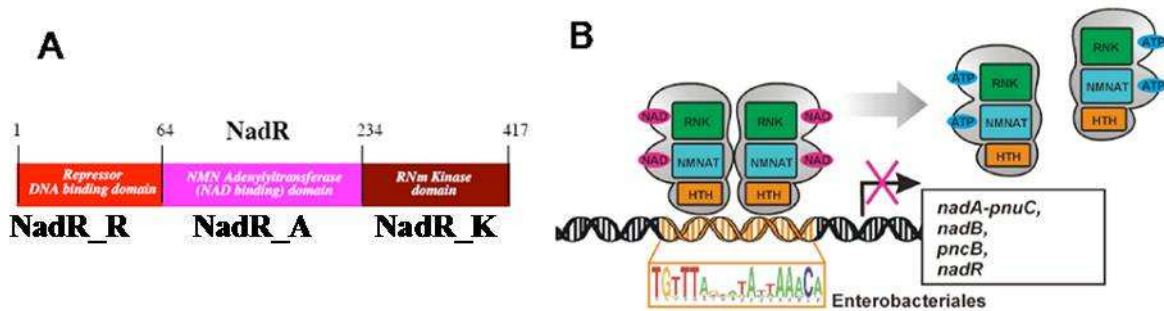


Figure 19 : (A) Représentation des différents domaines de la protéine NadR. (B) Illustration de la régulation de la biosynthèse du NAD par la protéine NadR. La séquence palindromique entourée en jaune correspond au site de liaison de la protéine sur l'ADN lors de la répression des gènes *nadA-pnuC*, *nadB*, *pncB* et *nadR* chez les Entérobactéries (*E.coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Erwinia*).

b- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NiaR

Un second système de régulation a été découvert chez *Bacillus subtilis* (Rossolillo P., 2005). A sa découverte ce régulateur a été nommé YrxA, aujourd'hui il porte le nom NiaR pour Niacin Repressor. Il est retrouvé de façon générale chez les bactéries du type Firmicutes (*Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*), ainsi que chez les Thermotogales (*Thermotoga maritima*). La protéine NiaR est un répresseur transcriptionnel qui se fixe sur l'ADN par son motif HTH. A la différence de NadR, c'est la liaison de l'acide nicotinique (Na) et non du NAD à la protéine qui entraîne la dimérisation et la liaison à l'ADN avec la répression de la transcription des gènes *nadA*, *nadB* et *nadC*, *pncA*, *pncB*, *niaP* (identifié comme un transporteur d'acide nicotinique et de nicotinamide chez ces bactéries) et *pnuC* (Figure 20). En absence d'acide nicotinique, la protéine NiaR est présente sous forme monomérique,

incapable d'interagir avec l'ADN, il y a alors dérégulation des différents gènes cités ci-dessus (Rodionov D.A., 2008b).

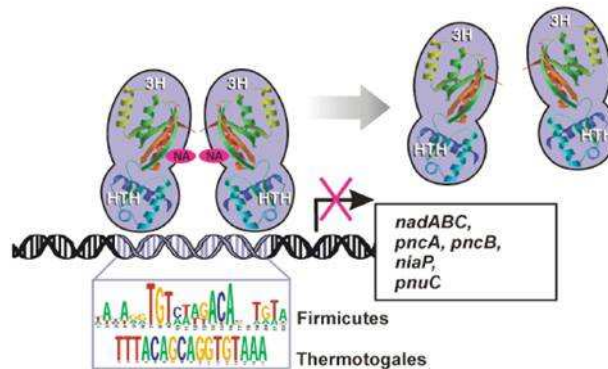


Figure 20 : Régulation de la biosynthèse du NAD par la protéine NiaR. La séquence palindromique entourée en bleu correspond au site de liaison de la protéine sur l'ADN lors de la répression des gènes *nadABC*, *pncA*, *pncB*, *niaP*, ainsi que *pnuC* chez les Firmicutes (*Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*), et les Thermotogales (*Thermotoga maritima*).

c- Régulation du métabolisme du NAD par le régulateur NrtR

Une récente étude de génomique comparative a mis en évidence une dernière famille de régulateurs transcriptionnels nommée NrtR pour *Nudix-related transcriptional Regulators* (Rodionov D., 2008). Parmi les bactéries possédant ce système de régulation, on retrouve des bactéries du type *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Shewanella* et *Pseudomonas*. La protéine NrtR possède en N-terminal un domaine « Nudix-like » (Nudix pour Nucléoside diphosphate relié à une partie x, un motif retrouvé chez une famille d'enzymes catalysant l'hydrolyse de divers dérivés dinucléosides diphosphates) (Dobrzanska M., 2002) et en C-terminal un domaine de liaison à l'ADN (motif HTH). Des études *in vitro* montrent que la protéine sous forme dimérique se fixe à l'ADN. A la différence des deux familles de régulateurs précédentes, c'est en présence d'ADP-ribose qu'elle devient monomérique et par conséquent se détache de l'ADN permettant la transcription des gènes de la biosynthèse du NAD (Figure 21). L'hypothèse proposée pour la régulation par l'ADP-ribose est la suivante : l'ADP-ribose est un produit de dégradation du NAD et par conséquent sa présence est un signal pour la cellule de la nécessité de re-synthétiser du NAD, d'où l'activation de la transcription (par dérégulation) des gènes *nadABC*, *nadD*, *nadE*, *pncA*, *pncB*, *niaP*, *pnuC*, *nadR*, *nadM* (un homologue de NadD chez *M. jannaschii* et *A. pernix*), *nadV* et *prs* (protéine liée à la synthèse du PRPP).

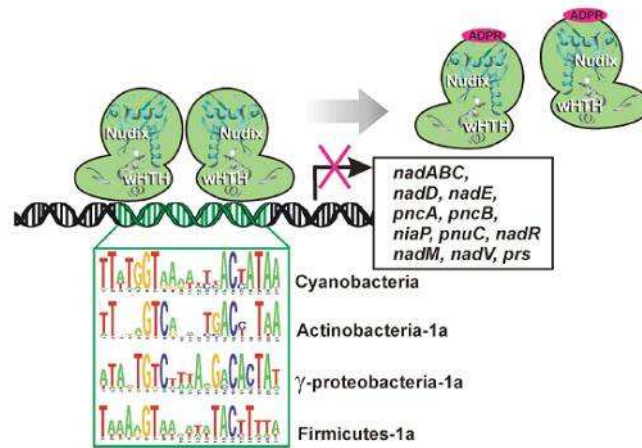


Figure 21 : Régulation de la biosynthèse du NAD par la protéine NtrR. La séquence palindromique entourée en vert correspond au site de liaison de la protéine sur l'ADN lors de la répression des gènes *nadABC*, *nadD*, *nadE*, *pncA*, *pncB*, *pnuC*, *nadR*, *nadM*, *nadV*, *prs* chez les cyanobactéries, les actinobactéries-1a, les γ -proteobactéries et les Firmicutes 1-a.

Les différents systèmes de régulation chez différents organismes		Exemple de l'organisation génomique du régulon chez différents organismes types
NadR	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia spp.</i> , <i>Erwinia spp.</i> , <i>Photobacterium</i> .	<u>Chez <i>E. coli</i> et <i>Salmonella spp.</i></u>
NiaR	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Geobacillus kaustophilus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Thermotoga maritima</i>	<u>Chez <i>Thermotoga maritima</i></u>
NtrR	<i>Synechocystis sp.</i> , <i>Vibrio spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Shewanella spp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	<u>Chez <i>Mycobacterium spp.</i></u>

Tableau 1 : Les différents systèmes de régulation de la biosynthèse du NAD chez différents organismes ainsi qu'un exemple d'organisation de l'opéron/régulon pour chaque système. Le gène *yceI* correspond à *niaP* chez *E. coli* (un transporteur de Na et Nm).

II-4 La voie de biosynthèse du NAD comme un modèle de l'évolution.

La caractéristique principale de cette voie de biosynthèse du NAD vient du fait qu'elle n'est pas formée d'une voie unique conservée chez tous les organismes. La logique et l'enchaînement des réactions sont en général conservés mais en fonction des organismes, la biosynthèse débute par différents précurseurs (L-Asp, L-Trp) et utilise des voies diverses pour le recyclage des produits de dégradation du NAD (Na, Nm et RNm). Au cours de l'évolution, les enzymes de la biosynthèse du NAD ont acquis des spécificités selon les organismes. Le point important qui ressort d'études de génomique comparatives est l'inattendue complexité de ces enzymes. On peut notamment noter le changement de spécificité de substrat des phosphoribosyltransférases (PncB et NadV). PncB chez *E. coli* reconnaît uniquement l'acide nicotinique alors que chez les mammifères NadV est capable d'utiliser l'acide nicotinique et le nicotinamide. Ces différentes caractéristiques peuvent faire des enzymes de la biosynthèse du NAD un système idéal pour étudier la transformation des enzymes au cours de l'évolution (Mattevi A., 2006).

III- Le NAD comme une cible pharmacologique

Les enzymes qui synthétisent le NAD et celles qui l'utilisent sont des cibles potentielles pour le traitement d'une grande diversité de maladies. Elles sont également au centre de nombreux projets de recherche visant à la mise au point de nouveaux traitements.

La conception et le développement de médicaments ciblent le NAD de trois façons :

- Comme la **cible d'un radical dérivé de l'isoniazide**
- En concevant des **inhibiteurs ou des activateurs d'enzymes utilisant le NAD**
- En essayant **d'inhiber directement la biosynthèse du NAD**

III-1 Le NAD comme cible de l'isoniazide

Le NAD est une cible directe du médicament isoniazide utilisé dans le traitement de la tuberculose. L'isoniazide est une prodrogue qui dès qu'elle pénètre dans la bactérie est oxydée par une catalase peroxydase (KatG) sous la forme d'une espèce radicalaire dite espèce

activée (radical isonicotinolye). Cette dernière réagit avec le NAD pour produire un adduit radicalaire (isonicotinic acyl-NADH) qui inhibe l'énoyl-ACP (Acyl-Carrier-Protein) réductase, enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'acide mycolique qui est le constituant essentiel de la membrane de la mycobactérie (Rozwarski D.A., 1998). Des mutations au niveau du gène codant pour la catalase peroxydase (KatG) entraînent une résistance de la mycobactérie à l'isoniazide. Le développement d'agents antibactériens capables de produire le radical isonicotinolye et de réagir avec le NAD sans faire appel à la catalase peroxydase pourrait permettre de lutter contre les résistances de certaines mycobactéries à l'isoniazide (Timmins S.G., 2006).

III-2 L'inhibition ou l'activation d'enzymes NAD dépendantes

Beaucoup d'oxydo-réductases utilisent le NAD^+ et le NADH comme substrats qui se fixent au niveau du motif de Rossman hautement conservé. Dans cette optique, imaginer des inhibiteurs analogues du NAD qui peuvent être spécifiques et sélectifs d'une enzyme est surprenant et semble impossible. Pourtant, ceci est possible ; par exemple des inhibiteurs homologues de l'acide mycophénolique (Vinet B., 2001), de la thiazofurine et du benzamide riboside (2 analogues du Nicotinamide Ribose) (Bieganowski P., 2004) inhibent spécifiquement l'IMP déshydrogénase (IMP : acide inosinique) au niveau du site de liaison du NAD. Du fait de l'importance de cette enzyme dans le métabolisme des purines, ces composés pourraient être utilisés comme agents anticancéreux, antiviraux ou immunosuppresseurs.

D'autres molécules ne sont pas des inhibiteurs mais au contraire des activateurs d'enzymes impliquées dans le métabolisme du NAD. Dans ce cadre, les sirtuines sont des cibles particulièrement intéressantes. En effet, l'activation de ces désacétylases NAD-dépendantes pourrait augmenter l'espérance de vie. Des composés comme le resvératrol ont été montrés comme augmentant l'activité de ces enzymes avec en conséquence un retardement du vieillissement chez les vertébrés et les invertébrés (Howitz K.T., 2003 ; Guarente L., 2006).

III-3 L'inhibition d'enzymes de la biosynthèse du NAD.

Les enzymes de la voie de biosynthèse du NAD sont des cibles intéressantes dans la mesure où la molécule de NAD est synthétisée de manière différente chez les bactéries et chez

l'homme. Cette caractéristique laisse entrevoir de nouvelles cibles pour le développement d'antibiotiques.

Afin d'identifier précisément quelles enzymes pourraient constituer des cibles intéressantes, différentes études de bioinformatique ont été réalisées établissant un bilan des enzymes impliquées dans la biosynthèse du NAD présentes ou absentes chez différents organismes (Gerdes S.Y., 2002 ; Gerdes S.Y., 2006). Une partie des résultats issus de ces études est rapportée dans le Tableau 2:

Les différentes voies de biosynthèse du NAD	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>H. pylori</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>H. sapiens</i>
Voie de novo: jusqu'au NaMN	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
I- Du Trp au QA	-	-	-	-	-	-	-	-
II- Du L-Asp au QA	nadA nadB nadC	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - +
Voie de secours : Niacine au NaMN/NMN	Oui	Oui	??	Non	Oui	Non	Non	Oui
I- Nicotinamide au NaMN	pncA pncB	+ +	+ +	- -	+ +	- -	- -	- -
Nicotinamide désaminase	-	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinate phosphoryltransférase	-	-	-	-	-	-	-	-
II- Nicotinamide au NMN	-	-	-	-	-	-	-	+
Nicotinate phosphoribosyltransférase	-	-	-	-	-	-	-	-
Voie de secours: NMN exogène au NAD	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
NMN phosphohydrolase (extracell)	AphA	-	-	-	-	+	-	+
Transporteur pyridine nucléoside	pnuC nadR	+ +	+ +	+ -	+ -	+	-	-
Nicotinamide ribose kinase	-	-	-	-	-	-	-	-
NMN adényltransférase	nadR	-	+	-	-	+	-	-
- NMN spécifique (archae, qq bactéries)	-	-	-	-	-	-	-	+
- NaMN/NMN (eucaryotes)	-	-	-	-	-	-	-	-
Voie commune NAD/NADP	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Du NaMN au NAD	-	-	-	-	-	-	-	-
NaMN adényltransférase	nadD	+	+	+	+	-	-	-
-NaMN spécifique (plupart bactéries)	-	-	-	-	-	-	-	+
-NaMN/NMN spécifique (eucaryotes)	nadE	+	+	+	+	-	-	+
NAD synthétase	nadF	+	+	+	+	+	-	+
Du NAD au NADP	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD kinase	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2 : Tableau récapitulatif d'une partie de l'étude de génomique comparative de Gerdes S. exposant une reconstruction fonctionnelle de la biosynthèse du NAD chez divers organismes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *C. trachomatis*, *H. sapiens*). Les + indiquent la présence du gène chez l'organisme, les - indiquent son absence (Gerdes S.Y., 2002 ; 2006).

Une fois de plus, on note ici la diversité et la complexité de la voie de biosynthèse du NAD. Dans l'optique d'un ciblage spécifique de la bactérie, la première observation faite est que la voie de biosynthèse *de novo* du NAD est réalisée selon deux voies très différentes chez l'homme et chez la bactérie et que donc une inhibition spécifique d'enzyme(s) chez la bactérie est particulièrement pertinente. Ceci n'est valable que si la bactérie ne possède pas de voie de secours pour synthétiser son NAD. Selon ces critères, deux microorganismes semblent être de bons candidats : *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium tuberculosis*. En effet

ces deux bactéries effectuent leur biosynthèse du NAD d'une seule manière, via leur voie de biosynthèse *de novo*, la seule voie fonctionnelle chez ces microorganismes.

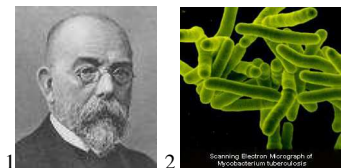
- Chez *H. pylori*, il est établi que la biosynthèse du NAD est effectuée uniquement par l'intermédiaire de sa voie principale (NadA et NadB) puisque les enzymes de la voie de secours sont absentes de son génome.

- Chez *M. tuberculosis*, les enzymes de la voie de biosynthèse principale NadA et NadB ont été identifiées comme essentielles à la survie et la virulence de la mycobactérie par des expériences de mutagénèse de type HIMAR transposon (Sasseti C.M., 2003). Les enzymes de la voie de secours sont présentes (gènes *pncA/pncB* présents dans le génome) mais elles ont été montrées comme non fonctionnelles. En effet, en dépit de l'expression de la nicotinamidase PncA donc de la présence d'acide nicotinique dans le milieu, ces études n'ont révélé aucune formation de NAD, reflétant probablement l'inactivité de l'enzyme en aval de PncA, l'acide nicotinique phosphoribosyltransférase (PncB) et donc de l'impossibilité pour cette bactérie à synthétiser du NAD à partir du nicotinamide (Foster J.W., 1980 ; Kasarov L.B., 1972). Dans cette étude, les auteurs concluent que le NAD nécessaire à la mycobactérie est synthétisé uniquement par la voie de biosynthèse *de novo*.

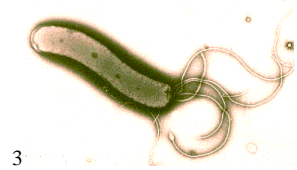
Chez ces deux bactéries *H. pylori* et *M. tuberculosis*, les enzymes de la biosynthèse du NAD *de novo* (NadA, NadB et NadC) sont par conséquent citées comme **cibles potentielles d'agents antibactériens** (Sharma V., 1998).

- *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis ou bacille de Koch² a été découvert en 1882 par Robert Koch¹ (Brock T.D., 1988). Cette mycobactérie provoque la tuberculose. L'incidence mondiale de cette maladie est d'environ 9.2 millions nouveaux cas en 2006 (rapport de l'OMS). Cette maladie tue chaque année plus d'1.7 millions de personnes. Il existe un vaccin (le BCG) qui permet la protection. La tuberculose est soignable lorsqu'elle est bien diagnostiquée et que le traitement est bien suivi. Le traitement consiste en l'utilisation simultanée de 4 antibiotiques au mode d'action différents : l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la pyrazinamide pendant deux mois, puis quatre mois de prise d'isoniazide et de rifampicine. Le mécanisme



d'action des différentes molécules antituberculeuses est maintenant en majorité connu. L'isoniazide et la pyrazinamide sont des inhibiteurs de la biosynthèse des acides gras. L'éthambutol cible la synthèse des glycosides (arabinane : constituant de la membrane de la mycobactérie) et la rifampicine inhibe la synthèse d'ARN bactériens par liaison à l'ARN polymérase (Janin Y.L., 2007). La résistance aux médicaments antituberculeux classiques reste rare (environ 4 % des nouveaux cas) mais atteint 10 % dans certains pays d'Europe de l'Est. La lourdeur du traitement ainsi que l'émergence de nouvelles souches résistantes réclament la recherche de nouvelles cibles et le développement de nouveaux agents antituberculeux.



- *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori*³ est une bactérie qui infecte la muqueuse gastrique. 80% des ulcères gastro-duodénaux sont causés par des infections de *H. pylori*, même si chez la plupart des humains infectés, la maladie reste asymptomatique. *H. pylori* vit exclusivement dans l'estomac humain et est le seul organisme connu pouvant survivre dans un environnement aussi acide. Les maladies liées à l'infection sont plus ou moins graves (ulcères gastriques et duodénaux, gastrites chroniques) (Borody T.J., 1989). Il a été montré que *H. pylori* est l'un des facteurs de risque principal des cancers gastriques. L'infection se soigne à l'aide d'une trithérapie associant deux antibiotiques à un IPP (inhibiteur de la pompe à proton). La durée moyenne du traitement se situe entre une à deux semaines. Comme pour la plupart des traitements antibiotiques on observe une augmentation des résistances de cette bactérie aux traitements classiques (Warren J.R., 1983).

III-4 Les antibiotiques et les résistances



Un des progrès majeurs contre le développement des infections bactériennes au 20^{ème} siècle fut certainement la découverte des antibiotiques par Fleming⁴ en 1928 (Fleming A., 1945). Grâce à leur utilisation, le taux de mortalité par infection bactérienne a été diminué d'un facteur 20 entre 1900 et 1980. Malheureusement, même si ces produits se sont avérés

particulièrement actifs, on voit depuis quelques dizaines d'années apparaître des résistances bactériennes de plus en plus fortes qui commencent à poser de sérieux problèmes quant à l'efficacité et à l'utilisation de certaines substances. En effet, les bactéries développent à plus ou moins long terme des mécanismes de résistance (destruction de l'antibiotique par le microorganisme lui-même, mutation du gène codant pour la protéine cible, pompage des antibiotiques en dehors de la cellule).

Ainsi **pour lutter contre ces résistances**, deux stratégies sont possibles :

- Soit trouver de **nouvelles molécules actives sur des cibles déjà existantes** en essayant de diminuer leur capacité à induire des résistances.
- Soit synthétiser de **nouveaux produits actifs sur de nouvelles cibles**. Ceci constitue un des buts de mon étude : trouver des molécules inhibant une nouvelle cible de la voie de biosynthèse du NAD : la quinolinate synthase (NadA), enzyme dont je vais vous présenter plus en détails dans le paragraphe suivant.

IV- Le système quinolinate synthase

Dans cette dernière partie de mon introduction, j'ai regroupé l'ensemble des informations relatives à la quinolinate synthase (NadA) ainsi qu'à la L-Aspartate oxydase (NadB) disponibles à mon arrivée au laboratoire en 2006.

IV-1 L'historique : Mise en évidence de NadA et NadB comme des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse *de novo* du NAD

- **Identification d'un métabolite essentiel dans la voie de biosynthèse *de novo* du NAD chez les procaryotes : l'acide quinolinique**

Rapidement, il a été établi grâce à des expériences de marquage que les procaryotes (*E. coli* et *B. subtilis*) n'utilisaient pas le L-Tryptophane pour synthétiser leur NAD comme le font les eucaryotes (Yanofsky C., 1954). Andreoli A.J. en 1963 met en évidence un composé clé impliqué dans cette voie de biosynthèse *de novo* du NAD. En effet, il observe que l'ajout d'acide quinolinique sur des extraits cellulaires d'*E. coli* permet la formation d'acide nicotinique mononucléotide (NaMN), donc de NAD, suggérant que l'acide quinolinique est

aussi un intermédiaire dans la voie de biosynthèse *de novo* du NAD chez *E. coli* (Andreoli A.J., 1963).

- **Identification des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse *de novo* du NAD**

La mise en évidence des gènes impliqués de la biosynthèse *de novo* du NAD chez *E. coli* a été rapportée par Tritz et al. en 1970 (Tritz G.J., 1970a,b). Trois mutants nécessitant l'ajout d'acide nicotinique pour pousser sur milieu minimum (obligés d'utiliser leur voie de secours) vont être isolés. Les trois gènes correspondants ont dans un premier temps été nommés *nicA*, *nicB* et *nicC* (pour nicotinic acid), et renommés plus tard *nadA*, *nadB* et *nadC* (pour nicotinamide adenine dinucleotide) (Tritz G.J., 1970a,b).

- **Lien entre les enzymes NadA, NadB et NadC et la voie de biosynthèse *de novo* du NAD chez les procaryotes**

Le lien entre la biosynthèse *de novo* du NAD et les enzymes NadA et NadB est clairement démontré par Tritz G.J. en 1973 grâce à des études *in vitro* montrant la formation d'acide quinolinique marqué ($[^{14}\text{C}]$ -QA) en mélangeant des extraits bactériens contenant NadA mais ne produisant pas NadB (souche *nadB*⁻), avec des extraits bactériens contenant NadB dans lesquels NadA est absente (souche *nadA*⁻). Dans les extraits contenant seulement NadA ou NadB aucune formation de $[^{14}\text{C}]$ -QA n'a été détectée (Tritz G.J., 1973).

Pour résumer, la voie de biosynthèse *de novo* du NAD chez les procaryotes implique un précurseur central l'acide quinolinique qui est synthétisé par l'action de deux enzymes NadA et NadB. NadC est impliquée ultérieurement ; en effet un mutant *nadC* d'*E. coli* accumule de l'acide quinolinique et est incapable de former du NaMN (Ogasawara N., 1967).

IV-2 Découverte des substrats

Ogasawara N. en 1967, grâce à des études de marquage avec du $[^{14}\text{C}]$ -L-Aspartate identifie le premier les deux substrats menant à la formation d'acide quinolinique et ce de la façon suivante : sur des extraits d'une souche d'*E. coli* délétée au niveau de *nadC*, qui je le rappelle permet l'accumulation d'acide quinolinique dans les extraits et donc sa quantification, a été additionné du $[^{14}\text{C}]$ -L-Aspartate. Après élimination des protéines par précipitation à la chaleur, la solution est passée sur une colonne Dowex I et la radioactivité de

différentes fractions éluées suivie par scintigraphie (Méthode mise au point par Preiss et Handler). La fraction contenant l'acide quinolinique a été lyophilisée puis dégradée par un traitement à 190° C pendant 30 min. Les analyses de radioactivité effectuées sur les produits de dégradation de l'acide quinolinique ont mis en évidence qu'un quart de la radioactivité dosée est situé sur le groupe carboxylate C-7, un autre quart sur le deuxième groupe carboxylate C-8 et le reste du marquage est retrouvé sur le reste de la molécule (donc en C-2 et C-3). Cette étude a montré de façon claire que le L-Aspartate est un précurseur de l'acide quinolinique et que l'on a incorporation directe des carbones C-2 et C-3 du L-Aspartate au niveau des carbones C-2 et C-3 de l'acide quinolinique comme indiqué dans la Figure 22 (Ogasawara N., 1967).

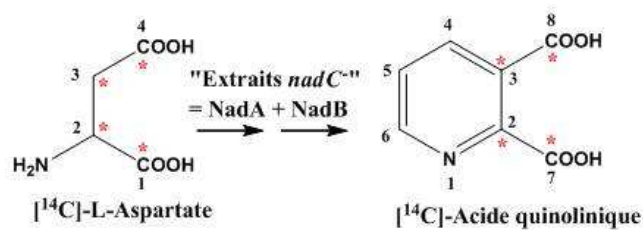


Figure 22 : Structure du ^{14}C -acide quinolinique montrant les positions au niveau desquelles est incorporée la radioactivité provenant du ^{14}C -L-Aspartate (Ogasawara N., 1967).

Il restait à déterminer la provenance des 3 autres carbones nécessaires à la formation de la molécule d'acide quinolinique (les carbones C-4, C-5 et C-6 dans la Figure 22). Pour répondre à cette question une autre étude, datant de 1970, a été effectuée à partir d'extraits bactériens d'*E. coli nadC* mis en présence de L-Aspartate, et de différents potentiels substrats marqués au ^{14}C sur différentes positions : le $[1-(3)\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glycérol, $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glucose, $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glucose et le $[6\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glucose (Chandler J.L.R, 1970). Dans tous les cas, la formation d'acide quinolinique marqué a été observée et ce dans des quantités similaires. A partir des différents substrats marqués testés, la répartition de la radioactivité incorporée au niveau des différents carbones de l'acide quinolinique, dosée après dégradation de celui-ci comme cité précédemment, a montré que ces molécules devaient nécessairement être transformées avant d'être condensées au L-Aspartate (Chandler J.L.R, 1970). Ainsi, la Dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le Glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3P) ont été proposés comme produits de conversion du Glucose et du Glycérol et proposés comme deux produits capables de se condenser avec le L-Aspartate pour donner de l'acide quinolinique.

Deux mécanismes de condensation avec le L-Aspartate sont alors proposés en fonction du précurseur triose phosphate comme illustré par la Figure 23 :

- Si c'est le DHAP (Cas 1) alors c'est la liaison entre le carbone 3 et le carbone 4 de l'acide quinolinique qui se forme en premier lors de la condensation.
- Si c'est le Glycéraldéhyde-3-phosphate alors c'est la liaison entre le C-6 et l'azote qui se forme en premier lors de la condensation (Cas 2) (Chandler J.L.R., 1970).

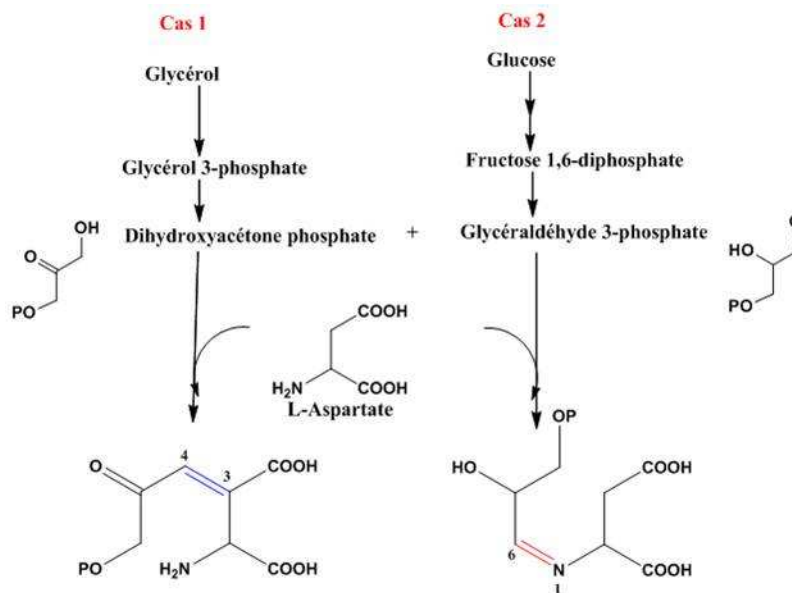


Figure 23 : Hypothèses émises par Chandler J.L.R. en 1970 sur la nature du second substrat de la quinolinate synthase qui se condense avec le L-Aspartate (Chandler J.L.R., 1970).

L'étude suivante a été réalisée par Suzuki N. en 1973 sur des protéines NadA et NadB partiellement purifiées. Dans cette étude, en se basant sur l'étude de Chandler J.L.R, il teste sur les protéines NadA et NadB la formation de [¹⁴C]-QA à partir de [¹⁴C]-L-Aspartate et de différents substrats : la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), le glycéraldéhyde 3-phosphate (G-3P), le glycéraldéhyde, la dihydroxyacétone, l'acide 3-phosphoglycérique, l' α -glycérophosphate et le glycérol. Les résultats obtenus montrent que le DHAP et le G-3P possèdent la même efficacité en tant que précurseurs dans la formation de [¹⁴C]-acide quinolinique ([¹⁴C]-QA) en présence de [¹⁴C]-L-Aspartate. En effet, le DHAP et le G-3P conduisent à la même quantité d'acide quinolinique formée. Les autres molécules testées ne conduisant pas à la formation de [¹⁴C]-QA. Par ailleurs, ces deux molécules sont les substrats d'une enzyme, la triose phosphate isomérase (TIM). Le chloroacétol phosphate, un inhibiteur de la triose phosphate isomérase, a été utilisé afin de déterminer si l'activité observée n'était pas due à la présence d'une activité TIM contaminante. Il a ainsi été montré que la synthèse d'acide quinolinique à partir de G-3P et de [¹⁴C]-L-Aspartate est inhibée lors de l'ajout de cet

inhibiteur mais, par contre, n'est pas modifiée lors de l'utilisation de DHAP et de L-Aspartate comme substrats (Figure 24). Ce résultat a conduit les auteurs à conclure que l'activité quinolinate synthase observée en présence de Glycéraldéhyde 3-Phosphate était due à une contamination par la TIM et que donc le véritable substrat est le DHAP. Il est important de noter ici que c'est à partir de cette expérience qu'il a été établi, sans réserve, que l'acide quinolinique est formé à partir de L-aspartate et de DHAP (Suzuki N., 1973).

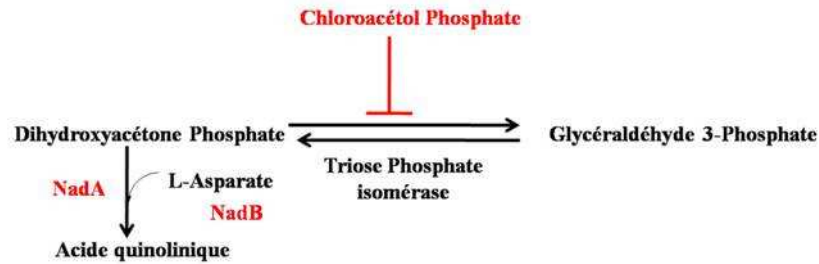


Figure 24 : Schéma illustrant l'hypothèse de Suzuki N. selon laquelle c'est le DHAP, et pas le G-3P, qui se condense avec le L-aspartate pour former l'acide quinolinique.

En 1977, Wicks F.D. effectue sur les protéines NadA et NadB partiellement purifiées des expériences avec du [3-¹⁴C]-dihydroxyacétone phosphate et du L-Aspartate et montre que le C-3 du DHAP se condense au C-3 du L-Aspartate et que par conséquent une liaison est créée entre le carbone 1 du DHAP et la fonction amine du L-Aspartate comme le montre la Figure 25 (Wicks F.D., 1977).

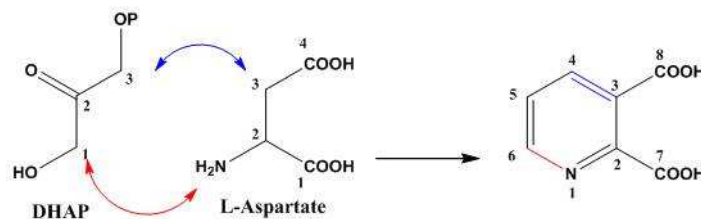


Figure 25 : Mode de condensation du L-Aspartate et du DHAP proposé par Wicks F.D en 1977 après marquage du DHAP au [¹⁴C].

Ces trois études de marquage effectuées sur des extraits d'un mutant d'*E. coli nadC* ont permis de mettre en évidence que les protéines NadA et NadB catalysent la formation d'acide quinolinique à partir du L-Aspartate et d'un triose phosphate que Suzuki proposait être le DHAP.

Wicks F.D. en 1978 va permettre de proposer un ordre dans l'action des enzymes. En d'autres termes il va déterminer quelle est l'enzyme (NadA ou NadB) qui condense les deux substrats. Pour cela, il place de part et d'autre d'une membrane de dialyse la protéine NadA d'un côté et la protéine NadB de l'autre. De chaque côté de la membrane sont ensuite placés du DHAP et du [¹⁴C]-L-Aspartate (Figure 26A). La formation de [¹⁴C]-QA est observée dans chacun des deux compartiments. Cependant, une plus grande quantité de [¹⁴C]-QA est observée dans le compartiment contenant l'enzyme NadA permettant d'établir alors l'ordre d'action des enzymes : dans un premier temps l'action de NadB qui convertit le L-Aspartate en Iminoaspartate puis NadA qui effectue la condensation de l'iminoaspartate avec le DHAP pour former l'acide quinolinique comme indiqué dans la Figure 26B (Wicks F.D., 1978). L'information majeure apportée par cette expérience est que c'est la protéine NadA qui condense les deux substrats IA et DHAP.

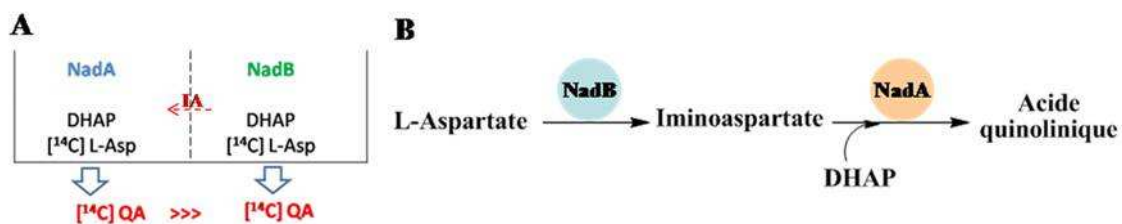


Figure 26 : (A) Expérience effectuée avec la membrane de dialyse. (B) Ordre des réactions proposé pour la formation de l'acide quinolinique.

IV-3 Caractérisation de la L-Aspartate oxydase (NadB)

Les premières études attribuant une fonction à chacun des membres du duo NadA/NadB datent des années 70. Concernant NadB, Wicks F.D. établit en 1978 (Wicks F.D., 1978) un lien entre NadB d'*E. coli* (partiellement purifiée) et la conversion du L-Aspartate puisque NadB est capable d'utiliser le L-Aspartate. Dans ces expériences, la consommation du L-Aspartate dépend de FAD conduisant l'auteur à proposer une déshydrogénation du L-Aspartate avec formation d'un produit instable : l'iminoaspartate. Ce n'est qu'en 1982 que Nasu S. (Nasu S., 1982a) expose la première purification de NadB d'*E. coli*, mais surtout la première mise en évidence d'une activité L-Aspartate oxydase en utilisant du [¹⁴C]-L-Aspartate et établit que cette activité est FAD dépendante. Il caractérise le produit de la réaction comme étant effectivement l'iminoaspartate. Ce produit est instable (notamment en absence de NadA) et se décompose rapidement en acide oxaloacétique. C'est

d'ailleurs la présence d'acide oxaloacétique qui permet de dire que de l'iminoaspartate s'est formé à partir de L-Aspartate.

La stabilité de cet intermédiaire a par la suite été étudiée et ce grâce à la stratégie suivante : NadB a été incubée 100s avec du [¹⁴C]-L-Aspartate, puis l'enzyme inhibée avec du mésotartrate. La stabilité de l'iminoaspartate accumulé pendant ces 100s a ensuite été évaluée par ajout de la protéine NadA et de DHAP à différents temps après l'ajout du mésotartrate (t_0 , t_{60s} , t_{120s} ...) et l'incubation poursuivie pendant 5 minutes, à la suite de quoi la formation d'acide quinolinique a été mesurée. Une diminution de la quantité d'acide quinolinique formé a été observée en fonction du temps d'ajout de NadA/DHAP : plus le mélange NadA/DHAP est ajouté tardivement, moins on a de formation d'acide quinolinique (QA). Cette diminution de la quantité de QA correspond à la décomposition intrinsèque d'iminoaspartate, et ceci a permis de déterminer le temps de demi-vie de l'iminoaspartate comme égal à 144 secondes (Nasu S., 1982a). Une même valeur a été déterminée lors d'une autre étude dans laquelle l'iminoaspartate a été généré chimiquement en mélangeant de l'acide oxaloacétique et du sulfate d'ammonium avec dans ces conditions un $t_{1/2}$ mesuré de 150 secondes à pH 8 à 25 °C (Nasu S., 1981). Notons que la stabilité de l'iminoaspartate est dépendante du pH et de la température.

Grâce à l'utilisation de [¹⁴C]-L-Aspartate et à la détection de [¹⁴C]-acide oxaloacétique, les différentes constantes cinétiques de l'enzyme pour le L-Aspartate et le FAD ont pu être déterminées. Comme on peut le voir sur la Figure 27A, la L-Aspartate oxydase présente un comportement atypique suivant les concentrations en L-Aspartate. Deux valeurs de K_m pour le L-aspartate ont ainsi été déterminées : un K_m de 0.63 mM entre 0.25 mM et 1.25 mM de L-Aspartate, et un K_m de 3.3 mM pour les concentrations supérieures à 2 mM : (Figure 27A). Le K_m proposé pour le FAD est de 2.5 mM dans des conditions où la concentration en L-Aspartate est égale à 0.5 mM (Valeurs calculées à partir des courbes de Lineweaver-Burk : Figure 27B) (Nasu S., 1982a). Il est à noter que cette valeur de K_m est élevée pour une flavoprotéine puisque en général le K_m pour le FAD d'une flavoenzyme est de l'ordre de quelques dizaines de micromolaires (Covès J., 1999).

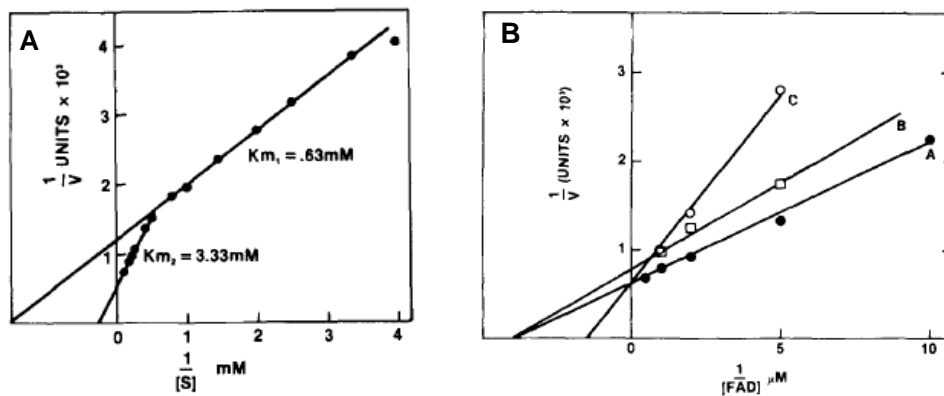


Figure 27 : (A) Représentation de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale de la L-Aspartate oxydase en fonction de la concentration en L-Aspartate (9 μg de NadB, temps d'incubation de 60 min). (B) Représentation de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale de l'apo L-Aspartate oxydase en fonction de la concentration en FAD (4.5 μg de apo NadB, L-Aspartate 0,5 mM avec des concentrations de FAD variant de 1 à 20 μM), A- Sans inhibiteur, B- 45 μM de Cibacron blue, un inhibiteur non compétitif du FAD, C- 2 mM de NAD^+ , un inhibiteur compétitif du FAD (Nasu S., 1982a).

Les auteurs observent une autre particularité pour la L-Aspartate oxydase : il n'existe pas de corrélation entre l'activité L-Aspartate oxydase et la concentration protéique et ce pour différentes concentrations de substrats ajoutés. En effet, pour une même concentration de L-Aspartate, l'augmentation de la concentration protéique n'entraîne pas une augmentation proportionnelle de la quantité de produit formé. Les auteurs expliquent ce phénomène par l'existence d'un équilibre entre une forme monomérique (à faible concentration) qui serait active et une forme dimérique inactive (aux plus fortes concentrations). Mortarino M. en 1996 (Mortarino M., 1996) confirme ce résultat mais propose que ce phénomène de non linéarité entre activité enzymatique et concentration protéique n'est pas relié à l'état d'oligomérisation de l'enzyme mais plutôt à une inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction : l'iminoaspartate (IA). Cette inhibition est suspendue par l'ajout de NadA ce qui conduit les auteurs à proposer que l'inhibition de l'activité enzymatique de NadB est due à la formation d'un complexe NadB-IA et qu'en présence de NadA l'iminoaspartate « bloqué » dans le site actif de NadB est pris en charge (par NadA), permettant à NadB d'être à nouveau fonctionnelle (Mortarino M., 1996).

IV-4 La quinolinate synthase : une enzyme sensible à l'oxygène

Flachmann R., en 1988 effectue le premier clonage et séquençage du gène *nadA* d'*E. coli*, son analyse de séquence donne un gène de 840 pb codant pour une protéine de 31 555 Da. Cependant aucune expression, purification et caractérisation n'ont été décrites (Flachmann R., 1988).

En 1991, Gardner P.R. et Fridovich I. rapportent des informations qui seront primordiales pour la mise en évidence de l'activité quinolinate synthase. En effet, l'exposition à l'oxygène d'extraits d'*E. coli* entraîne une diminution de l'activité quinolinate synthase (activité dosée par détection du [¹⁴C]-QA selon la méthode développée par Suzuki N. en 1973 (Suzuki N., 1973)). De plus, la ré-incubation en anaérobiose de ces extraits préalablement exposés à l'oxygène permet la récupération partielle de l'activité quinolinate synthase (60 %). Enfin, l'inactivation de l'enzyme préalablement exposée à l'oxygène est conservée si l'on ajoute des agents chélateurs du Fe(II) (α,α' dipyridyl ; 1,10-phénantroline) dans le milieu réactionnel. A la vue de ces différentes expériences, les auteurs proposent « LA » quinolinate synthase NadA comme « L' » enzyme sensible à l'oxygène impliquée dans la formation d'acide quinolinique (Gardner P.R., 1991a). L'équipe de Fridovich I. est spécialisée dans le stress oxydant bactérien et s'intéresse à certaines enzymes sensibles au superoxyde que sont les protéines fer-soufre ([Fe-S]) et plus particulièrement les protéines de type déshydratases qui comme leur nom l'indique sont impliquées dans des réactions de déshydratation (Flint D.H., 1996). Ces enzymes contiennent un centre [4Fe-4S] sensible à l'oxygène qui les inactive et sont réactivées lorsqu'on les remet en anaérobiose (Figure 28A).

La sensibilité à l'oxygène et les deux étapes de déshydratation proposées par Nasu S. en 1982 (Nasu S., 1982a) pour le mécanisme de formation de l'acide quinolinique ainsi que la présence d'un motif CXXCXXC dans la séquence en acides aminés de NadA, motif caractéristique des protéines [4Fe-4S] (Figure 28B) mènent Gardner P.R. et Fridovich I. à penser que NadA possède un centre [4Fe-4S] du même type que celui retrouvé dans les déshydratases et que c'est ce centre [4Fe-4S] qui est le site sensible à l'oxygène au cours de la biosynthèse du NAD (de l'acide quinolinique).

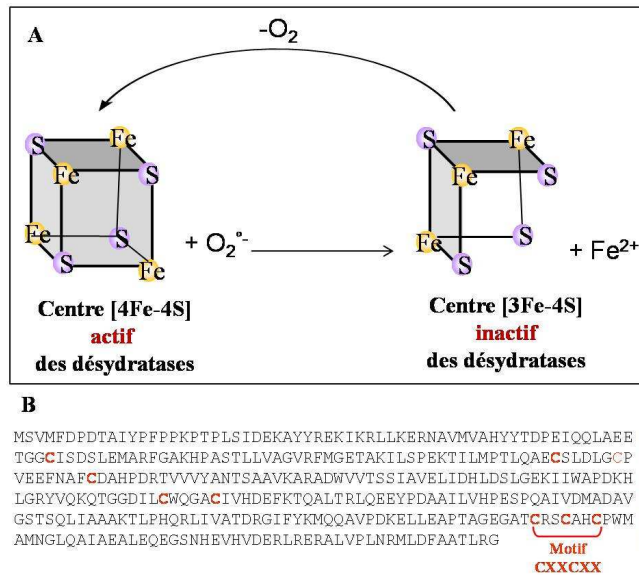


Figure 28 : (A) Inactivation des déshydratases par $O_2^{\cdot -}$: relargage du Fe(II) des centres [4Fe-4S] et formation d'un centre [3Fe-4S] inactif (Gardner P.R, 1991b,c) (B) Séquence de la quinolinate synthase NadA d'*E. coli* mettant en avant le motif CXXCXXC.

IV-5 Purification et premières caractérisations de la quinolinate synthase

Jusqu'aux années 2000, toutes les études avaient été effectuées en conditions d'aérobiose (à l'exception de celle de Gardner P.R., 1991a) sur des extraits bactériens ou bien sur une protéine NadA partiellement purifiée (Chandler J.L.R., 1970 ; Suzuki N., 1973 ; Griffith G.R., 1975 ; Wicks F.D., 1977). Il a fallu attendre les années 2000 pour que la première purification de NadA soit réalisée.

a- Purification de la protéine sous forme d'une apoprotéine.

Ceciliani F. en 2000 présente le clonage, la surexpression et la purification de la quinolinate synthase d'*E. coli* en condition d'aérobiose (Ceciliani F., 2000). Après surexpression, la protéine se trouve majoritairement sous la forme de corps d'inclusion. Les auteurs mettent alors au point une procédure de dénaturation puis de renaturation de la protéine (ajout de glutathion et dialyse) leur permettant de purifier la protéine sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anion (MonoQ) et d'en obtenir 12 mg pour un litre de culture. Il est à noter que la protéine ne contient aucun cofacteur. Ils mesurent une activité enzymatique quinolinate synthase sur cette préparation à partir de NadB purifiée, de L-Aspartate, de DHAP et de NadA en mesurant la quantité de phosphate libéré (du DHAP) lors de la formation de l'acide quinolinique. Ils déterminent ainsi une activité spécifique de

600 μ moles (d'acide quinolinique)/min/mg de protéine, malgré l'absence de centre métallique au sein de la protéine comme l'a proposé Fridovich I. (Gardner P.R., 1991a).

b- Purification de la protéine sous forme métallée (holoenzyme)

C'est en 2005 qu'ont été rapportées pour la première fois la purification et la caractérisation de la quinolinate synthase d'*E. coli* sous forme métallée par notre laboratoire (Ollagnier-de Choudens S., 2005) ainsi que par l'équipe de Squire Booker (Cicchillo R.M., 2005). La protéine a été purifiée en anaérobiose et présente une couleur marron-jaune. En accord avec le dosage de fer et de soufre et les techniques spectroscopiques utilisées, absorption UV-visible, Mössbauer et Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), il a été montré que NadA contenait un centre [4Fe-4S]/monomère de protéine, sensible à l'oxygène et essentiel à l'activité. Le spectre UV-visible de la protéine présente une bande de transfert de charge S \rightarrow Fe(III) situé vers 420 nm, caractéristique d'un centre [Fe-S] (Figure 29A). La spectroscopie Mössbauer a permis de montrer que 100% du fer est présent sous la forme d'un centre [4Fe-4S]²⁺ (S=0) (Figure 29B) (Ollagnier-de Choudens S., 2005). La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée selon deux techniques différentes dans les deux laboratoires. L'équipe de Booker S. a effectué une quantification du produit formé (QA) par HPLC et a ainsi déterminé une activité spécifique égale à 0,015 μ mole d'acide quinolinique/min/mg (Cicchillo R.M., 2005). Le test enzymatique mis au point au laboratoire était quant à lui basé sur la quantification par absorption UV-visible du DHAP restant en fin de réaction en utilisant l' α -glycérophosphate déshydrogénase comme enzyme (Ollagnier-de Choudens S., 2005). Ce test enzymatique, assez lourd à mettre en œuvre, n'a pas permis de déterminer une activité spécifique mais a permis de montrer, de la même façon que Cicchillo R.M. et al., que le centre [4Fe-4S] est essentiel à l'activité de l'enzyme.

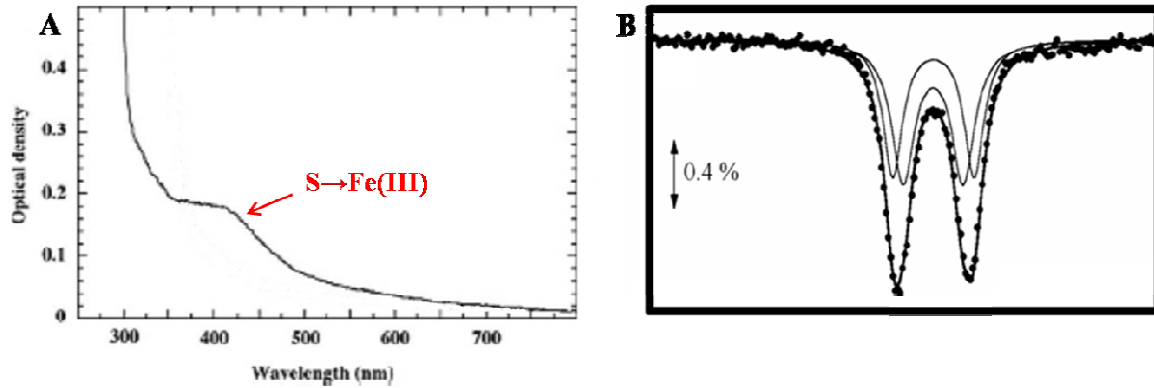


Figure 29 : (A) Spectre UV-visible de la quinolinate synthase purifiée en anaérobiose. (B) Spectre Mössbauer de la quinolinate synthase purifiée en anaérobiose et mesuré à 4.2 K, le spectre expérimental est indiqué par (•), les deux spectres théoriques de centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ sont en trait plein (-) (Ollagnier-de Choudens S., 2005).

IV-6 Aspects structuraux : Première structure tridimensionnelle de la quinolinate synthase

La première structure tridimensionnelle de la quinolinate synthase (Figure 30A) a été rapportée par Sakuraba H. en 2005 sur la quinolinate synthase de *Pyrococcus horikoshii* un organisme hyperthermophile, dont la surexpression a été effectuée chez *E. coli* et la purification réalisée en conditions d'aérobiose. La structure, obtenue par diffraction aux Rayons X à une résolution de 2.0 Å, a été obtenue en présence de malate, un analogue structural de l'iminoaspartate. Comme représentée Figure 30A l'architecture générale de la protéine est triangulaire. Elle est composée de trois domaines similaires possédant chacun un repliement de type sandwich $\alpha\beta\alpha$. Le site actif (où se trouve le malate) est situé à l'interface des trois domaines. Il est à noter que cette structure ne possède pas de centre métallique et que plusieurs parties de la molécule n'ont pas pu être résolues et sont donc absentes du modèle. Ces différentes parties « manquantes » sont indiquées en rouge sur la Figure 30B représentant la séquence en acides aminés de NadA de *P. horikoshii*. Une fois de plus, malgré l'absence de centre $[4\text{Fe-4S}]$ dans la protéine, une activité enzymatique mesurée par HPLC selon le protocole mis au point par Cicchillo R. M. et al. a été mesurée et déterminée comme étant égale à 2,2 $\mu\text{moles/mg/min}$ (Sakuraba H., 2005). Cette activité est donc plus de 140 fois supérieure à celle proposée par Booker S. sur une enzyme avec un centre $[4\text{Fe-4S}]$ (Cicchillo R.M., 2005).

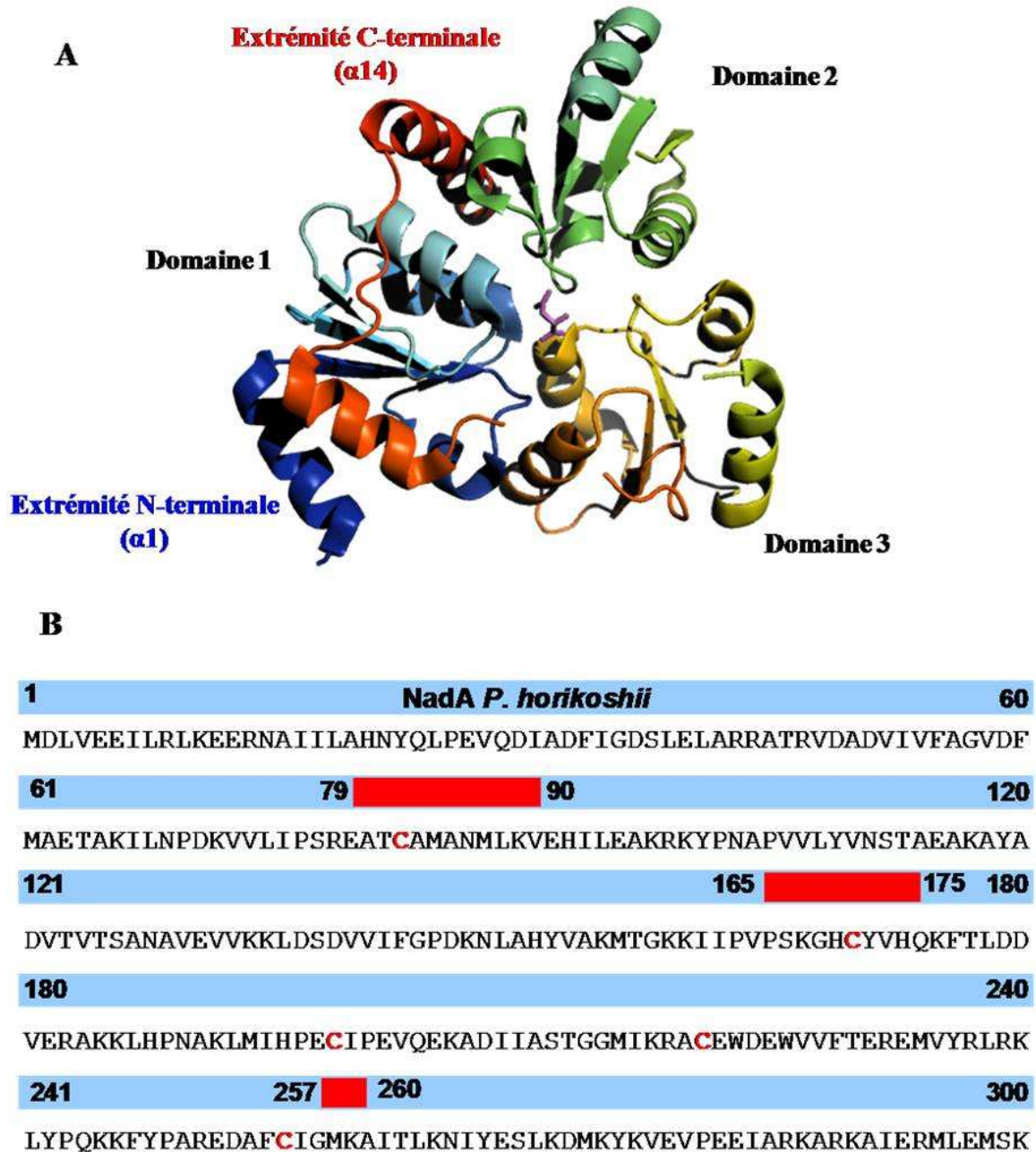


Figure 30 : (A) Structure cristallographique de la quinolinate synthase de *Pyrococcus horikoshii* (code pdb : 1WZU). L'extrémité N-terminale est colorée en bleu, l'extrémité C-terminale est en rouge. La molécule de malate est représentée en modèle bâton en violet au centre de la structure. (B) Séquence primaire de la quinolinate synthase de *P. horikoshii* (300 acides aminés). Les parties résolues de la protéine sont indiquées en bleu, les parties non définies sont indiquées en rouge, les cystéines sont également indiquées en rouge.

IV-7 Le « complexe quinolinate synthase NadA-NadB »:

L'hypothèse de l'existence d'un complexe entre ces deux protéines communément appelé « **complexe quinolinate synthase** » est sous-jacente depuis 1970 pour plusieurs raisons :

- Dans la plupart des organismes, les gènes *nadA* et *nadB* font partie d'un même opéron.
- Ces deux protéines sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide quinolinique (Tritz G.J., 1973).
- Au vu de la nature particulièrement instable du produit de la réaction catalysée par NadB, l'iminoaspartate (voir partie IV-3), on peut aisément imaginer l'existence d'un complexe entre NadA et NadB de sorte que l'iminoaspartate soit protégé et directement utilisé par NadA.

A mon arrivée au laboratoire en 2005, aucune démonstration (par des méthodes biochimiques ou structurales) de l'existence d'un tel complexe n'avait été faite. Cependant deux études, celles de Wicks F.D. (Wicks F.D., 1978) et de Nasu S. (Nasu S., 1981) semblaient s'opposer à la formation d'un complexe entre NadA et NadB et ce pour les raisons suivantes :

- Wicks en 1978 effectue des expériences en plaçant de part et d'autre d'une membrane de dialyse la protéine NadA d'un côté et la protéine NadB de l'autre, les protéines étant partiellement purifiées. De chaque côté de la membrane sont ensuite placés du DHAP (un triose phosphate) et du [¹⁴C]-L-Aspartate. La formation de [¹⁴C]-QA est observée dans chacun des deux compartiments (avec quelques différences qui ont été discutées dans le paragraphe IV-2), preuve qu'une interaction directe entre les protéines NadA et NadB n'est pas nécessaire pour la formation d'acide quinolinique (Wicks F.D., 1978).
- En 1981, une autre étude démontre la formation d'acide quinolinique en générant chimiquement l'iminoaspartate par un mélange d'acide oxaloacétique et de sulfate d'ammonium, preuve que la quinolinate synthase est active en absence de NadB (Nasu S., 1981).

Ainsi la question de l'existence d'un complexe entre NadA et NadB était toujours en suspens à mon arrivée au laboratoire.

IV-8 Un mécanisme complexe : Les différentes propositions

La formation de l'acide quinolinique nécessite la condensation de deux substrats, le DHAP et un intermédiaire instable généré par NadB : l'iminoaspartate. L'utilisation de deux substrats pour former une molécule aromatique par condensation laisse supposer un mécanisme complexe.

a- La première hypothèse de mécanisme

La première hypothèse de mécanisme est celle de Nasu S. en 1982 (Figure 31) (Nasu S., 1982a). Dans une première étape, le groupement électroattracteur de l'amine facilite le départ du proton du C-3 de l'iminoaspartate. L'espèce formée effectue une attaque nucléophile sur le C-3 du DHAP entraînant l'élimination du phosphate inorganique. Une réaction d'isomérisation de type céto-aldolique, suivie de deux étapes de déshydratation successives cyclisent la molécule et permettent la formation de l'acide quinolinique. Cette hypothèse de mécanisme est appuyée par Flint D.H. en 1996 dans une revue qu'il consacre aux protéines [Fe-S] possédant des fonctions non rédox dans laquelle il mentionne la quinolininate synthase NadA (Flint D.H., 1996).

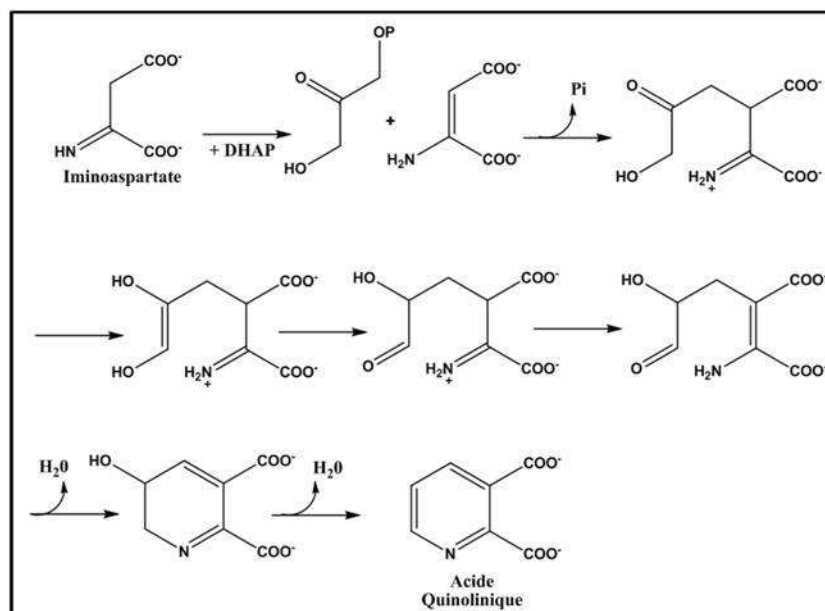


Figure 31 : Proposition de mécanisme faite par Nasu S. en 1982 (Nasu S., 1982a).

b- La seconde hypothèse de mécanisme

Begley T.P. va émettre une seconde hypothèse de mécanisme en 2001 (Figure 32) (Begley T.P., 2001). Par opposition à la proposition de Nasu S., il propose l'isomérisation du

DHAP en G-3P avant sa condensation avec l'iminoaspartate. Ainsi, il propose dans un premier temps la réaction de l'amine du L-Aspartate sur la fonction aldéhyde du G-3P avec départ d'une molécule d'eau. Le composé ainsi formé va se cycliser par perte du phosphate et une étape de déshydratation va conduire à la formation de l'acide quinolinique. Les différences avec le mécanisme proposé par Nasu S. sont donc le passage par un intermédiaire Glyceraldéhyde-3-phosphate ainsi que le départ plus tardif du phosphate.

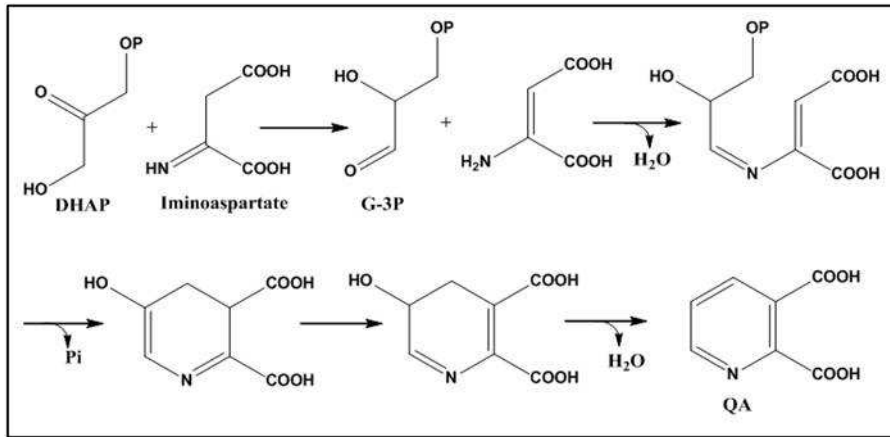


Figure 32 : Proposition de mécanisme faite par Begley T.P en 2001 (Begley T.P., 2001).

Les deux mécanismes peuvent se résumer comme indiqué sur la Figure 33 :

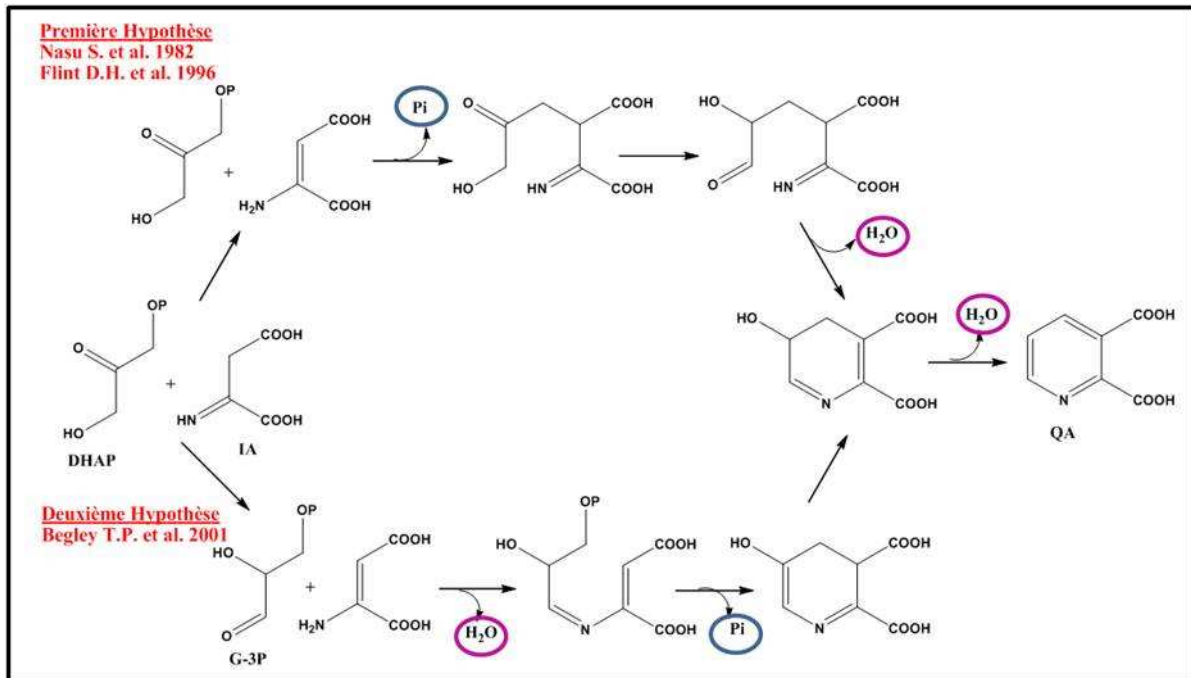


Figure 33 : Bilan des deux hypothèses de mécanismes pour la formation de l'acide quinolinique (Sakuraba H., 2005).

Objectifs de la thèse

A mon arrivée au laboratoire, la quinolinate synthase d'*E. coli* avait été caractérisée biochimiquement et spectroscopiquement. Le domaine d'expertise du laboratoire nécessaire à l'identification et la caractérisation des métalloprotéines avait permis de purifier la protéine en anaérobiose permettant ainsi la conservation de son centre métallique. La nature de ce centre métallique avait pu être déterminée grâce à différentes spectroscopies UV-visible, RPE et Mössbauer. On savait donc que la quinolinate synthase d'*E. coli* possédait un centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ sensible à l'oxygène et essentiel à son activité (Ollagnier-de Choudens S., 2005). La caractérisation de l'enzyme avait également été rapportée par l'équipe de Squire Booker qui proposait les mêmes résultats quant à la nature du centre métallique de l'enzyme et à son absolue nécessité pour l'activité enzymatique (Cicchillo R.M., 2005).

Mes objectifs de thèse ont été les suivants :

1. La caractérisation structurale et fonctionnelle de différentes quinolinate synthases.

Le premier des objectifs de ma thèse a été la purification ainsi que la caractérisation biochimique et spectroscopique de quinolinate synthases de différents organismes. La quinolinate synthase d'*Escherichia coli* dans le but de mettre au point au laboratoire des conditions d'analyses de l'activité enzymatique par HPLC permettant de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme ; ce que ne permettait pas le test enzymatique mis au point en 2005. La quinolinate synthase de *Mycobacterium tuberculosis* a été choisie pour la stratégie antibactérienne puisqu'en effet elle ne possède pas de voie de secours de biosynthèse du NAD fonctionnelle. L'enzyme de *Thermotoga maritima* a été choisie pour les tests de cristallisation en collaboration avec le LCCP à l'IBS de Grenoble, l'objectif principal étant l'obtention d'une structure tridimensionnelle de la quinolinate synthase sous forme métallée, c'est-à-dire avec son centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. En effet, l'étude de Sakubara H. avait rapporté la structure tridimensionnelle de la quinolinate synthase de *P. horikoshii* mais dépourvue de cofacteur métallique. La protéine SufE3 d'*Arabidopsis thaliana* a été choisie pour répondre à la question suivante : Est-ce que la quinolinate synthase d'organismes supérieurs possède les mêmes propriétés structurales et fonctionnelles que celles des organismes procaryotes ? D'après une analyse bioinformatique, cette dernière possède deux domaines, un domaine quinolinate synthase et un domaine SufE-like (protéine capable de transférer des atomes de

soufre d'une protéine à une autre) dont les fonctions à mon arrivée au laboratoire n'avaient pas été déterminées.

L'étude des quinolinate synthases issues de ces divers organismes devait également nous permettre de répondre à la controverse qui existait quant à la présence d'un centre [4Fe-4S] au sein de la quinolinate synthase et de sa nécessité pour l'activité. En effet, deux études rapportaient une activité quinolinate synthase pour les apoprotéines d'*E. coli* et de *P. horokoshii* (Sakubara H., 2005; Ceciliani F., 2000) alors que notre laboratoire et celui de Booker S. venaient de montrer que l'apoprotéine est inactive et que seule l'holoenzyme possède une activité enzymatique (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo RM., 2005).

La quinolinate synthase d'*E. coli* avait été caractérisée comme étant une protéine contenant un centre [4Fe-4S] essentiel à son activité. Un autre objectif au cours de mes recherches de thèse fut de mieux caractériser ce centre [4Fe-4S] notamment au niveau de l'identification des ligands et donc des acides aminés impliqués dans la coordination du centre fer-soufre. Nous avons notamment voulu déterminer si les cystéines proposées par Fridovich I. (Cys291, Cys294 et Cys297 chez *E. coli*), contenues dans le motif CXXCXXC, étaient effectivement les ligands du centre métallique (Gardner P.R., 1991a). Deux approches ont été choisies pour répondre à cette question. Une approche *in vitro* par mutagenèse dirigée et une approche *in vivo* par des études de complémentation d'une souche d'*E. coli* délétée au niveau du gène *nadA*, la souche MG1655 Δ *nadA*.

2. Recherche de molécules inhibitrices de l'activité quinolinate synthase.

Comme je l'ai déjà exposé dans mon introduction la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* se trouve être une bonne cible dans la recherche de nouveaux antibactériens puisqu'elle ne possède pas de voie de secours fonctionnelle. Un autre enjeu de mon travail de thèse a donc été la recherche de molécules ayant une action inhibitrice sur l'activité quinolinate synthase. Nous avons choisi de tester différentes familles de molécules, analogues des substrats de l'enzyme, d'intermédiaires réactionnels ainsi que du produit de la réaction, l'acide quinolinique.

3. Etude du mécanisme réactionnel de l'enzyme

Le dernier objectif majeur de mon étude a été de décortiquer le mécanisme au niveau moléculaire de la réaction catalysée par la quinolinate synthase. En effet, la quinolinate synthase catalyse la condensation du DHAP et de l'iminoaspartate pour former l'acide

quinolinique selon un mécanisme complexe non élucidé. Deux propositions de mécanismes ont été faites par Begley T.P. et Nasu S. (Begley T.P., 2001 ; Nasu S., 1982a). L'étude du mécanisme réactionnel de l'enzyme dans le cadre de ma thèse s'est articulée selon deux axes : le premier a été de trancher entre l'une ou l'autre des deux hypothèses de mécanismes avec notamment l'objectif de valider ou d'infirmer le fait que le Glycéraldéhyde 3-phosphate est un intermédiaire réactionnel (Begley T.P., 2001). Le second a été de comprendre le rôle du centre [4Fe-4S] dans l'activité puisque celui-ci est essentiel. En d'autres termes, déterminer si le centre [4Fe-4S] a un rôle dans la catalyse enzymatique, et si c'est le cas à quel niveau ; ou bien s'il est purement structural.

Matériels et Méthodes
(M&M)

I- Matériels Biologiques

I-1 Les ADN génomiques

- *Escherichia coli* : souche DH5 α
- *Thermotoga maritima* : souche DSMZ3109, don du Professeur Robert Huber, Université de Regensburg, Allemagne.

I-2 Les souches bactériennes

- *Escherichia coli* DH5 α

Ces bactéries ont le génotype suivant : *F- ϕ 80lacZ Δ M15 recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169*. Cette bactérie est utilisée pour la préparation de plasmides. D'une part, elle est déficiente en endonucléase I (*endA*) spécifique de l'ADN, ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

- *Escherichia coli* BL21(DE3)

Ces bactéries ont le génotype suivant : *F-ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm (DE3)*. Ce système est utilisé pour la surproduction de protéines dont les gènes sont sous la dépendance du promoteur du phage T7. L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour la T7 RNA polymérase. Il est sous contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG). Ces cellules ont été utilisées pour la surexpression de la protéine NadA de *Thermotoga maritima* et SufE3 (NadA) de *Arabidopsis thaliana*.

- *Escherichia coli* C43(DE3)

Ces bactéries sont dérivées de bactéries BL21(DE3). Elles contiennent également l'insert chromosomique DE3 et sont inductibles à l'IPTG. Elles sont souvent utilisées pour la surexpression de protéines toxiques ou peu solubles. Ces cellules ont été utilisées pour la surexpression des protéines NadB d'*E. coli*, NadA d'*E. coli* sauvage et mutée (cystéine \rightarrow alanine) ainsi que NadA de *Mycobacterium tuberculosis*.

✦ *Escherichia coli* MG1665 Δ nadA

Cette souche, dérivée de la souche K-12 a le génotype suivant : *F- lambda- ilvG- rfb- 50 rph-1* Δ nadA. Cette souche se caractérise par une inactivation du gène *nadA* par l'insertion d'une cassette Km, conférant une résistance de la souche à la kanamycine.

I-3 Les plasmides utilisés

✦ Plasmide pET-22b(+)

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Il possède également le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline grâce à l'expression de la β -lactamase. Les gènes *nadA* et *nadB* d'*E. coli* ont été clonés dans ce vecteur pET-22b+ aux sites de restriction [*NdeI-XhoI*]. Les plasmides obtenus sont notés respectivement **pET-NadA-Ec** et **pET-NadB-Ec**. Ils codent pour les protéines NadA et NadB d'*E. coli* comportant une étiquette polyhistidine en C-terminale.

✦ Plasmide pT7-7

Ce vecteur contient le gène codant pour une protéine de résistance à l'ampicilline (*bla*), le promoteur p_{T7} de l'ARN polymérase du bactériophage T7 et un site de clonage multiple renfermant 9 sites de restriction (Tabor S., 1985). Les sites de restriction *NdeI* et *HindIII* ont été utilisés pour le clonage du gène *nadA* d'*E. coli*. Ainsi le plasmide **pT7-NadA-Ec** code pour la protéine NadA comportant une séquence polyhistidine en N-terminal. L'insertion de la séquence polyhistidine a été réalisée à l'aide de deux oligonucléotides complémentaires qui, lorsqu'ils sont hybridés, forment une cassette contenant en 3' et 5' des extrémités compatibles avec un site *NdeI* digéré. Cette cassette a été utilisée pour effectuer la ligation dans le vecteur pT7 préalablement digéré par *NdeI*.

Ce plasmide pT7-NadA-Ec a servi de matrice pour l'obtention par PCR de *nadA* pour lequel certains résidus cystéines ont été mutés en alanines. Ces plasmides ont été nommés de la manière suivante **pT7-NadACxA** avec C pour cystéine, x sa position dans la séquence et A pour Alanine.

Nous avons utilisé ce même plasmide ne contenant pas de séquence polyhistidine pour effectuer le clonage de *nadA* de *T. maritima* aux sites de restriction [*NdeI-HindIII*], ce plasmide est nommé **pT7-NadA-Tm**.

➤ Plasmide pET-16b

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Il possède également le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline. Ce plasmide a été utilisé pour cloner *nadA* de *Mycobacterium tuberculosis* et s'appelle donc **pET-NadA-Mt**. Il permet l'expression de la protéine NadA de *M. tuberculosis* avec une séquence polyhistidine du côté N-terminal suivi d'un site de coupure par le Facteur Xa. Ce site de coupure peut être intéressant si on désire supprimer l'extension polyhistidine. Ce vecteur nous a été fourni par M. Rizzi (Département de Génétique et Microbiologie, Université de Pavia, Italie).

➤ Plasmide pBAD-Myc-HisB

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, le promoteur *araBAD*, inducible par le L-arabinose. Ce vecteur confère également une résistance à l'ampicilline. Le gène *sufE3* a été cloné dans ce vecteur aux sites de restriction [*XbaI-NcoI*]. Le plasmide obtenu, noté **pSufE3**, code pour la quinolinate synthase d'*Arabidopsis thaliana* avec une queue polyhistidine en C-terminal. L'appellation a priori particulière de ce plasmide (SufE et non NadA) sera expliquée dans le Chapitre I des Résultats.

I-4 Les milieux de culture

La composition des milieux de culture a été décrite précédemment (Sambrook J., 1989). Le milieu généralement utilisé pour les cultures bactériennes est le milieu riche LB (liquide et solide Luria Bertani). Le milieu LB contient 10 g/L de peptone tryptique de caséine, 5 g/L d'extraits de levure et 10 g/L de NaCl. Ce milieu a été obtenu chez AthenaES. Le milieu minimum M9 contient 6 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄ et 1 g/L de NH₄Cl. Il est enrichi par 2 mM de MgSO₄, 0.4 % de glucose, 0.2 mg/L de thiamine, 10 µM de CaCl₂, 2 mL/L de milieu LB et 20 à 40 µM de citrate de fer ou de FeCl₃.

II- Matériels Chimiques

Les différentes molécules chimiques testées comme potentiels inhibiteurs de NadA sont répertoriées dans les Tableaux 1, 2 et 3. Tous les produits non commerciaux nous ont été fournis par M. Thérisod (ICMMO, Orsay).

✚ Les analogues du DHAP

N°	Nom	Abréviation utilisée
	DiHydroxyAcétone Phosphate (Sigma) MM = 170,1 g/mol	DHAP
1	Acide PhosphoGlycoloHydroxamique MM = 353,39 g/mol	PGH
2	PhosphoGlycoloHydraZide MM = 368,41 g/mol	PGHz
3	Acide 3-amino-3-phosphonopropionohydroxamique MM = 283,26 g/mol	PmGH
4	Acide 3-phosphonopropionohydroxamique MM = 367,42 g/mol	PnGH
5	Phosphoglycoloamide MM = 353,39 g/mol	PGAm
6	Acide-3-phosphono-3-hydroxy-propiono-hydroxamique MM = 383,42 g/mol	PoGH
7	Acide glycolohydroxamique MM = 87 g/mol	GHA
8	Acide phosphoglycollique MM = 453 g/mol	PGA

Tableau 3 : Les molécules analogues du DHAP (en bleu).

➔ Analogues de l'iminoaspartate

N°	Nom	Abréviation utilisée
	IminoAspartate MM = 131,09 g/mol	IA
10	Acide Oxaloacétique (Sigma) MM = 132,07 g/mol	OAA
11	Acide hydroxybutanedioïque (ou D,L-Acide Malique) (Sigma) MM = 178,05 g/mol	MA

Tableau 4 : Les molécules analogues de l'iminoaspartate (en bleu).

➔ Analogues cycliques d'intermédiaires réactionnels ou du produit (acide quinolinique)

N°	Nom	Abréviation utilisée
	Acide quinolinique (Aldrich) MM = 167,12 g/mol	QA
12	Acide phtalique (Sigma-Aldrich) MM = 166,13 g/mol	PA
13	Acide 4-AminoPhtalique (Aldrich) MM = 181,15 g/mol	4-AP
14	Isoniazide (Isonicotinyl hydrazine) (Sigma) MM = 137,14 g/mol	INH
15	Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (Aldrich) MM = 168,15 g/mol	3,4-DHPAA
16	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (Sigma) MM = 154,12 g/mol	3,4-DHBA
17	Acide 3-hydroxypicolinique (Fluka) MM = 139,11 g/mol	3-HPA
18	2,3-Pyrazine dicarbamide (Sigma-Aldrich) MM = 166 g/mol	2,3-PDCM
19	2,3-Pyrazine dicarbonitrile (Sigma-Aldrich) MM = 130 g/mol	2,3-PDCN

20	Acide 2,3-pyrazine dicarboxylique (Sigma-Aldrich) MM = 168 g/mol	2,3-PDCA
21	Acide 4-Imidazole carboxylique (Aldrich) MM = 112,09 g/mol	5-ImA
22	Acide 4,5-imidazole dicarboxylique (Aldrich) MM = 156, 1 g/mol	4,5-ImDA

Tableau 5 : Les molécules analogues cycliques d'intermédiaires réactionnels ou de QA (en bleu).

III- Méthodes de Biologie Moléculaire

III-1-Transformation des souches *Escherichia coli*

III-1-1 Préparation de cellules compétentes

Toutes les étapes se déroulent stérilement. Pour rendre compétente la bactérie réceptrice, on utilise une technique permettant de perméabiliser les enveloppes bactériennes. Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de milieu LB jusqu'en phase exponentielle de croissance (absorbance à 600 nm~0.5). Après centrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C), les cellules sont reprises dans 5 mL de CaCl₂ 0.1 M et incubées 30 min dans la glace. Le traitement des cellules par des ions divalents tels que Ca²⁺ altère les structures membranaires en créant des microporations dans la bicouche lipidique, ce qui facilitera la transformation par un ADN exogène. Les cellules sont ensuite récoltées comme précédemment et reprises dans 0.7 mL de CaCl₂ 0.1 M, glycérol 10%. Les cellules rendues compétentes sont alors aliquotées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80 °C.

III-1-2 Transformation des cellules compétentes

100 µL de cellules compétentes sont incubées à 4 °C en présence de 20 ng à 50 ng de vecteur de surexpression pendant 30 min. Un choc thermique est réalisé à 42 °C pendant 2 min, ceci permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Après un bref retour dans la glace, on ajoute 0.5 mL de milieu LB, l'ensemble est placé 2 heures à 37 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite étalées sur boîte de pétri LB-Agar contenant l'antibiotique nécessaire à la

sélection des transformants (ampicilline 100 µg/mg). Les boîtes sont placées à 37 °C pendant 12 heures.

III-2 Préparation d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep® Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 mL de culture de cellules DH5α transformées avec le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN génomique est alors éliminé par centrifugation, et le surnageant déposé sur une colonne comportant une membrane constituée de gel de silice, permettant une adsorption sélective de l'ADN plasmidique, en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un Tampon de faible force ionique (eau ou Tampon EB : Tris 10 mM pH 8.5). L'ADN plasmidique purifié est stocké à -20 °C.

III-3 Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

III-3-1 Amplification de fragments d'ADN pour le clonage

L'amplification en chaîne par l'ADN polymérase (PCR) permet de synthétiser des fragments d'ADN situés entre deux portions de séquence connue. Elle s'effectue en utilisant deux oligonucléotides qui vont servir d'amorce (sens et antisens), une matrice d'ADN (dans notre cas l'ADN génomique d'*E. coli* ou de *T. maritima*) et une ADN polymérase thermorésistante (ici la Taq ou Pfu). La réaction consiste en une répétition de 3 étapes qui constituent un cycle de température : une étape de dénaturation (séparation des deux brins de l'ADN matrice), une étape d'hybridation (appariement des amorces à leur séquence complémentaire sur la matrice d'ADN) et une étape d'élongation (synthèse de l'ADN complémentaire par la polymérase).

La réaction de PCR de base employée pour amplifier les fragments d'ADN codant pour les deux gènes clonés est la suivante : pour un volume final de 50 µL, on ajoute dans un eppendorf 5 µM de chaque amorce (sens et antisens), 1 à 2 µL d'ADN matrice (50 ng) et 5 µL de Tampon de réaction 10x contenant des ions Mg²⁺ et l'eau ultrapure stérile en quantité suffisante pour atteindre 50 µL. L'ADN matrice est alors dénaturé 4 min, à 94 °C. On ajoute ensuite 2 µL de dNTP 10 mM et 5U de Taq polymérase dans le cas de l'amplification du gène d'*E. coli* et 5U de Pfu pour l'amplification du gène de *T. maritima*, puis 25 cycles de réactions de PCR sont effectués (voir Tableau 4) et la réaction est terminée par une étape d'élongation

de 10 min à 72 °C. Après vérification de l'amplification du gène désiré sur gel d'agarose, le produit de PCR est purifié selon le protocole indiqué paragraphe III-4. La PCR a été effectuée sur un appareil Robocycler gradient 40 (Stratagene).

Nom	Séquence des amorces (5' → 3')	Conditions de PCR Cycle dén./Hy./El.	ADN matrice
NadA-Ec-1	GTAAAACGAGATGGT <u>CATATG</u> AGCGTAATG (NdeI)	94°C, 30''/ 55°C, 1' / 72°C,	ADN génomique
NadA-Ec-2	CCCCCAA <u>AAGCTT</u> AACGTTACGCC (HindIII)	2'30	d' <i>E. coli</i>
NadA-Tm-1	GAGGAGGAAAA <u>CATATG</u> GGTGGATGAAATTC (NdeI)	94°C, 1' / 50°C, 1' / 72°C	ADN génomique
NadA-Tm-2	<u>AAGCTT</u> GAGGATTTCTCCATCATATC (HindIII)	2'30	de <i>T. maritima</i>

Tableau 6 : Conditions de PCR (Cycle dénaturation-hybridation et élongation (dén./Hy./El.)) et séquences des amorces utilisées pour le clonage du gène *nadA* d'*E. coli* et *T. maritima*. Les séquences soulignées représentant le site de coupure de l'enzyme de restriction, dont le nom est indiqué à côté de l'oligonucléotide entre parenthèses.

III-3-2 Amplification de plasmides entiers pour l'insertion de mutations dans le gène cloné.

L'insertion de mutations dans le gène *nadA* au niveau des résidus cystéines a été réalisée par mutagenèse dirigée suivant les recommandations proposées par Stratagene (Quick Change Site-Directed Mutagenesis). Selon cette technique, le plasmide pT7-NadA-Ec a servi de matrice pour l'amplification par PCR, à partir de 2 oligonucléotides contenant la mutation désirée (dans notre cas une cystéine en alanine), chacun étant complémentaire d'un des 2 brins d'ADN du plasmide pT7-NadA-Ec. La polymérase utilisée est la Pfu ultra (Stratagene), capable de synthétiser des brins d'ADN de grande taille (jusqu'à 9 kb). Après PCR (réalisée selon les conditions rapportées dans le Tableau 5), le produit de la réaction est ensuite digéré par l'endonucléase DpnI qui coupe spécifiquement les ADN méthylés et qui va donc seulement digérer le plasmide parental ne comportant pas la mutation.

Etape 1	94 °C, 30 sec	
Etape 2	94 °C, 30 sec	} x18
	55 °C, 1 min 68 °C, 5 min	
Etape 3	68°C, 10 min	

Tableau 7 : Conditions d'amplification par PCR.

Matériels et Méthodes (M&M)

Six simples mutants (pT7-NadAC113A, pT7-NadAC119A, pT7-NadAC200A, pT7-NadAC291A, pT7-NadAC294A, pT7-NadAC297A), cinq doubles mutants (pT7-NadAC291A-C294A, pT7-NadAC294A-C297A, pT7-NadAC113A-C200A, pT7-NadAC200A-C297A, pT7-NadAC113A-C297A) et un triple mutant (pT7-NadAC291A-C294A-C297A) de la protéine NadA ont été construits selon cette technique.

Les doubles mutants pT7-NadAC113A-C200A, pT7-NadAC200A-C297A, pT7-NadAC113A-C297A ont été construits en utilisant les plasmides matrices contenant déjà une simple mutation et les amorces correspondantes pour introduire la deuxième. Ainsi pour le double mutant pT7-NadAC113A-C200A, la matrice a été le plasmide pT7-NadAC113A et les amorces NadAC200A-1, NadAC200A-2. Pour pT7-NadAC200A-C297A, la matrice a été le plasmide pT7-NadAC200A et les amorces NadA C297A-1 et NadA C297A-2. Enfin pour le plasmide pT7-NadAC113A-C297A, la matrice a été le plasmide pT7-NadAC113A et les amorces NadA C297A-1 et NadA C297A-2.

La séquence des amorces utilisées pour construire les différents mutants ainsi que les conditions de réaction sont listées respectivement dans les Tableaux 6 et 7.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
NadA C113A-1	CTTCAGGCTGAA <u>GCT</u> CACTGGATCTC
NadA C113A-2	GAGATCAGTGA <u>AGCT</u> TTCAGCCTGAAG
NadA C119A-1	GAATGTTCACTGGATCTCGGC <u>GCCC</u> TGTTGAAGAATTTAAC
NadA C119A-2	GTAAATTCTTCAACAGGG <u>GCGCC</u> GAGATCCAGTGAACATTC
NadA C200A-1	GCTGGCAGGGTGCC <u>GCT</u> ATTGTGCATGATG
NadA C200A-2	CATCATGCACAAT <u>AGCGGC</u> ACCCTGCCAGC
NadA C291A-1	GGTGAGGGTGCAACCG <u>GCCC</u> GCAGCTGCGCGCATTG
NadA C291A-2	CAATGCGCGCAGCTGCGGG <u>GCG</u> GTTGCACCCTCACC
NadA C294A-1	GCAACCTGCCGCAGCG <u>GCCG</u> CGCATTGTCCGTGG
NadA C294A-2	CCACGGACAATGCGC <u>GCG</u> GCTGCGGCAGGTTGC
NadA C297A-1	CGCAGCTGCGCGCAT <u>GCT</u> CCTGGATGGCCATG
NadA C297A-2	CATGGCCATCCACGG <u>AGCAT</u> GCGCGCAGCTGCG
NadAC291A-C294A-1	GGTGAGGGTGCAACCG <u>GCCC</u> GCAGCG <u>GCCG</u> CGCATTGTCCGTGG
NadAC291A-C294A-2	CCACGGACAATGCGC <u>GCGG</u> GCTGCGGG <u>GCG</u> GTTGCACCCTCACC
NadAC294A-C297A-1	GCAACCTGCCGCAGCG <u>GCCG</u> CGCAT <u>GCT</u> CCTGGATGGCCATG
NadAC294A-C297A-2	CATGGCCATCCACGG <u>AGCAT</u> GCGC <u>GCG</u> GCTGCGGCAGGTTGC
NadA C291A-C294A-C297A-1	GGTGAGGGTGCAACCG <u>GCCC</u> GCAGCG <u>GCCG</u> CGCAT <u>GCT</u> CCTGGATGGCCATG
NadA C291A-C294A-C297A-1	CATGGCCATCCACGG <u>AGCAT</u> GCGC <u>GCG</u> GCTGCGGG <u>GCG</u> GTTGCACCCTCACC

Tableau 8 : Amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée sur le gène *nadA*. Les bases mutées sont indiquées en gras. Les codons soulignés codent pour une alanine.

Réactifs	Quantités
Plasmide matrice	10 ng
Amorce 1	125 ng
Amorce 2	125 ng
dNTPs	1 mM
Tampon	1x
PfuTurbo DNA polymérase	5U
Eau stérile	qsp 50 µL

Tableau 9 : Mélanges réactionnels effectués pour l'amplification du plasmide contenant le gène de *nadA* simplement, doublement ou triplement muté.

Après une analyse sur gel d'agarose afin de vérifier la bonne amplification du gène, le matériel biologique est utilisé pour transformer des bactéries DH5 α . L'ADN plasmidique contenant à priori la mutation est extrait et purifié. Il est ensuite séquencé par la société Génome express, (Meylan, France) afin de vérifier la présence de la mutation ainsi que l'intégrité de la séquence du gène muté.

III-4 Purification d'ADN

Les fragments d'ADN, issus d'une amplification par PCR ou d'une digestion doivent être purifiés afin d'éliminer tout ce qui pourrait gêner les réactions suivantes (les amorces, les nucléotides ainsi que l'ADN polymérase thermostable ou encore les enzymes de restriction). La purification s'effectue en utilisant le High Pure PCR Purification kit (Roche Diagnostics). La solution d'ADN est mise en présence de sel chaotrope de thiocyanate de guanidine et déposée dans un tube contenant un filtre High Pure constitué d'une matrice de verre. L'ADN ainsi lié est purifié par des étapes successives de lavages et de centrifugation puis élué avec un Tampon de faible force ionique.

III-5 Analyse d'ADN sur gel d'agarose

L'ADN obtenu après l'amplification par PCR pour un clonage ou une mutagenèse dirigée est analysé (digéré ou non par les enzymes de restriction adéquates) par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Un volume de Tampon de charge (0.25 % de bleu de bromophénol, 2.25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN. Le mélange est déposé sur gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille allant de 250 à 10000 pb (Fermentas). Après migration sous une tension de 135 V dans du Tampon TAE (Tris 20 mM, acétate 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8.3) pendant 20 minutes environ, le gel est

plongé dans une solution de bromure d'éthydiuim (BET) afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous lumière UV ($\lambda=260$ nm). La comparaison avec les marqueurs de taille permet de déterminer la taille approximative du fragment d'ADN étudié.

III-6 Clonage

III-6-1 Préparation du fragment d'ADN

i- Préparation du fragment d'ADN obtenu par PCR

Après analyse sur gel d'agarose, les fragments d'ADN amplifiés sont purifiés (paragraphe III-4). Ils sont alors soumis à une double digestion par les enzymes de restriction appropriées puis de nouveau purifiés (selon paragraphe III-4).

ii- Préparation du plasmide

Les sites de restriction du fragment d'ADN à cloner ont été choisis pour correspondre à ceux des différents plasmides utilisés (pT7-7 avec ou sans extension polyhistidine). Le plasmide est digéré dans les mêmes conditions que le brin d'ADN à insérer.

iii- La ligation

Le vecteur et l'insert, en proportion 1 : 0 (vol : vol) (témoin), et différents essais compris entre 1 vecteur pour 3 à 8 inserts, sont incubés sur la nuit à 18 °C dans un volume final de 20 μ L en présence de 2 μ L de Tampon de ligation 10x et de 2 μ L d'ADN ligase du phage T4 (Fermentas). Une fois la réaction accomplie, la totalité du mélange sert à transformer 100 μ L de bactéries DH5 α compétentes. Le contenu plasmidique des transformants est extrait ; purifié (kit QIAprep® Miniprep) puis analysé sur gel d'agarose (paragraphe III-5) après digestion par les enzymes de restriction adéquates. L'authenticité du fragment inséré est confirmée par séquençage (Génome express S.A. Meylan) sur un clone positif.

IV- Méthodes de Biochimie

IV-1 La surexpression des protéines

Les souches *E. coli* BL21(DE3) ou *E. coli* C43(DE3) sont transformées par l'un des plasmides **pET-NadA-Ec**, **pET-NadB-Ec**, **pT7-NadA-Ec sauvage et mutants**, **pT7-NadA-Tm**, **pET-NadA-Mt** suivant la protéine à surexprimer. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar, contenant 100 mg/L d'ampicilline. Une colonie isolée sur boîte de Pétri est alors mise en culture dans 100 mL de milieu LB additionné d'ampicilline (concentration finale = 100 µg/mL). Après une incubation d'une nuit à 37 °C, sous agitation (180 rpm), cette préculture sert à inoculer à 1.5 % 5L de milieu LB/ampicilline et la culture se poursuit à 37 °C. Lorsque la densité optique à 600 nm des cultures atteint 0,5 l'expression des protéines NadA ou NadB est induite par ajout d'une solution d'IPTG (concentration finale = 0.5 mM). Après 3 heures d'induction à 37 °C, les culots bactériens sont récupérés par centrifugation à 4000 rpm, à froid, lavés avec le Tampon A (Tris-HCl 100 mM pH=7,5) et conservés à – 80 °C.

Lorsque la protéine NadA doit être produite en vue de la réalisation d'une étude Mössbauer, les bactéries sont cultivées en milieu M9 enrichi contenant 34 µM de ⁵⁷FeCl₃ (préparé par dissolution à chaud (de l'ordre de 100 °C) de ⁵⁷Fe par un mélange équimolaire d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique). Le ⁵⁷Fe est ajouté au moment de l'induction de l'expression des protéines par l'IPTG.

IV-2 Préparation d'extraits cellulaires

IV-2-1 Par cycles congélation-décongélation

Les culots bactériens obtenus à partir des cultures sont décongelés et remis en suspension dans le Tampon d'extraction B (Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 50 mM, PMSF 1 mM). La lyse cellulaire est réalisée à l'aide de lysozyme (0.6 mg/mL), que l'on laisse agir 30 min sous agitation à froid. Le lysozyme lyse les membranes en dégradant le peptidoglycane les constituant. Pour compléter la lyse cellulaire, des cycles de congélation (rapide) et décongélation (lente) (3 au total) sont effectués. L'ADN est digéré par la benzonucléase (250 U/µL) (Novagen).

IV-2-2 Par sonication

Les cellules servant à surexprimer la protéine NadB sont reprises dans le Tampon B, puis traitées aux ultrasons (10 cycles de 10 secondes, puissance 70 %).

Les bactéries lysées par la première technique ou par sonication sont ensuite centrifugées à 45000 rpm, pendant 1h30 à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant correspondant aux extraits protéiques solubles est prélevé et placé à 4 °C.

IV-3 Purification des protéines

Toutes les étapes de purification de la protéine NadA sauvage et mutée d'*E. coli*, NadA de *M. tuberculosis* et NadA de *A. thaliana* sont effectuées en conditions d'anaérobiose afin de préserver l'intégrité du centre métallique. Seule la protéine NadA de *T. maritima* subit un traitement particulier et est purifiée à l'air. La protéine NadB est également purifiée à l'air.

IV-3-1 Purification des protéines NadA sauvage et mutée d'*E. coli*, NadA de *M. tuberculosis*, NadA de *A. thaliana* ainsi que NadB d'*E. coli*

✦ *Colonne d'affinité, Ni-NTA*

Les extraits protéiques obtenus contenant la protéine d'intérêt sont chargés sur une colonne Nickel - Acide Nitrilo Triacétique (Ni-NTA) (Qiagen) maintenue à 4 °C et équilibrée avec le Tampon C (Tris-HCl 100 mM pH=7.5, NaCl 50 mM). Cette étape chromatographique permet une purification aisée des protéines possédant une étiquette polyhistidine. Après un lavage de la colonne avec le Tampon C, la protéine est éluée avec le Tampon D (Tris-HCl 100 mM pH 7.5 NaCl 50 mM, imidazole 160 mM). L'imidazole est éliminé après une étape de dessalage sur une colonne NAP-25 (Pharmacia), préalablement équilibrée avec du Tampon C. Les fractions récupérées sont ensuite analysées pour leur degré de pureté sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

✦ *Colonne d'exclusion stérique Superdex-200 : Détermination de l'état d'oligomérisation de la protéine NadA.*

L'utilisation de cette colonne nous a permis l'analyse de l'état d'oligomérisation de la protéine NadA sauvage ainsi que des différents mutants. Le principe de cette chromatographie est de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire. Le fractionnement de la Superdex-200 analytique 10/300 GL (GE Healthcare life science, 10 x 300 mm, 24 mL) est

Matériels et Méthodes (M&M)

situé entre 10 kDa et 600 kDa. Une calibration de la colonne a été effectuée avec des protéines dont la masse moléculaire est connue (Aldolase 158 kDa, Albumine 67 kDa, Ovalbumine 43 kDa, Chymotrypsinogène 25 kDa, Ribonucléase 13,7 kDa). La colonne est équilibrée avec un Tampon E (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 100 mM) à 0.5 mL/min et 100 µL des différentes enzymes NadA sauvage ou mutée (200 µM) ont été chargées sur cette colonne et éluées au même débit. L'analyse a été effectuée en anaérobiose.

IV-3-2 Purification de la protéine NadA de *Thermotoga maritima*

Toutes les étapes ont été effectuées à l'air. Le surnageant contenant les protéines solubles est traité avec 3 % (en poids) de streptomycine sulfate ainsi que 1 % (vol) de PEI (Polyéthylène Imine) pendant 30 minutes à 4 °C sous agitation. Après centrifugation 30 minutes à 10 000 rpm, les extraits débarrassés de l'ADN sont chauffés 15 minutes à 75 °C.

Après centrifugation (30 minutes, 10 000 rpm), le surnageant est traité par 60 % (en poids) de sulfate d'ammonium pendant 30 minutes à 4 °C. Après centrifugation (30 minutes, 10 000 rpm), le culot est repris dans du Tampon C puis déposé sur une colonne de Butyl Sépharose 16/10 (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le Tampon C contenant du sulfate d'ammonium 1 M. La protéine est éluee par un gradient croissant (0 à 100 %) de Tampon C.

IV-4 Reconstitution chimique du cluster [Fe-S] de la quinolinate synthase de *T. maritima*

Ce traitement est effectué en anaérobiose. La solution protéique (1 mL entre 5 et 10 mg/mL) est d'abord incubée avec du dithiothréitol (DTT) 5 mM pendant 5 minutes. Ce traitement permet la réduction d'éventuels ponts disulfure présents dans la protéine. Pendant ce temps, une solution aqueuse de sulfure de sodium (Na₂S) 50 mM ainsi qu'une solution aqueuse de Fer(II) 50 mM (sel de Mohr [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂]) sont préparées. La reconstitution s'effectue ensuite en ajoutant à la solution protéique 5 excès molaires de S²⁻ en une fois, puis, progressivement, 5 excès molaires de Fe(II). La solution brunit instantanément, après une incubation de 2 heures à 20 °C la solution est centrifugée 1 min à 10 000 rpm pour éliminer un éventuel dépôt, l'excès de Fe(II) et de soufre est éliminé en réalisant une colonne de filtration NAP-25 préalablement équilibrée avec du Tampon F (Tris-HCl 200 mM pH 8, KCl 50 mM). Cette préparation est alors chargée sur une colonne Superdex-200 équilibrée avec du Tampon F. La protéine, éluee sous forme monomérique, séparée des oligomères est récupérée. Un spectre UV-visible est alors enregistré entre 250 nm et 800 nm. La protéine

colorée (marron foncé) est alors concentrée sur microcon 30 K (Amicon), puis aliquotée avant d'être congelée à -80 °C.

IV-5 Préparation de l'apoprotéine

Les quinolinate synthases (à l'exception de celle de *T. maritima*) sont purifiées avec leur centre métallique [Fe-S]. Afin d'évaluer l'importance de ce dernier dans l'activité de l'enzyme, nous avons préparé l'enzyme sous la forme d'apoprotéine. Ceci est réalisé en incubant la protéine (en conditions d'aérobiose) avec un excès de dithiothreitol (DTT) (10 mM) et d'EDTA (15 mM) pendant quelques heures à température ambiante. L'enzyme est ensuite purifiée sur colonne NAP-10 (Pharmacia) afin d'éliminer le complexe Fe-EDTA et le soufre. L'absence de [Fe-S] est vérifiée par dosage du fer et du soufre de la protéine ainsi que par spectroscopie UV-visible.

IV-6 Reconstitution de la protéine NadB avec du FAD

NadB est une enzyme à cofacteur FAD. Au cours de sa purification, elle perd majoritairement ce cofacteur, d'où la nécessité de reconstituer l'enzyme. Ceci est réalisé par incubation de l'enzyme en présence de 10 excès molaires de FAD (Sigma) ; après 2 heures à température ambiante l'excès de FAD est éliminé par passage du mélange sur une colonne NAP-10. Le nombre de molécules de FAD par protéine est déterminé par lecture de l'absorbance à 450 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{450\text{nm}}$ de $11\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

IV-7 Mesure d'activités enzymatiques

IV-7-1 Mesure de l'activité Quinolinate synthase (NadA) *in vitro*

Le test d'activité se déroule sous atmosphère anaérobie.

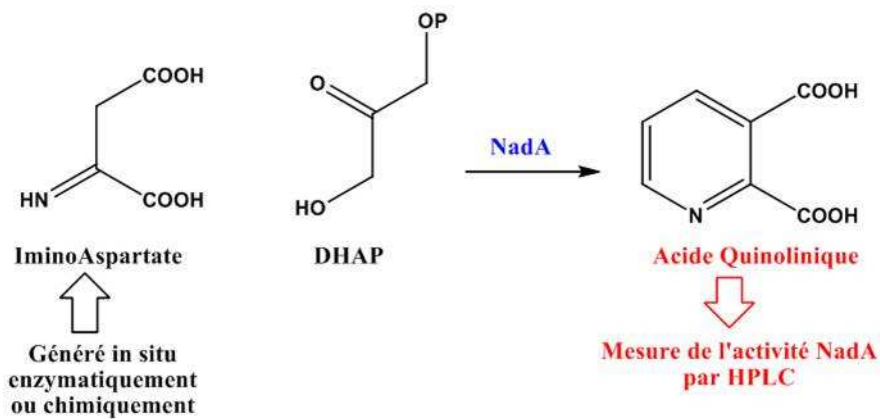


Figure 34 : Réaction catalysée par l'enzyme NadA : les différents substrats (Iminoaspartate et DHAP) et le produit de l'enzyme, l'acide quinolinique, témoin de l'activité NadA détecté par HPLC.

La quinolinolate synthase possède deux substrats : le DHAP et l'iminoaspartate. L'iminoaspartate est un substrat instable (temps de demi-vie = 144 s). Il est donc nécessaire de le générer *in vitro* au moment du test enzymatique. Pour ceci, nous avons utilisé deux techniques. Une génération enzymatique à partir du L-Aspartate avec l'utilisation de la L-Aspartate oxydase (NadB) et une génération chimique par réaction du sulfate d'ammonium (AS) avec de l'acide oxaloacétique (OAA) (Nasu S., 1981).

i- Génération enzymatique d'iminoaspartate

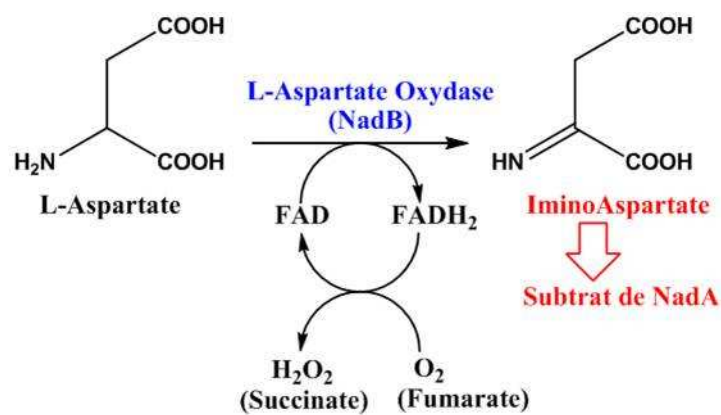


Figure 35 : Réaction catalysée par NadB.

In vivo, la production enzymatique d'iminoaspartate est réalisée par la L-Aspartate oxydase (NadB), qui transforme le L-Aspartate en iminoaspartate. Dans le test *in vitro*, on ajoute la L-Aspartate oxydase (NadB) en quantité stœchiométrique par rapport à NadA. Le substrat de NadB, le L-Aspartate (Acros Organics) est introduit en large excès. Lors de la

formation d'iminoaspartate, le FAD est réduit en FADH₂. En conditions d'aérobiose, c'est l'oxygène qui régénère le FAD (Figure 35). En conditions d'anaérobiose correspondant à nos conditions de tests, nous ajoutons comme accepteur d'électrons le fumarate (Sigma) en excès qui va permettre la régénération du FAD et donc la production en continu d'iminoaspartate. Ainsi notre milieu réactionnel comprend dans un volume final de 100 µL de Tampon G (Hepes-Na 50 mM pH 7.5, KCl 100 mM), du DHAP 2 mM, du L-aspartate 33 mM, du fumarate 25 mM et NadA à 7.1 µM. Ce mélange est préincubé 5 minutes à 37 °C et la réaction est initiée par l'ajout de NadB à 7.1 µM puis laissée 20 minutes à 37 °C.

ii- Génération chimique d'iminoaspartate

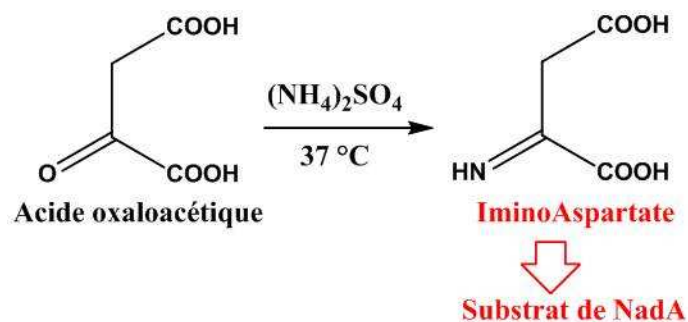


Figure 36 : Réaction entre l'acide oxaloacétique et le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) conduisant à la formation d'iminoaspartate.

La seconde technique permettant de générer l'iminoaspartate est une méthode chimique, qui utilise le mélange d'acide oxaloacétique (OAA) et de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). Cette technique a été décrite par Nasu S. en 1981. Au milieu réactionnel comprenant dans un volume final de 100 µL de Tampon G, du DHAP à 2 mM et NadA à 7.1 µM, préincubés 5 minutes à 37 °C, on ajoute pour initier la réaction un mélange acide oxaloacétique 5 mM et (NH₄)₂SO₄ 10 mM, correspondant aux conditions optimales déterminées par Nasu S. pour avoir une activité NadA maximale (Nasu S., 1981). La réaction se poursuit pendant 20 minutes à 37 °C.

L'arrêt et l'analyse du test enzymatique sont réalisés de la même façon pour les deux méthodes de préparation d'iminoaspartate : par précipitation des protéines en ajoutant 5 µL d'acide sulfurique 2 M. Après centrifugation 15 minutes à 15 000 rpm, 50 µL de surnageant sont ajoutés à 50 µL d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (TFA 0.03 %, pH 2.4). 50 µL de cette solution sont injectés sur une colonne HPLC Tosoh TSK Gel ODS-120T (4.6 mm x 15 cm) équilibrée avec le même Tampon TFA. L'appareil utilisé est une HPLC

Agilent 1100 équipée d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes. La chromatographie est réalisée à un débit de 0.5 mL/min et l'élution effectuée par l'utilisation d'un gradient linéaire de 0 à 100% d'acétonitrile et ce sur une durée de 20 minutes. L'acide quinolinique (qui possède un maximum d'absorbance à 273 nm), est détecté par lecture de l'absorbance à 260 nm et est élué à 10.2 minutes. Une gamme d'étalonnage est réalisée en injectant dans les mêmes conditions des quantités croissantes d'acide quinolinique commercial (Aldrich). La détermination de l'aire des pics est réalisée automatiquement par le logiciel.

IV-7-2 Mesure de l'activité Quinolate synthase (NadA) *in vivo* par test de complémentation

✦ *Principe*

Les tests de complémentation (*in vivo*) sont réalisés avec la souche MG1655 Δ *nadA* d'*E. coli*. Cette souche ne contient pas le gène codant pour la quinolate synthase et ne peut donc pas pousser sur milieu minimum M9 sans acide nicotinique (NA). Le principe de ce test est de compléter cette souche en introduisant un plasmide codant pour la quinolate synthase, soit sauvage (contrôle), soit mutée au niveau d'un de ses acides aminés (dans notre cas une cystéine est mutée en alanine) et de regarder sa croissance en milieu minimum M9 supplémenté ou non par de l'acide nicotinique.

✦ *Mise en œuvre*

Les cellules MG1655 Δ *nadA* sont rendues compétentes selon la technique rapportée dans le paragraphe I-1 puis transformées avec les différents plasmides pT7-NadA sauvage ou pT7-NadA mutée. Après le choc thermique à 42 °C, les bactéries sont centrifugées 1 min à 5 000 rpm, reprises dans 60 μ L de milieu M9 et 15 μ L sont étalées sur une moitié de 3 types de boîtes de pétri : une boîte LB contenant deux antibiotiques (ampicilline et kanamycine), deux boîtes M9 complétementées avec du glucose 0.4 %, de la caséine 0.1 %, Thiamine 0.0001 %, MgCl₂ 2 mM et de la kanamycine dont l'une contient de l'acide nicotinique à 12.5 μ g/mL, l'autre n'en contenant pas. Sur l'autre moitié de ces mêmes boîtes sont étalées des bactéries MG1655 Δ *nadA* non transformées. Les boîtes sont mises à 37 °C sur la nuit. L'expérience est résumée dans la Figure 37.

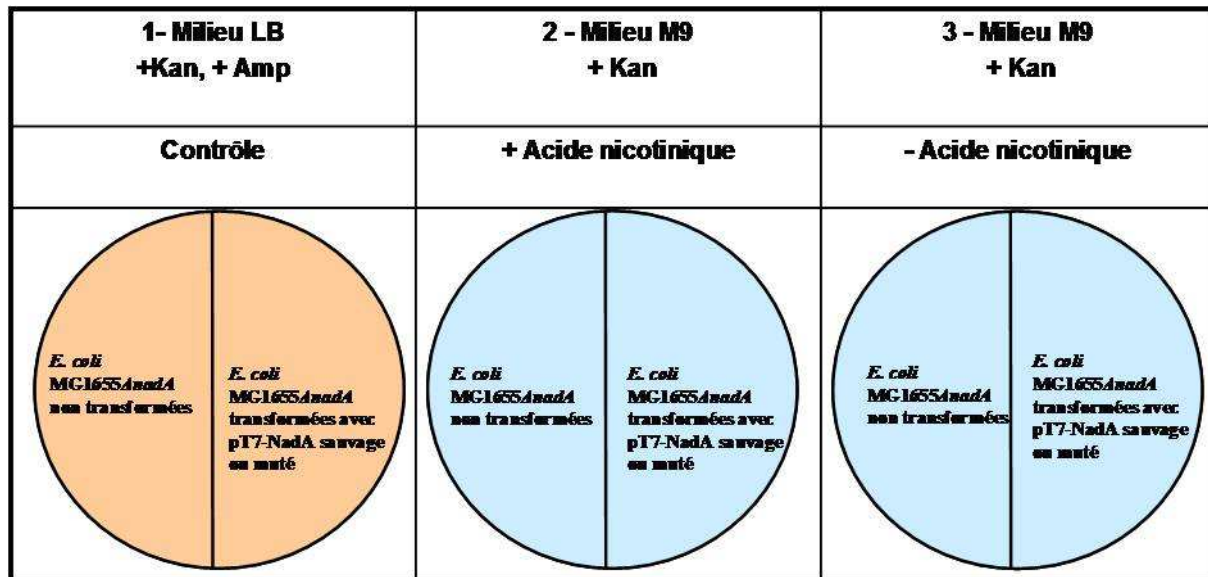


Figure 37 : Schéma des différentes conditions utilisées pour le test de complémentation.

- 1- La première boîte constitue un témoin de transformation avec une résistance à l'ampicilline et à la kanamycine.
- 2- La deuxième boîte, sur milieu minimum avec de l'acide nicotinique permet de vérifier que les bactéries complémentées ou pas, donc avec ou sans NadA, sont capables de pousser en utilisant directement l'acide nicotinique via leur voie de biosynthèse de secours du NAD (cette voie de secours est exposée dans l'introduction).
- 3- La troisième boîte constitue le test à proprement dit avec l'étude de la croissance des bactéries complémentées en absence d'acide nicotinique. Les bactéries transformées qui poussent sont celles qui sont capables de synthétiser du NAD via leur voie de biosynthèse principale «*de novo*» c'est-à-dire celles comportant une quinolinate synthase fonctionnelle.

IV-7-3 Mesure de l'activité L-Aspartate Oxydase (NadB) : suivi de la réduction du cytochrome c

✦ Principe

La L-Aspartate oxydase (NadB) oxyde le L-Aspartate en Iminoaspartate et elle utilise pour se faire un cofacteur : la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). Le FAD est régénéré en condition d'aérobiose par l'oxygène et dans les conditions d'anaérobiose du test d'activité NadA par le fumarate. Afin de doser l'activité de NadB de façon colorimétrique, nous avons utilisé un autre accepteur d'électrons : le cytochrome c. Le cytochrome c est une petite

protéine soluble (12 kDa) constituant de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle contient un hème c qui est un dérivé de la ferro-protoporphyrine IX. Il existe sous deux états redox : un état oxydé de couleur jaune pâle (quasi incolore) et un état réduit à un électron de couleur orange qui absorbe dans l'UV-visible. Connaissant l'épsilon à 550 nm du cytochrome c réduit qui est égal à $22.60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, on peut directement relier l'absorbance à 550 nm à la quantité de cytochrome c réduit, elle-même directement proportionnelle à la quantité d'iminoaspartate produit et donc à la quantité de L-Aspartate transformée. En fait, il faut deux cytochromes c réduits pour un FAD réoxydé et ceci pour un L-Aspartate transformé. Donc la quantité de cytochrome c mesurée est égale à la quantité de L-Aspartate transformée divisée par deux.

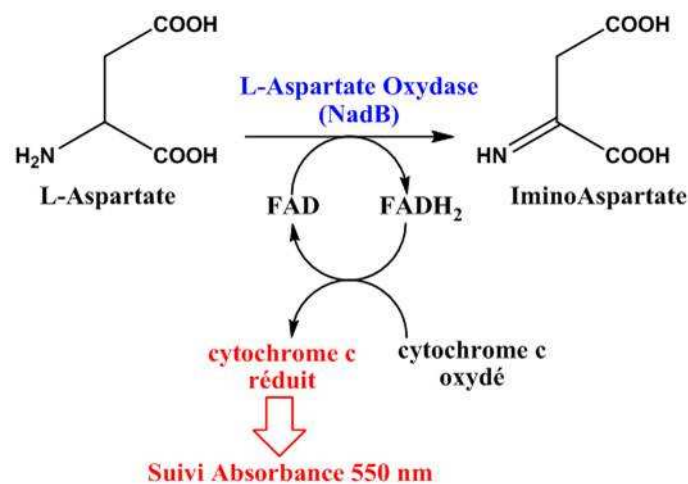


Figure 38 : Schéma du test enzymatique utilisé pour mesurer l'activité L-Aspartate oxydase grâce au cytochrome c comme accepteur d'électron.

✦ *Mise en œuvre*

Dans un volume final de 100 μL de Tampon G, un mélange comprenant du cytochrome c (Acros organics) et du L-Aspartate est effectué aux concentrations indiquées dans le Tableau 8.

Mélange réactionnel
NadB 15 μM
cytochrome c 100 μM
L-Aspartate 1 mM
Tampon G(Hepès-Na 50 mM pH 7.5, KCl 100 mM)

Tableau 10 : Conditions utilisées lors de la mesure de l'activité L-Aspartate oxydase (NadB).

Le mélange est mis dans une cuve de 100 μL , la réaction est initiée par l'ajout de NadB à 15 μM . On suit en fonction du temps à température ambiante l'augmentation de l'absorbance à 550 nm correspondant à la quantité de cytochrome c sous sa forme réduite.

IV-7-4 Mesure de l'activité Glycérophosphate déshydrogénase (GPDH)

➤ *Principe*

La glycérophosphate déshydrogénase (GPDH) est une enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides. Elle convertit le DHAP en glycérol-3-phosphate en oxydant le NADH en NAD^+ selon la Figure 39. L'activité GPDH est déterminée en suivant en UV-visible la diminution de l'absorbance à 340 nm correspondant à la consommation du NADH.



Figure 39 : Schéma du test enzymatique utilisé pour mesurer l'activité glycérophosphate déshydrogénase.

➤ *Mise en œuvre*

Dans un volume final de 100 μL de Tampon G, un mélange comprenant du NADH, du DHAP est effectué et la réaction est initiée par l'ajout de la glycérophosphate déshydrogénase (Type X, de muscle de lapin, Sigma). Les concentrations utilisées pour le test sont celles indiquées dans le Tableau 9. Le suivi de la diminution d'absorbance à 340 nm (avec un $\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) correspond à la consommation de NADH dont la concentration est directement proportionnelle à la quantité de DHAP présent dans le milieu réactionnel au moment de la mesure.

Mélange réactionnel
NADH (150 µM)
DHAP (100 µM)
GPDH (0,25 µM)
Tampon G (Hepès-Na 50 mM)
pH 7.5, KCl 100 mM)

Tableau 11 : Conditions utilisées lors de la mesure de l'activité glycérophosphate déshydrogénase.

IV-7-5 Mesure de l'activité Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase (GAPD)

➤ *Principe*

La glycéraldéhyde-3P déshydrogénase (GAPD) est une enzyme de la glycolyse qui catalyse l'oxydation et la phosphorylation du glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate. Grâce au suivi de la réduction du NAD^+ en NADH par mesure de l'absorbance à 340 nm, on va pouvoir doser la quantité de glycéraldéhyde-3-phosphate dans le milieu réactionnel.

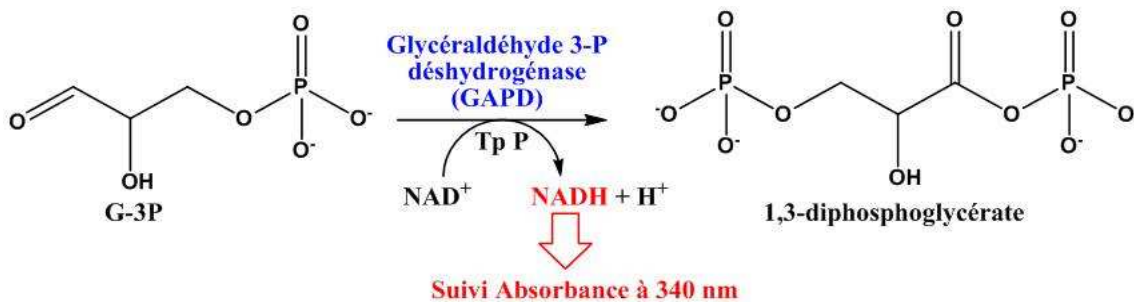


Figure 40 : Schéma du test enzymatique utilisé pour mesurer l'activité glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase. Ce test est réalisé dans un Tampon phosphate (Tp P) permettant l'apport du phosphate nécessaire à la formation du 1,3-diphosphoglycérate.

➤ *Mise en œuvre*

Dans un volume final de 100 µL de Tampon P, un mélange comprenant du NAD^+ et du G-3P est effectué et la réaction est initiée par ajout de la glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase (érythrocyte humain, Sigma). Les concentrations utilisées sont indiquées dans le Tableau 10 ci-dessous. Le suivi de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm correspond à la quantité de glycéraldéhyde-3P dans le mélange réactionnel au moment de la mesure.

Mélange réactionnel
NAD ⁺ (1 mM)
G-3P (100 μM)
GAPD (0.3 μM)
Tampon P (Na ₂ HPO ₄ 50 mM, Triéthanolamine 40 mM, EDTA 0.2 mM)

Tableau 12 : Conditions utilisées lors de la mesure de l'activité glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase.

IV-8 Dosage des ponts disulfure dans NadA par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH)

Le dosage des ponts disulfures est réalisé en utilisant le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH). La thiorédoxine réductase (Trr) est une enzyme à FAD, elle fait partie de la famille des oxydoréductases. Elle est capable de réduire la thiorédoxine (Trx), (un petit peptide redox) au niveau de sa séquence CX₂C. Le potentiel redox de la thiorédoxine est relativement bas ($E^0 = -270$ mV) ceci lui permet de réduire à son tour efficacement les ponts disulfures d'autres protéines dans la cellule (Mustacich D., 2000).

➤ Principe

Dans un premier temps, la thiorédoxine va être réduite à deux électrons par le Nicotinamide Adénine Dinucléotide monophosphate (NADPH) via l'action de la thiorédoxine réductase. La thiorédoxine réduite va alors pouvoir à son tour réduire le pont disulfure d'une protéine (si celle-ci en possède) comme schématisé Figure 41. La quantité de NADPH consommé correspond à la quantité de pont disulfure présent dans la protéine (Padovani D., 2001).

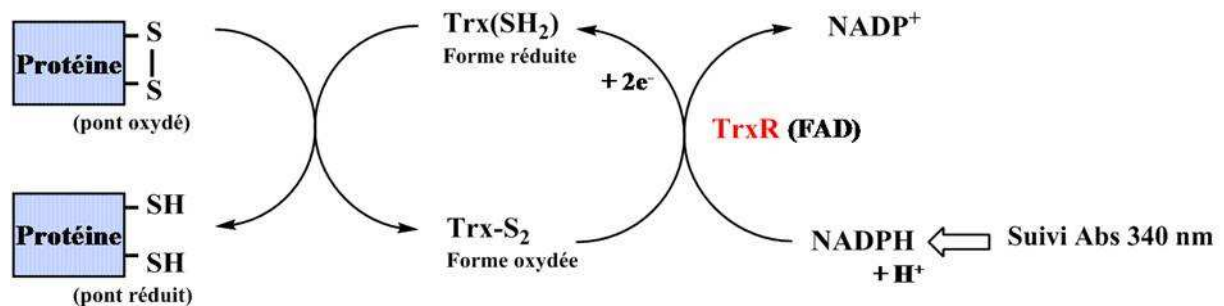


Figure 41 : Schéma du dosage des ponts disulfure par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. TrxR=Thiorédoxine Réductase, Trx = Thiorédoxine, Protéine = Protéine possédant un pont disulfure.

➤ *Mise en œuvre*

La quinolinolate synthase sauvage et mutée (NadAC291A, NadAC294A, NadAC291A-C294A) (145 μM) est incubée en anaérobiose dans un volume final de 100 μL de Tampon H (Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM) avec la thiorédoxine (1 μM) et du NADPH (0.3 mM). Après stabilisation en UV-visible de l'absorbance à 340 nm, la réaction est initiée par ajout de la thiorédoxine réductase (0.23 μM). La diminution d'absorbance à 340 nm correspondant à la consommation de NADPH est suivie sur une échelle de temps de l'heure. Sachant que le coefficient d'extinction molaire du NADPH est égal à $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, on calcule selon la loi de Beer-Lambert la quantité de NADPH consommée ($[\text{NADPH}] = \Delta A_{340\text{nm}} / \epsilon (\text{NADPH})$). Cette quantité est directement proportionnelle à la quantité de pont disulfure réduit dans la protéine d'intérêt. La thiorédoxine réductase ainsi que la thiorédoxine nous ont été fournies par le Dr. E. Mulliez, directeur de recherche au laboratoire.

IV-9 Réduction des ponts disulfure par le dithiothréitol (DTT)

Le DTT est un dithiol réducteur fréquemment utilisé pour réduire les ponts disulfure de façon chimique, ou plus généralement utilisé pour maintenir les cystéines des protéines à l'état réduit sous forme de thiolate.

➤ *Principe*

Un pont disulfure est réduit par le DTT selon le schéma ci-dessous via la formation d'un cycle à six du DTT comprenant un pont disulfure interne.

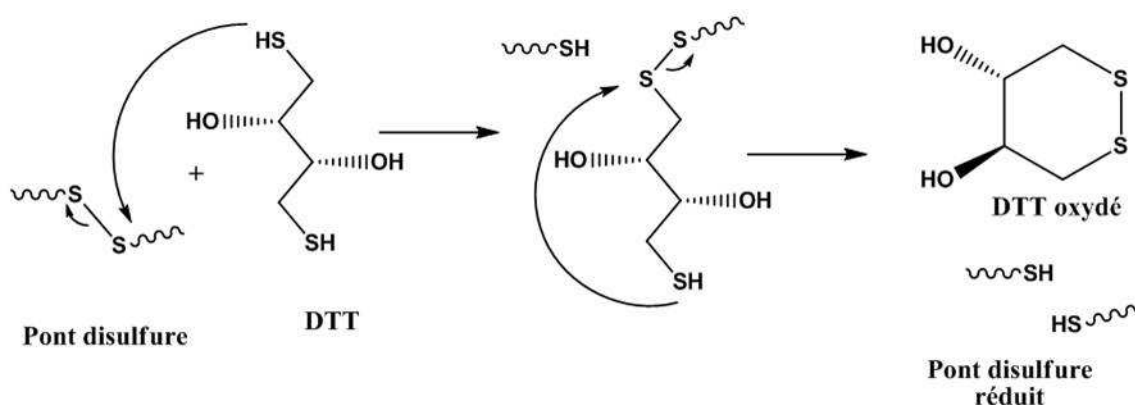


Figure 42 : Réduction d'un pont disulfure par le dithiothréitol (DTT)

✦ *Mise en œuvre*

La quinolinate synthase est incubée en présence de différentes quantités de DTT (Euromédex) (0 à 50 mM) pendant une heure dans une boîte à gants. L'excès de DTT (gênant l'analyse HPLC), est éliminé par passage sur une colonne de dessalage Microbiospin (Biorad). La réduction de pont(s) disulfure(s) dans NadA est vérifiée par le test utilisant le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. L'activité de l'enzyme NadA après ce traitement, c'est-à-dire ne possédant plus de ponts disulfures, est déterminée dans les conditions du paragraphe IV-7-1-i.

IV-10 Analyses Biochimiques

IV-10-1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford M.M., 1976), à l'aide de la solution commerciale « Biorad Protein Assay » (Biorad). Cette technique est fondée sur le changement de coloration à 595 nm du bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant aux protéines. La concentration d'un échantillon est donc déterminée par simple lecture de l'absorbance à 595 nm dont la valeur est comparée avec celles obtenues à partir d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (BSA) de concentration connue et constituant la droite d'étalonnage.

IV-10-2 Dosage des protéines par dosage des acides aminés

✦ *Principe*

Cette technique mise au point en 1958 par Moore et Stein consiste en la séparation et de quantification des acides aminés ayant réagi avec la ninhydrine. Elle permet une détermination précise de la concentration d'une protéine grâce à sa concentration en acides aminés (Moore S., 1958).

✦ *Mise en œuvre*

L'analyse a été réalisée par J-P. Andrieu (LEM, IBS Grenoble) sur un séquenceur (Applied Biosystems) instrument Biochron 30. Une solution protéique de concentration connue (entre 1 et 5 nmoles) mesurée par la méthode de Bradford et dont la DO à 280 nm a également été mesurée par UV-visible, est soumise à différents traitements. Le premier est l'hydrolyse de l'ensemble des liaisons peptidiques par un traitement à l'HCl 6 M à 110 °C

pendant une nuit, le mélange d'acides aminés est ensuite chargé sur une colonne échangeuse de cations. Les acides aminés sont élués par des Tampons de pH et force ionique variables. En sortie de colonne, les acides aminés subissent un traitement à la ninhydrine, le passage dans un serpentin à haute température permet la formation d'un même composé coloré appelé dérivé pourpre de Ruhemann issu de la réaction de la fonction ammoniac des acides aminés avec la ninhydrine. La mesure de l'absorbance à deux longueurs d'onde (570 nm et 440 nm) permet l'identification et la quantification de chaque acide aminé. L'analyse des acides aminés est une technique comparative nécessitant l'utilisation d'un standard interne. Cette analyse doit être effectuée sur un échantillon pur. Quelques limitations liées à l'analyse existent également comme la destruction des tryptophanes et la mauvaise hydrolyse de certaines liaisons peptidiques (Ile-Val, Leu-Ile ou Leu-Val) lors de l'hydrolyse acide. Ces résidus sont systématiquement éliminés lors l'analyse des résultats. Par cette méthode, on détermine précisément la concentration en protéine que l'on peut comparer à celle obtenue par le dosage de Bradford et ainsi en tirer un facteur correctif. Par cette méthode on peut également par comparaison avec la DO à 280 nm déterminer un epsilon $\epsilon_{280\text{nm}}$, ce qui permet par la suite la détermination de la concentration en protéine d'une solution donnée par simple mesure de la DO à 280 nm par UV-visible.

IV-10-3 Electrophorèse des protéines : SDS-PAGE

✦ *Principe*

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées dans un champ électrique.

✦ *Mise en œuvre*

L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes : 5 à 20 μg de protéines sont dénaturées par chauffage à 100 °C dans du Tampon de dénaturation (Tris-HCl 1M pH=6.8, SDS 10 %, glycérol 15 %, BBP 2 %, β -mercaptoéthanol 2 %). Le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure, ôtant ainsi la structure tridimensionnelle native aux protéines, alors que le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent qui rompt les interactions inter et intra-protéiques et qui se fixe sur les protéines en les chargeant négativement. La charge propre de chaque protéine devient ainsi négligeable. Les protéines migrent donc selon leur poids moléculaire et non leur charge.

Les échantillons protéiques dénaturés sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. La concentration en polyacrylamide dépend de la masse

des protéines d'intérêt : plus elles sont petites, plus le gel devra être concentré. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de séparation surmonté d'un gel de concentration. Ce dernier permet une migration homogène des protéines qui vont donc se tasser au sommet du gel de séparation, afin de garantir la pénétration simultanée de toutes les protéines de l'échantillon dans ce gel. Les protéines vont ensuite migrer lors du passage d'un courant électrique de 200 V et 35 mA pendant environ 60 minutes. Le gel joue un rôle de tamis moléculaire, séparant les protéines selon leur masse. La masse apparente des protéines est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines de poids moléculaire connu. Les bandes correspondant aux protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0.25 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %, glycérol 10 %) puis décoloration dans une solution méthanol 30 %, acide acétique 10 %, glycérol 5 %.

IV-10-4 Dosage du fer

✦ *Principe*

Le dosage du fer est effectué selon une variante de la méthode de Fish (Fish W.W., 1988). Une gamme d'étalonnage est tout d'abord réalisée afin de pouvoir déterminer ensuite la quantité de fer présente dans un échantillon protéique.

✦ *Gamme d'étalonnage*

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de Fe(II) commerciale (Aldrich), dont la concentration est ajustée à 500 μM . Ainsi, 1 μL de cette solution contient 0.5 nmole de fer. Des eppendorfs contenant différentes quantités de fer sont préparés comme décrit dans le Tableau 9, en ajustant le volume à 65 μL avec de l'eau.

nmoles de Fe^{2+}	solution de Fe^{2+} à 500 μM (μL)	eau (μL)
0	0	65
2	4	61
4	8	57
6	12	53
8	16	49
10	20	45

Tableau 13 : Gamme étalon pour le dosage du fer dans les protéines.

Chaque étalon est alors traité de la façon suivante :

- 45 μL d'acide perchlorique (PCA) sont ajoutés et la solution est mélangée énergiquement.

Matériels et Méthodes (M&M)

- Les tubes sont laissés 15 minutes à température ambiante. A 90 µl de chacun des échantillons sont ajoutés :
- 72 µl de bathophénantroline disulfate à 1.7 mg/ml. Il s'agit d'un chélateur de fer.
- 36 µl d'ascorbate de sodium à 38 mg/ml. Ce produit est un réducteur qui permet de mettre tout le fer présent en solution sous forme de Fe(II).
- 27 µl d'acétate d'ammonium saturé (dilué 3 fois). La solution est agitée vigoureusement. Une couleur rose apparaît immédiatement, mais on laisse la réaction se poursuivre pendant 30 minutes à température ambiante. En effet, l'acétate d'ammonium neutralise le milieu. Dans cette gamme de pH, le complexe formé entre le fer et la bathophénantroline est rose. La couleur de la solution est plus ou moins prononcée selon la quantité de fer présente dans l'échantillon.

La mesure de l'absorbance à 535-680 nm est effectuée pour chaque échantillon. La gamme d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 535-680 nm en fonction du nombre de nanomoles de fer.

✚ *Echantillon protéique*

Des échantillons de concentration connue en protéine et ayant un volume final de 65 µl sont préparés. 45 µl de PCA sont ajoutés, ce qui provoque la dénaturation des protéines. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions sont centrifugées à 10000 rpm pendant 5 minutes, afin d'éliminer les protéines précipitées. 90 µl du surnageant sont récupérés puis traités de la même façon que les étalons. La lecture de l'absorbance à 535-680 nm permet de déterminer la quantité de fer présente dans la protéine.

IV-10-5 Dosage du soufre

✚ *Principe*

Le soufre a été dosé selon la méthode colorimétrique décrite par Beinert (Beinert H., 1983).

✚ *Gamme d'étalonnage*

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de sulfure de sodium (Na₂S) dont la concentration est ajustée à 200 µM. Des échantillons contenant des quantités déterminées de sulfure (0-10 nmoles) sont préparés comme décrit dans le Tableau 10, en ajustant le volume à 100 µL avec de l'eau.

nmoles de S²⁻	solution de Na₂S à 200 μM (μL)	eau (μL)
0	0	100
1	5	95
5	25	75
10	50	50
20	100	0

Tableau 14 : Gamme étalon pour le dosage de soufre dans les protéines.

Chaque tube est alors traité de la façon suivante :

- 300 μL d'acétate de zinc [Zn(OAc)₂, H₂O] à 1% (solution à 100 mg/mL diluée au 1/10^{ème}) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 15 μL de soude (NaOH) 3N. La solution est mélangée vigoureusement. Cette procédure permet d'éviter la perte de soufre sous forme de H₂S qui se produit lors de l'acidification du milieu par ajout de Zn(OAc)₂. Le mélange est laissé à température ambiante entre 5 et 10 minutes.

- Ensuite, 75 μL de DiMéthyl Phénylène Diamine (DMPD) 0,01% (solution à 1 mg/mL dans HCl 5N) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 16 μL d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃) à 23 mM (37.5 mg dans 10 mL HCl 1,2 N). De même que précédemment la solution est mélangée énergiquement. Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 30 minutes. Une coloration bleue apparaît. Elle correspond à la formation du bleu de méthylène, obtenu par réaction des ions sulfures S²⁻ avec le DMPD en milieu oxydant. Cette coloration est plus ou moins prononcée suivant la quantité de soufre présente dans l'échantillon.

- Chaque tube est alors centrifugé (10000 rpm, 5 minutes) et l'absorbance à 670 nm mesurée. La gamme d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 670 nm en fonction du nombre de nanomoles de soufre.

➤ *Echantillons protéiques*

De la même façon, l'ensemble des réactifs cités précédemment est ajouté à 100 μL d'une solution protéique de concentration connue. Dans ce cas, l'incubation de l'échantillon avec le DMPD et le chlorure de fer est réalisée à froid (4 °C) pendant 3 heures. Le reste du dosage est identique. La mesure de l'absorbance à 670 nm permet de déterminer la quantité de soufre initialement présente dans la protéine.

V- Tests de croissance de différentes mycobactéries en présence de molécules chimiques

Test de réduction de la résazurine

Le test de réduction de la résazurine a été mis au point afin de détecter la résistance de *M. tuberculosis* aux agents antituberculeux.

✦ *Principe*

La résazurine est un colorant indicateur redox. Un changement du bleu au rose indique la réduction de la résazurine. La réduction de la résazurine est le résultat d'une croissance bactérienne. Donc si la molécule inhibe la croissance bactérienne, la solution reste bleue. Au contraire si la molécule n'a aucun effet, les bactéries poussent et la solution vire alors au rose.

✦ *Mise en œuvre*

Cette méthode mise au point par Palomino (Palomino J.C., 2002) est une méthode simple, peu coûteuse et efficace de détection de la croissance des mycobactéries. Les tests sont réalisés en plaques 96 puits. Différentes dilutions des molécules à tester sont effectuées dans le milieu de culture des mycobactéries. Les contrôles positifs de l'inhibition de croissance sont l'isoniazide et la rifampicine, des dilutions de ces molécules sont donc également effectuées (1.0 à 0.03 µg/ml pour l'isoniazide et 2.0 à 0.06 µg/ml pour la rifampicine). L'inoculum préparé est ajouté dans chacun des puits. Les plaques sont scellées avec une feuille plastique. Après une semaine d'incubation à 37 °C, 30 µl de solution de résazurine sont ajoutés dans chaque puits et laissée incuber une nuit à 37 °C, à la suite de quoi on peut voir s'il y a changement de couleur ou pas et donc croissance ou inhibition bactérienne. La concentration minimale d'inhibition (CMI) d'une molécule est définie comme la concentration à laquelle le changement de couleur n'a plus lieu. Ces tests ont été réalisés par S. Cole (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse).

VI- Techniques physico-chimiques - Méthodes analytiques

VI-1 Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse

✦ *Principe :*

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) en phase inverse est une technique de séparation analytique ou préparative de molécules en fonction de leur hydrophobicité. L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Ceci a pour conséquence l'emploi d'une pompe à haute pression afin de pousser la phase mobile dans la colonne avec un débit d'écoulement élevé. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants du mélange par rapport à une chromatographie liquide classique, et la fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation. La combinaison de ces attributs : rapidité et résolution élevées, conduit à l'appellation « haute performance ». La phase stationnaire contient dans notre cas de la silice greffée par des chaînes alkyles de 18 atomes de carbones (C18). Les composants du mélange y sont plus ou moins retenus en fonction de leur polarité. Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier, ce qui est caractéristique de la chromatographie en phase inverse. Le système HPLC (Agilent HP1100) est équipé d'un échantillonneur automatique permettant de programmer jusqu'à 100 injections. Les échantillons à analyser sont déposés dans des vials, le chargement sur la colonne est réalisé par robot par l'intermédiaire d'une seringue. Un détecteur UV à barrette de diodes est utilisé en sortie de colonne de façon à enregistrer un chromatogramme HPLC représentant l'absorption UV-visible à une longueur d'onde choisie (pour notre analyse 260 nm) en fonction du temps de rétention. Un intégrateur est utilisé pour calculer l'aire sous les pics. Couplée à l'injection d'échantillons de concentrations connues, l'HPLC peut alors être quantitative.

VI-2 La spectroscopie d'absorption UV-visible

✦ *Principe :*

L'absorption d'un photon peut permettre à une molécule ou un atome de passer de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 , par passage d'un électron d'une orbitale à une autre. L'énergie d'un photon absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donnée par la relation $e = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon ($\nu = c/\lambda$ avec

λ correspondant à la longueur d'onde). En solution, seules les transitions électroniques de faible énergie sont observables, c'est-à-dire les bandes d'absorption dans l'ultraviolet proche et dans le visible. Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde du maximum d'absorption, λ_{\max} , et par son intensité, donnée par la valeur du coefficient d'extinction molaire (ϵ) à la longueur d'onde considérée. Ces grandeurs sont reliées à la concentration du soluté en solution par la loi de Beer-Lambert $A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.[C]$ où A est l'absorption, l la longueur du trajet optique et $[C]$ la concentration.

✦ *Informations obtenues :*

Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques (certains acides aminés, flavines,...) et celles qui contiennent un métal de transition. Ainsi, le pic d'absorption à 280 nm observé pour les solutions protéiques correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique (tryptophane, tyrosine et phénylalanine). Dans le cas des protéines [Fe-S], le transfert de charge du soufre vers le fer(III) provoque une absorption entre 300 et 600 nm. Cette valeur varie en fonction du type d'agrégat fer-soufre et même si ces bandes d'absorption sont relativement larges, la position de leur maximum ainsi que la forme générale du spectre fournissent des renseignements sur la nature du centre [Fe-S].

✦ *Mise en œuvre :*

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm ou 1 mm de trajet optique. Les études en aérobiose ont été réalisées avec un spectrophotomètre Cary1 Bio (Varian), et les spectres en conditions anaérobies ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur de la boîte à gants.

VI-3 La spectroscopie Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

➤ *Principe :*

La spectroscopie RPE permet d'étudier les espèces dites paramagnétiques qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés. L'entité paramagnétique est placée dans un champ magnétique H variable et reçoit une onde électromagnétique d'énergie $h\nu$. Lorsque l'énergie $h\nu$ de l'onde est égale à l'énergie nécessaire pour permettre la transition entre deux états de spin de l'électron, il se produit le phénomène de résonance paramagnétique électronique. L'énergie de transition est égale à $g\beta H$, où g correspond au facteur de Landé ($g_e = 2.0023$ pour l'électron libre) et β au magnéton de Bohr. L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire possède un facteur g dont la valeur diffère de celle de g_e en fonction du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire. Le facteur g est anisotrope, ce qui signifie qu'il est assimilable à une grandeur tensorielle définie par trois composantes g_x , g_y et g_z . Ces trois composantes correspondent aux points d'inflexions et à l'extremum du spectre d'absorption enregistré au cours du balayage des valeurs du champ magnétique. En fait, le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption pour laquelle la détermination des valeurs de g est plus précise.

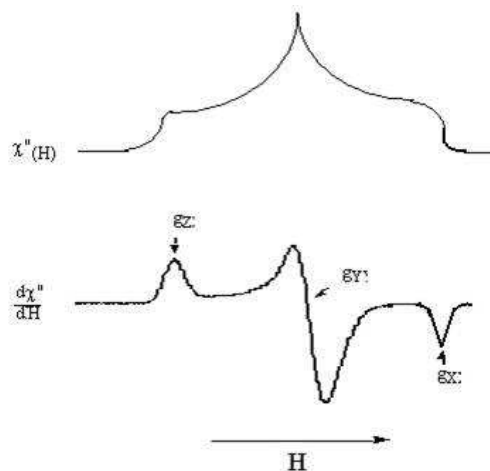


Figure 43 : Signal d'absorption χ'' et sa dérivée $d\chi''/dH$ obtenus en faisant varier le champ H . La dérivée du signal d'absorption permet de déterminer les grandeurs tensorielles g_x , g_y et g_z qui sont caractéristiques du centre paramagnétique étudié.

➤ *Informations obtenues :*

Appliquée à l'étude des centres [Fe-S] paramagnétique (les centres diamagnétiques ne sont pas observables), la RPE nous informe sur le type de centre, son état rédox et le nombre de centre [Fe-S] au sein d'une protéine puisque le signal peut être doublement intégré et la

valeur de l'intégration comparée à celle d'une solution standard de Cu-EDTA concentration connue, dont la préparation est décrite ci-dessous.

✦ *Mise en œuvre :*

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons de 200 μL de protéine à une concentration d'environ 150 μM , préparés et congelés dans une boîte à gants. Les échantillons protéiques ont été réduits avec du dithionite (Riedel-de-Haën) 1 mM et la réduction est suivie par spectroscopie UV-visible. Les spectres RPE ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP 300E à température variable équipé d'un cryostat (Oxford Instruments) qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide. Les quantifications du signal des centres [Fe-S] ont été réalisées par comparaison avec les valeurs obtenues pour une solution standard de Cu-EDTA à 1 mM.

✦ *Préparation du tube standard Cu-EDTA :*

Une solution de Cu^{2+} à 10 mM est d'abord préparée par dissolution de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dans un Tampon I (Tris 0.1 mM pH 8). Cette solution est ensuite diluée au dixième dans le même Tampon, et 10 équivalents d'EDTA sont ajoutés. La solution finale, congelée dans un tube RPE contient donc 1 mM de Cu(II) complexé par l'EDTA dans du Tampon I.

V-4 La spectroscopie Hyscore

✦ *Principe et préparation*

La spectroscopie HYSORE (pour HYperfine Sublevel CORRElation spectroscopy) est une technique de RPE pulsée à deux dimensions. Cette spectroscopie à deux dimensions permet de voir des couplages entre certains noyaux et le spin étudié, dans notre cas, avec les atomes de Fe du centre [Fe-S] de NadA.

En effet, l'Hyscore est une méthode de choix pour détecter les couplages hyperfins de certains noyaux avec les moments gyromagnétiques faibles dans les systèmes non orientés. Les interactions hyperfines sont le résultat de couplage entre le spin électronique et le spin nucléaire s'il est non nul.

La principale caractéristique de la technique Hyscore est de pouvoir voir des transitions normalement interdites et discriminer différents types de noyaux : les couplages forts et faibles, et les noyaux « distants », caractérisés par des constantes hyperfines très faibles.

Le spectre HYSORE est composé de deux quadrants. Sur la diagonale du quadrant nommé (+,+), on trouve ces noyaux « distants », tandis qu'hors des diagonales des quadrants (-,+) et (+,+), on trouve respectivement les couplages forts et faibles. Un exemple de spectre Hyscore est représenté Figure 44.

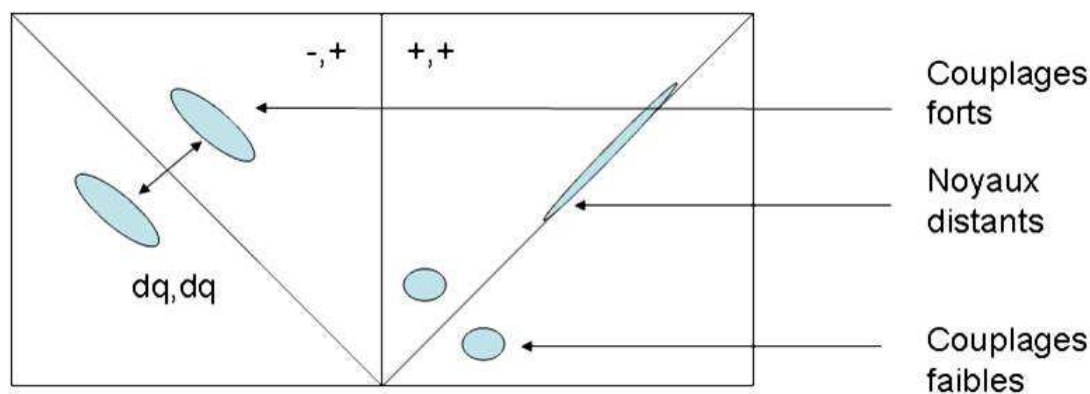


Figure 44 : Exemple de spectre Hyscore.

Par conséquent, un atome d'azote coordonné à un centre [Fe-S] par exemple, est facilement détectable à la faveur d'un couplage fort de son spin nucléaire ($I = 1$) avec l'électron non apparié du centre [Fe-S], même chose pour un atome de phosphore dont le spin nucléaire est égal à ($I=1/2$).

Après calcul d'une constante de couplage hyperfin et comparaison avec la littérature, il est possible de déterminer la nature du noyau couplé avec le centre métallique.

✦ Mise en œuvre

Les mesures sont effectuées sur des échantillons de 200 μL de NadA à une concentration d'environ 150 μM réduits par 1 mM de dithionite en présence de 10 équivalents de molécules inhibitrices (PGH, PGHz et Imidazole) pour les études rapportées dans le Chapitre II des Résultats, ou 10 excès de DHAP pour celle du Chapitre III des Résultats. Le tube est préparé et congelé en boîte à gants. Les expériences d'Hyscore ont été effectuées en collaboration avec le Service de Chimie Inorganique et Biologique du CEA Grenoble par Serge Gambarelli sur un spectromètre en bande X pulse elexsys E-580 de Bruker, avec un résonateur diélectrique Bruker ER4118X et un cryostat à flux continu d'Hélium (Oxford Instrument CF935) contrôlé par un contrôleur de température ITC 503 de chez Oxford Instruments.

V-5 La spectroscopie Mössbauer

➤ Principe

La spectroscopie Mössbauer ou spectroscopie d'absorption γ est l'étude de l'absorption nucléaire résonante de rayons γ par certains noyaux. Ce phénomène se produit lorsqu'un photon γ , émis par un noyau émetteur lors de la désexcitation de ce noyau (qui passe donc d'un niveau excité E_e à l'état fondamental E_f) est absorbé par un noyau identique se trouvant dans l'état fondamental. Le noyau absorbant est alors excité au niveau d'énergie E_e . Dans notre cas, la source de rayonnement γ est obtenue par désintégration radioactive de l'isotope $^{57}\text{Co}^*$. Celui-ci se convertit lentement par capture électronique en un état excité noté $^{57}\text{Fe}^*$. Dans un délai de l'ordre de la microseconde, le $^{57}\text{Fe}^*$ revient à l'état fondamental par l'émission d'une radiation électromagnétique de haute fréquence dans la région des énergies γ .

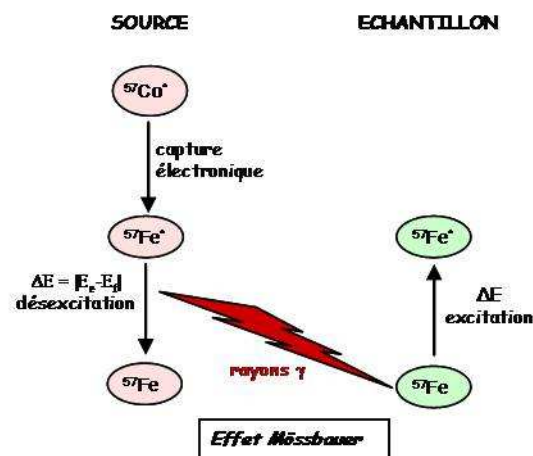


Figure 45 : Principe de l'effet Mössbauer

Si les noyaux de l'échantillon se trouvent dans un environnement différent de celui de la source, la modification de l'environnement électronique des noyaux produit un effet suffisant sur les niveaux d'énergie nucléaires pour que l'absorption n'ait plus lieu. Pour rétablir la résonance, la fréquence des rayons γ doit être modifiée. Cette variation est obtenue en déplaçant la source à une vitesse relative v par rapport à l'absorbant. Ceci conduit à un balayage approprié du spectre de fréquences γ susceptibles d'être captées par l'échantillon absorbant. C'est le principe de l'effet Doppler. En spectroscopie Mössbauer, les énergies sont donc exprimées en unités de vitesse et les vitesses requises sont généralement de l'ordre du

mm/s. Ainsi, les spectres Mössbauer indiquent la transmission relative des rayons γ ayant traversé l'échantillon en fonction de la vitesse relative de la source par rapport à l'absorbant. En spectroscopie Mössbauer, l'absorption des rayons γ est caractérisée par trois paramètres. Ceux-ci correspondent à différentes interactions hyperfines qui sont dues aux perturbations créées par l'environnement du noyau absorbant.

✦ *L'interaction monopolaire électrique : paramètre de déplacement isomérique δ*

Le noyau absorbant se trouvant dans un environnement différent de celui de la source, le pic d'absorption est décalé par rapport à la raie d'émission d'une quantité δ (exprimé en mm/s) appelée déplacement isomérique. δ provient de l'existence d'interactions entre la distribution de charge nucléaire supposée sphérique et la densité de charge électronique contenue dans le volume nucléaire. δ reflète donc la structure électronique et fournit par conséquent des informations sur l'état d'oxydation, le degré de covalence et la nature des ligands de l'atome absorbant (ici le ^{57}Fe).

✦ *L'interaction quadripolaire électrique : paramètre d'éclatement quadripolaire ΔE_q*

Cette interaction est due à l'asymétrie de la distribution de charges qui entoure le noyau, créant un gradient de champ électrique. Le noyau dans un état de spin $I > 1/2$ possède un moment quadripolaire électrique Q . L'interaction de ce dernier avec le gradient de champ électrique (appelée interaction quadripolaire électrique) provoque une levée de dégénérescence de l'état excité, conduisant à deux niveaux séparés de ΔE_q , défini comme l'éclatement quadripolaire exprimé en mm/s. Ce paramètre reflète la symétrie de la distribution électronique autour du noyau considéré.

✦ *L'interaction dipolaire électrique : paramètre de champ magnétique effectif ΔE_m*

Pour l'étude de nos échantillons, ce paramètre n'intervient pas. Toutefois, il est intéressant de noter qu'une interaction peut exister entre le moment magnétique nucléaire du noyau résonant avec le champ magnétique créé par l'environnement électronique du noyau auquel peut s'ajouter une induction magnétique extérieure. Elle renseigne sur la cristallinité du solide étudié.

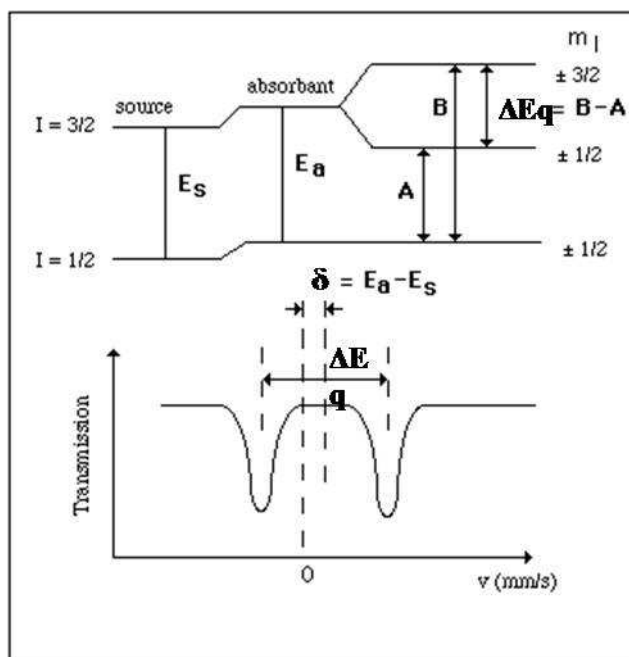


Figure 46 : Déplacement isomérique δ et éclatement quadripolaire ΔE_Q des composés du ^{57}Fe , schématisation des spectres Mössbauer résultants.

➤ *Mise en œuvre*

L'échantillon protéique est préparé en boîte à gants. La solution protéique doit être assez concentrée (soit environ 1 mM en fer) dans un volume de 400 μL . Elle est alors congelée dans une cellule adaptée en boîte à gants et l'analyse est effectuée par Yiannis Sanakis (NCSR Demokritos, Institute of Materials Science, Ag. Paraskevi, Attiki, Grèce).

V-6 Dosage des métaux par ICP-MS

➤ *Principe*

L'ICP-MS (Inductively coupled Plasma Mass Spectroscopy) est une technique de spectroscopie qui utilise le fait que des ions peuvent être séparés les uns des autres par application de champs électromagnétiques, en fonction de leur masse atomique, de leur charge électrique et de leur vitesse. L'ICP-MS permet de doser en routine la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de 1 $\mu\text{g/L}$. Ce dosage a été réalisé sur la protéine NadA purifiée en collaboration avec Josiane Arnaud (CHU, Grenoble).

Liste des Tampons

Tampon A	(Tris-HCl 100 mM, pH 7.5)
Tampon B	(Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, PMSF 1 mM)
Tampon C	(Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM)
Tampon D	(Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, Imidazole 160 mM)
Tampon E	(Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM)
Tampon F	(Tris-HCl 200 mM, pH 8, KCl 100 mM)
Tampon G	(Hepes-Na 50 mM, pH 7.5, KCl 100 mM)
Tampon H	(Tris-HCl 100 mM, pH 8, KCl 50 mM)
Tampon I	(Tris-HCl 0.1 mM, pH 8)
Tampon P	(Na ₂ HPO ₄ 50 mM, Triéthanolamine 40 mM, EDTA 0.2 mM)
Tampon EB	(Tris-HCl 10 mM, pH 8.5)
Tampon de dénaturation	(Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 10 %, glycérol 15 %, BBP 2 %, β mercaptoéthanol 2 %)
Tampon TAE	(Tris-HCl 20 mM, Acétate 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.3)

Résultats

Chapitre I

*Caractérisation
biochimique et
fonctionnelle de
quinolinate synthases de
différents microorganismes*

Dans ce chapitre, j'expose la purification et la caractérisation biochimique, spectroscopique et fonctionnelle des quinolinate synthases de différents organismes.

La **quinolinate synthase d'*E. coli*** constitue un modèle d'étude. La protéine avait été caractérisée avant mon arrivée au laboratoire en 2005, je m'en suis servie pour la mise au point d'un nouveau test enzymatique ainsi que lors des tests d'inhibition à l'aide de diverses molécules (Chapitre II des Résultats). Cette enzyme a également été utilisée pour l'identification des ligands du centre [4Fe-4S] (Ce Chapitre I des Résultats) ainsi que pour l'étude du mécanisme réactionnel (Chapitre III des Résultats).

La **quinolinate synthase de *M. tuberculosis*** constitue la cible d'intérêt pour le développement d'antibactériens, nous l'avons utilisé pour les tests d'inhibition (Chapitre II des Résultats).

La **quinolinate synthase de *T. maritima*** a été clonée, purifiée et caractérisée dans le but d'obtenir une structure tridimensionnelle par RX puisqu'en effet aucune structure de l'enzyme avec son centre [4Fe-4S] n'était disponible à mon arrivée au laboratoire. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de cristallogénèse et cristallographie des protéines de l'IBS de Grenoble.

Enfin, la **quinolinate synthase d'*A. thaliana*** a été étudiée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de M. et E. Pilon (Biology Department and Program in Molecular Plant Biology, Colorado) spécialisé dans l'étude des chloroplastes chez *A. thaliana*. Afin de resituer le contexte de cette collaboration, il est important de comprendre la particularité de cette quinolinate synthase qui n'est pas nommée NadA mais SufE3. En effet, le gène *sufE3* code pour une protéine à deux domaines : un domaine *sufE*-like, SufE étant connu pour être impliqué dans la biosynthèse des centres [Fe-S] en tant que donneur de soufre, et un second domaine qui a révélé une forte homologie de séquence avec la quinolinate synthase d'*E. coli* (24 % d'homologie). Etant donné le domaine de compétence du laboratoire à la fois dans le domaine de la biosynthèse des centres [Fe-S] et dans la réactivité des centres fer-soufre et de son expertise sur le système quinolinate synthase d'*E. coli*, nous avons été amenés à travailler à la caractérisation de cette protéine avec comme objectif son identification en tant que quinolinate synthase.

I- Obtention des protéines NadA et NadB

I-1 Obtention des différents plasmides et surexpression des protéines NadA et NadB

Avant mon arrivée au laboratoire les gènes *nadA* et *nadB* d'*E. coli* avaient été clonés et insérés dans le vecteur pET22b+ par l'équipe de F. Barras (Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille), créant ainsi les plasmides pET-NadA-Ec et pET-NadB-Ec contenant respectivement les gènes *nadA*, *nadB*, chaque protéine correspondante surexprimée possédant une extension polyhistidine en C-terminale.

- Les plasmides codant pour NadA d'*E. coli* sauvage et mutée

Afin d'obtenir les protéines NadA mutées ponctuellement au niveau de certains acides aminés, nous avons dans un premier temps effectué les PCR avec le plasmide pET-NadA-Ec comme matrice. Les vecteurs pET ne sont pas de bons outils pour la mutagenèse dirigée probablement à cause de leur grande taille (pET-22b : 5493 pb) et ainsi après de multiples essais infructueux avec le vecteur pET-NadA-Ec, nous avons effectué une nouvelle construction en clonant le gène *nadA* d'*E. coli* dans le vecteur pT7-7 (2470 pb) (pT7-NadA-Ec). Ce plasmide a été utilisé comme plasmide parental pour les expériences de mutagenèse dirigée visant à muter divers résidus cystéine en alanines. Ainsi les plasmides pT7-NadAC113A, pT7-NadAC119A, pT7-NadAC200A, pT7-NadAC291A, pT7-NadAC294A, pT7-NadAC297A, pT7-NadAC113A-C200A, pT7-NadAC200A-C297A, pT7-NadAC291A-C294A, pT7-NadAC294A-C297A, pT7-NadAC113A-C297A et pT7-NadAC291A-C294A-C297A ont été obtenus.

- Le plasmide codant pour NadA de *M. tuberculosis*

Le plasmide contenant le gène codant pour la protéine NadA de *M. tuberculosis* nous a été fourni par M. Rizzi (University of Piemonte Orientale, Novara, Italy). Ce plasmide nommé pET-NadA-Mt permet la surexpression de la protéine NadA de *M. tuberculosis*.

- Le plasmide codant pour SufE3 d'*A. thaliana*

Le construit contenant la quinolinate synthase d'*A. thaliana* (SufE3) nous a été fourni par Marinus et Elisabeth Pilon (Biology department and program in molecular plant biology, Colorado State University, USA).

- Le plasmide codant pour NadA de *T. maritima*

Le gène codant pour la protéine NadA de *T. maritima* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *Thermotoga maritima* puis inséré dans le vecteur pT7-7 générant le vecteur pT7-NadA-Tm.

La surexpression des protéines a été réalisée dans le cas des protéines NadB d'*E. coli*, NadA d'*E. coli* sauvage et mutée ainsi que pour NadA de *M. tuberculosis* dans la souche *E. coli* C43(DE3). La surexpression des protéines NadA de *T. maritima* et NadA d'*A. thaliana* a été réalisée dans la souche *E. coli* BL21(DE3). La surexpression de toutes ces protéines a été effectuée comme décrit dans le Chapitre Matériels et Méthodes (M&M) après induction à l'IPTG (0.5 mM) pendant 3 heures à 37 °C. Une très bonne surexpression a été obtenue pour toutes les protéines. Un exemple est donné Figure 48 (piste 2) dans le cas de NadA d'*E. coli*. Dans le cas des protéines NadA, à l'exception de la protéine NadA de *T. maritima*, les étapes suivant l'expression c'est-à-dire la préparation des extraits solubles, ainsi que la purification ont été effectuées en conditions d'anaérobiose en boîte à gants. La lyse cellulaire a été réalisée en utilisant le lysozyme, favorisée par la répétition de cycles de congélation décongélation dans la boîte à gants. Pour ce qui est de la protéine NadA de *T. maritima* et NadB d'*E. coli*, toutes les étapes ont été réalisées en aérobiose et la lyse cellulaire a été réalisée par sonication dans le cas de NadB et par lyse enzymatique pour NadA de *T. maritima*.

I-2 Purification et caractérisation biochimique et spectroscopique des protéines

I-2-1 La L-Aspartate oxydase (NadB) d'*E. coli*

Les extraits obtenus après ultracentrifugation ont une couleur jaune attestant de la présence de FAD dans la protéine. Grâce à son extension polyhistidine, la protéine NadB d'*E. coli* a été purifiée en une seule étape sur une colonne d'affinité Ni-NTA et l'imidazole éliminé sur une colonne de dessalage (NAP-25). Le gel d'électrophorèse SDS-PAGE attestant

de la pureté de la protéine (95 %) est montré Figure 47A. La protéine est obtenue avec un bon rendement de purification comme indiqué dans le Tableau 15. A ce stade de purification, la protéine est quasi incolore car elle a perdu son cofacteur FAD. Afin de la recharger en FAD, nous avons choisi de la reconstituer chimiquement en incubant la protéine avec un excès de FAD pendant deux heures à température ambiante, l'excès étant ensuite éliminé sur une colonne dessalage NAP-25. Le spectre UV-visible de la protéine reconstituée (Figure 47B) montre trois maximums d'absorbance, un maximum d'absorbance à 280 nm correspondant à l'absorbance de la protéine ainsi que deux maxima d'absorbance correspondant à la présence du FAD à 360 et 450 nm. La lecture de l'absorbance à 450 nm permet de déterminer la quantité de FAD par protéine d'après l'épsilon (ϵ) à 450 nm qui est égal à $11\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Dans ces conditions, la protéine NadB fixe entre **1 et 1.5 FAD par protéine** suivant les préparations.

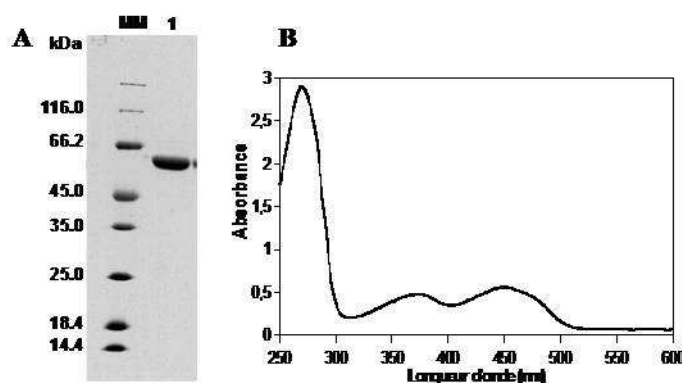


Figure 47 : (A) Gel de polyacrylamide 12 % en conditions dénaturantes présentant la protéine NadB après une étape de purification sur Ni-NTA (piste 1), MM = marqueurs de Masse Moléculaire connue. (B) Spectre d'absorption UV-visible de la protéine NadB (50 μM) reconstituée avec du FAD. Dans cette préparation de NadB, la concentration de FAD calculée est égale à 48 μM , soit environ 1 FAD par protéine.

NadB <i>E. coli</i> 540 acides aminés MM = 60 337 Da pI théorique = 5.89	Rendement / L de culture	Pureté
	60 mg	95 %

Tableau 15 : Récapitulatif paramètres physicochimiques de NadB : Taille de la protéine en acides aminés, Masse moléculaire (MM) en Da et Point isoélectrique (pI théorique). Le rendement en protéine obtenu pour 1L de culture ainsi que l'état de pureté de la protéine sont indiqués.

I-2-2 Les différentes Quinolinate Synthases

Comme déjà mentionné, la purification de toutes les protéines NadA, à l'exception de NadA de *T. maritima*, a été effectuée en conditions d'anaérobiose.

Les protéines NadA d'*E. coli* sauvage et mutée, NadA de *M. tuberculosis* ainsi que la protéine SufE3 d'*A. thaliana* possèdent une étiquette polyhistidine, permettant leur purification en une seule étape sur une colonne d'affinité, de type Ni-NTA. Les protéines sont éluées avec 160 mM d'imidazole que l'on élimine immédiatement après l'éluion de la protéine sur une colonne de dessalage (NAP-25) afin d'éviter la précipitation de la protéine.

Dans les pages qui suivent je vais décrire les propriétés biochimiques et spectroscopiques des protéines NadA purifiées de chaque organisme. La purification de la protéine NadA de *T. maritima* qui ne possède pas d'extension polyhistidine sera expliquée séparément ultérieurement.

a- NadA d'*E. coli* : protéines sauvage et mutée

La protéine NadA d'*E. coli* sauvage possède une couleur marron après Ni-NTA et est obtenue avec une relativement bonne pureté (95 %) comme en atteste le gel SDS-PAGE (Figure 48, piste 3). A partir de 1 litre de culture, 10 mg de protéine pure ont été obtenus (Tableau 16). La couleur, la pureté ainsi que les rendements de purification varient de façon significative pour les protéines NadA mutées (NadAC113A, NadAC200A, NadAC297A, les doubles mutants NadAC291A-C294A, NadAC113A-200A, NadAC113A-297A, NadAC200A-297A ainsi que le triple mutant NadAC291A-294A-297A) (Tableau 16). Les faibles rendements (1 mg/mL) sont essentiellement dus à la précipitation des protéines. Je reviendrai plus en détails sur les propriétés biochimiques des mutants quinolinate synthase dans le paragraphe « III- Etude des ligands du centre [4Fe-4S] ».

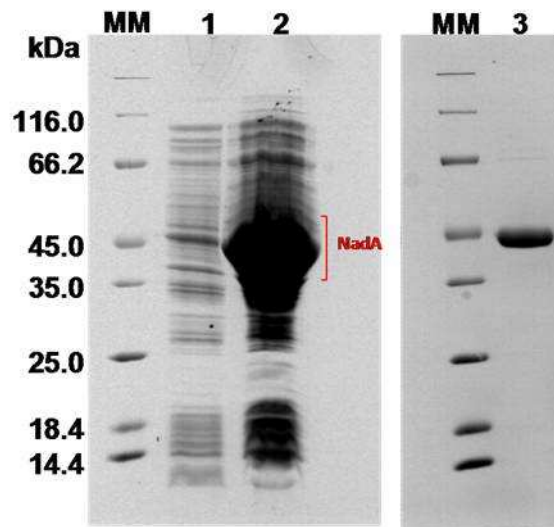


Figure 48 : Gel de polyacrylamide 12 % en conditions dénaturantes présentant les extraits bactériens C43(DE3)-pT7-NadA-Ec, **piste 1** : avant l'induction de l'expression de la protéine, **piste 2** : après 3 heures d'induction à 37 °C avec de l'IPTG. La **piste 3** montre la protéine après purification sur colonne d'affinité Ni-NTA. MM= marqueurs de Masse Moléculaire connue.

	Rendement / L de culture	Pureté
NadA <i>E. coli</i> 347 a.a 38421 Da, $pI_{\text{théorique}} = 5.19$	10 mg	95 %
NadA mutées	1 à 5 mg	70 à 90 %

Tableau 16 : Récapitulatif paramètres physicochimiques de NadA : Taille de la protéine en acides aminés, Masse moléculaire (MM) en Da et Point isoélectrique ($pI_{\text{théorique}}$). Le rendement en protéine obtenu pour 1L de culture ainsi que l'état de pureté de la protéine sont indiqués.

- Analyse de l'état d'oligomérisation sur Superdex-200 :

L'état d'oligomérisation de la protéine NadA d'*E. coli* purifiée en anaérobiose a été déterminé par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex-200. Comme on peut le voir sur la Figure 49 représentant le chromatogramme obtenu, la protéine est éluée majoritairement sous forme monomérique (70 %), avec une masse moléculaire d'environ 39 kDa en accord avec la masse théorique de 38421 Da, le reste de la protéine étant élué sous la forme de dimères et oligomères. Ces différents états d'oligomérisation ont été déterminés après calibrage de la colonne avec des protéines de masse moléculaire bien déterminées, et ce dans les mêmes conditions que celles utilisées pour NadA (Tampon, débit...).

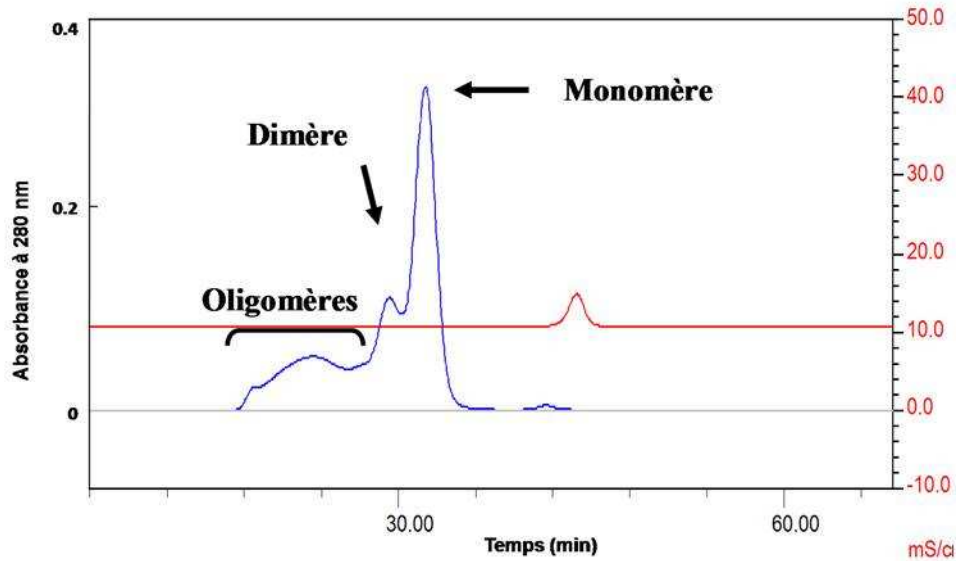


Figure 49 : Détermination de l'état oligomérique de la NadA d'*E. coli*. Profil d'élution obtenu sur Superdex-200 de la NadA d'*E. coli* (200 μ M) réalisé à 0.5 mL/min dans du Tampon Tris -HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 100 mM.

- Dosage fer soufre :

Les quantités de fer et de soufre ont été déterminées (Tableau 17) et sont, comme attendu, obtenues en quantité quasi stœchiométriques avec des valeurs proches de 4 par protéine monomérique.

	Fe	S
NadA <i>E. coli</i>	4	3.2

Tableau 17 : Récapitulatif du contenu en fer et en soufre de la quinolinate synthase d'*E. coli*. Valeurs donnant une quantité de moles de Fe et de S par mole de monomère de protéine.

- Spectroscopie UV visible

Le spectre UV-visible de NadA isolée avec son centre [Fe-S] enregistré entre 250 et 800 nm, présente une bande de transfert de charge S \rightarrow Fe(III) située vers 420 nm et un épaulement vers 330 nm, comme déjà observé en 2005 sur NadA d'*E. coli* produite à partir du pET-NadA-Ec (Ollagnier-de Choudens S., 2005). Ces caractéristiques suggèrent la présence d'un centre [Fe-S] de type [4Fe-4S]²⁺ (Figure 50, Spectre bleu).

Lors d'une exposition de la protéine à l'oxygène, la bande observée à 420 nm diminue et la solution se décolore, attestant de la dégradation du centre métallique. Dans ces conditions (Figure 50, Spectre rose), après 30 minutes d'exposition à l'O₂, le spectre UV-visible n'évolue plus nous permettant de déterminer un temps de demi-vie pour le centre [4Fe-4S] égal à 15 min. La réexposition de la protéine dans des conditions d'anaérobiose ne permet pas de récupérer la bande à 420 nm, montrant que la dégradation du centre est un processus irréversible.

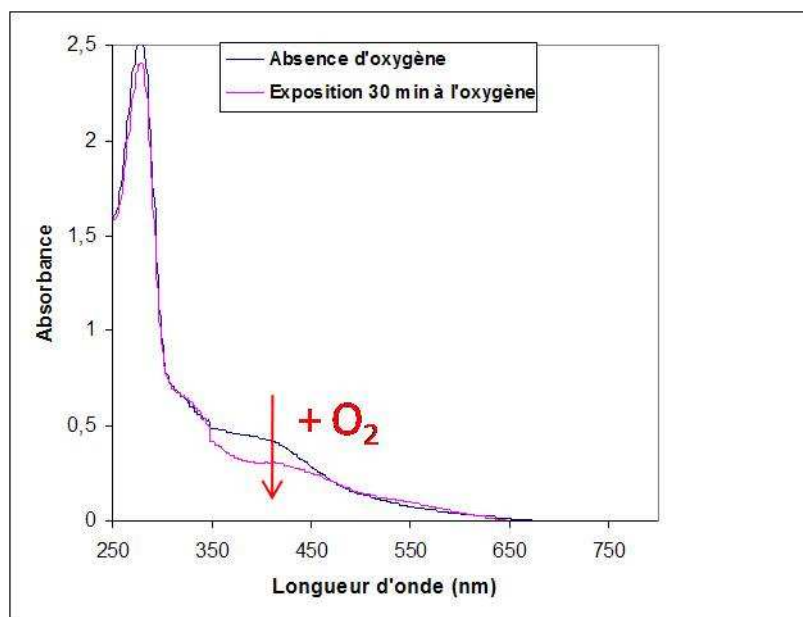


Figure 50 : Spectre UV-visible de la protéine NadA d'*E. coli* (100 µM) dans du Tampon C en l'absence d'oxygène (spectre bleu) et après 30 minutes d'exposition à l'air (spectre rose).

- Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Caractérisation du centre [4Fe-4S] à l'état réduit

Une analyse RPE avait déjà été réalisée en 2005 sur NadA surexprimée à partir du pET-NadA-Ec. Nous avons vérifié que la protéine NadA obtenue avec le pT7-7 possédait les mêmes propriétés spectroscopiques par RPE. Pour rappel, un centre [4Fe-4S]²⁺ est diamagnétique (car il possède 2 ions Fe³⁺ et 2 ions Fe²⁺ donc son spin vaut S = 0) et est donc silencieux en RPE. La réduction à un électron de ce centre conduit à un centre [4Fe-4S]⁺ de spin S = 1/2 observable en spectroscopie RPE. En général, la réduction est suivie en UV-visible par la diminution de la bande à 420 nm. Ainsi la protéine NadA obtenue ici à partir du pT7-NadA-Ec, a été réduite avec un excès de dithionite (1 mM) (E° = -550 mV, pH = 8) pendant 10 minutes. Dans ces conditions, comme attendu, la bande de transfert de charge S→Fe(III) à 420 nm en UV-visible disparaît et la solution protéique est devenue incolore (Spectre en

pointillé sur la Figure 51A). Le spectre RPE obtenu sur cette même préparation, enregistré à 10 K, est montré sur la Figure 51B. Le signal obtenu, de spin $S=1/2$ est axial, possède deux valeurs de g de 2.03 et 1.93 et montre un comportement en température et en puissance caractéristique d'un centre $[4Fe-4S]^{+1}$. La double intégration du signal et la quantification par rapport à un standard Cu-EDTA montrent que 80 % du fer total est présent sous la forme d'un centre $[4Fe-4S]^{+1}$. Le signal obtenu est identique à celui obtenu sur NadA d'*E. coli* réduite au dithionite purifiée en 2005 à partir du plasmide pET-NadA-Ec (Ollagnier-de Choudens S., 2005).

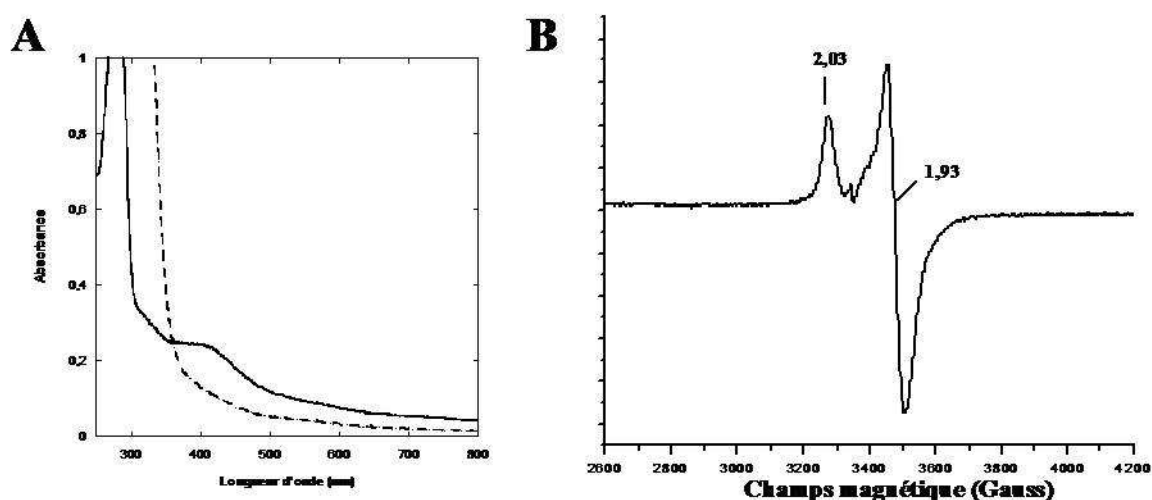


Figure 51 : Analyse RPE de la protéine NadA d'*E. coli*. (A) Suivi par UV-visible de la réduction du centre $[4Fe-4S]$ de NadA d'*E. coli* (200 μ M) dans du Tampon C (cuve 1 mm). Le spectre en trait plein est réalisé avant réduction, le spectre en pointillé est effectué après réduction de la protéine avec 1 mM dithionite pendant 10 minutes. (B) Spectre RPE en bande X de NadA (200 μ M) enregistré à 10 K, puissance 0.1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain 2.10^5 .

Caractérisation du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ exposé à l'air

En 2005, lors d'une analyse par spectroscopie Mössbauer, il avait été observé lors d'une exposition de la protéine à l'oxygène pendant 30 minutes une dégradation du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ avec formation d'un centre $[2Fe-2S]^{2+}$ correspondant à un produit de dégradation du centre $[4Fe-4S]^{2+}$, confirmant la sensibilité du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ à l'oxygène, comme observé précédemment en spectroscopie UV-visible.

En spectroscopie RPE, nous avons constaté après une exposition à l'oxygène de 10 min à température ambiante, l'apparition d'un signal, différent de celui correspondant au $[4Fe-4S]^{+1}$, possédant des valeurs de g de 2.03, 2.01 et 1.95. Ce spectre RPE de NadA enregistré à 0.1 mW et à 10 K est présenté Figure 52. Le comportement en température et en

puissance du signal est caractéristique d'un centre $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ et l'intégration du signal montre que 40 % du fer contenu dans la protéine est présent sous cette forme. Une exposition plus longue à l'oxygène mène à la perte totale du signal correspondant au centre $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ probablement due à la formation de $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, silencieux en RPE.

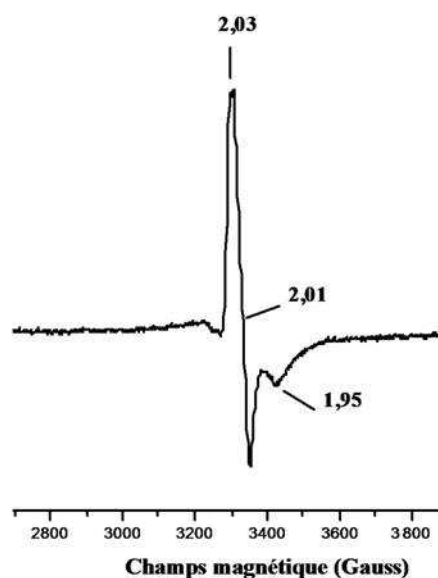
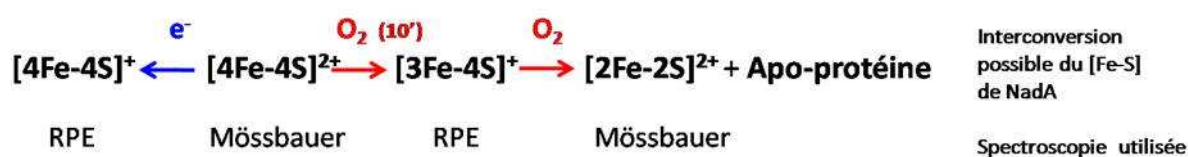


Figure 52 : Spectre RPE de NadA d'*E. coli* (260 μM) exposée pendant 10 min à l'oxygène. Enregistré à 10 K, puissance 0.1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain $2 \cdot 10^5$.

En conclusion, NadA d'*E. coli* est isolée en anaérobie avec un centre $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ qui est capable de se convertir en $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$, $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ ou $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ suivant les conditions (réduction, oxydation) comme résumé ci-dessous :



b- NadA de *M. tuberculosis*

```

MTVLNRTDTLVDELTDITNTPLGYGGVDGDERWAAEIRRLAHLRGATVLAHNYQLPAIQ 1-60
DVADHVGDLSLALSRVAAEAPEDTIVFCGVHMAETAKILSPHKTVLI PDQRAGCSLADSI 61-120
TPDELRAWKDEHPGAVVVS YVNTTAAVKALTDICCTSSNAVDVVASIDPDREVLF CPDQF 121-180
LGAHVRRVTGRKNLHVWAGECHVHAG INGDELADQARAH PDAELFVHPECGCATSALYLA 181-240
GEGAFP AERVKILSTGGMLEAAHTTRARQVLVATEVGMHLQLRRAAPEVDFRAVNDRAS C 241-300
KYMKMITPAALLRCLVEGADEVHVDPGIAASGRRSVQRMIEIGHPPGGGE 301-349
    
```

Figure 53 : Séquence en acides aminés de la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*. Les cystéines sont indiquées en rouge. La quinolinate synthase de *M. tuberculosis* possède 31 % d'homologie de séquence avec la quinolinate synthase d'*E. coli*.

La protéine NadA de *M. tuberculosis* a été obtenue avec un rendement de 10 mg par litre de culture (Tableau 18). L'analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % de la protéine NadA de *M. tuberculosis* après Ni-NTA révèle la présence de deux bandes uniques dont le poids moléculaire est très proche de celui correspondant à la taille de NadA de *M. tuberculosis* ($PM_{\text{théorique}} = 37408$ Da) (Figure 54, piste 1). L'identité et la présence d'une seule et même protéine ont été vérifiées par séquençage N-terminal des deux bandes ainsi que par spectrométrie de masse (un seul pic de masse obtenu à 38093 Da). Un traitement de l'échantillon par le DTT 50 mM pendant 10 min avant d'effectuer le gel d'électrophorèse, a permis d'obtenir une seule bande sur gel SDS-PAGE (Figure 54, piste 2), montrant que les deux bandes précédemment observées correspondent probablement à la formation de pont disulfure, et que le β -mercaptoéthanol présent dans le bleu de dénaturation additionné à l'échantillon avant son dépôt sur gel, n'est pas suffisant pour réduire ce(s) pont(s) disulfure(s) potentiellement présent(s) dans la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*. Le traitement au DTT de la protéine nous permet donc d'obtenir une seule bande sur gel SDS-PAGE et ainsi d'estimer la pureté de la protéine à 85 % (Figure 54, piste 2). Une analyse de l'état oligomérique de la protéine sur Superdex-200 effectuée dans les mêmes conditions (Tampon E, débit 0.5 mL/min...) que NadA d'*E. coli*, montre que la protéine NadA est éluée majoritairement sous forme d'un monomère (80 %) avec une masse expérimentale obtenue égale à 36 kDa, le reste de la protéine est présent sous la forme d'oligomères comme dans le cas de NadA d'*E. coli*.

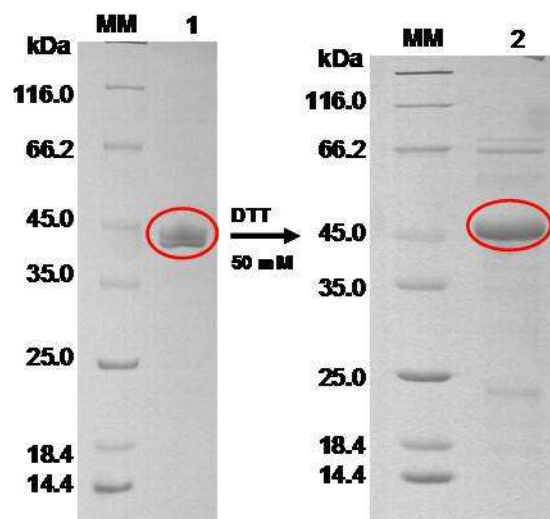


Figure 54 : Gel de polyacrylamide 12 % en condition dénaturantes présentant la protéine NadA de *M. tuberculosis*. **Piste 1 :** protéine NadA de *M. tuberculosis* après purification sur Ni-NTA, **piste 2 :** protéine NadA *M. tuberculosis* après purification sur Ni-NTA et incubation en présence de DTT (50 mM).

NadA <i>M. tuberculosis</i>	Rendement	Pureté
349 acides aminés	(/L de culture)	
37408 Da, pI _{théorique} = 5.48	10 mg	85 %

Tableau 18 : Récapitulatif des paramètres physicochimiques de NadA de *M. tuberculosis* : taille de la protéine en acides aminés, Masse moléculaire (MM) en Da et Point isoélectrique (pI_{théorique}). Le rendement en protéine obtenu pour 1L de culture ainsi que l'état de pureté de la protéine sont indiqués.

- Dosage fer soufre :

Comme pour NadA d'*E. coli*, après purification NadA de *M. tuberculosis* est de couleur marron. Les dosages colorimétriques du Fe et du S donnent des valeurs quasi stœchiométriques en fer et en soufre, avec une moyenne de 2,4 à 2,7 atomes de fer et de soufre par monomère de protéine.

	Fe	S
NadA <i>M. tuberculosis</i>	2.4	2.7

Tableau 19 : Récapitulatif du contenu en fer et en soufre de NadA de *M. tuberculosis*. Valeurs donnant une quantité de mole de fer et de moles de soufre par mole monomère de protéine.

- Spectroscopie UV visible

Comme ce que l'on a observé pour la quinolinate synthase d'*E. coli*, le spectre UV-visible enregistré pour la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* après purification présente une bande transfert de charge S→Fe(III) située à 420 nm suggérant la présence d'un centre de type [4Fe-4S]²⁺. Lors de l'exposition de la protéine à l'oxygène, la bande à 420 nm diminue et la solution se décolore. Après 90 minutes d'exposition, le spectre UV-visible n'évolue plus nous permettant de déterminer un temps de demi-vie pour le centre [4Fe-4S] égal à 45 min, suggérant que ce centre est plus stable que le centre [4Fe-4S] de NadA d'*E. coli* (Figure 55).

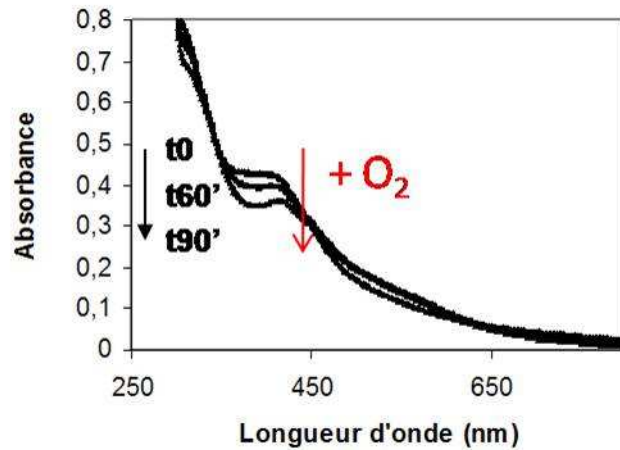


Figure 55 : Spectre UV-visible de la protéine NadA de *M. tuberculosis* (150 μ M, Tampon C) enregistré entre 250 et 800 nm. Le spectre t0 est réalisé en absence d'oxygène, les deux autres après exposition 60' et 90' à l'oxygène.

- Spectroscopie RPE :

Plusieurs tentatives ont été effectuées afin d'obtenir un signal RPE de la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*. Lors de la réduction du centre [Fe-S] avec un excès de dithionite (1 mM), nous avons constaté une décoloration immédiate de la solution avec concomitamment une perte de la bande à 420 nm. Dans ces conditions aucun signal RPE n'a été obtenu. Nous avons réalisé des essais de réduction avec des concentrations inférieures en réducteur, (stoechiométrie enzyme/réducteur) ainsi qu'avec un autre réducteur la déazaflavine photoréduite ; quelles que soient les conditions, nous n'avons malheureusement obtenu qu'un très faible signal RPE représentant moins de 5 % du Fe total. La faible quantité de signal obtenue ne nous a pas permis d'effectuer l'étude de son comportement en température et en puissance.

c- SufE3 d'*A. thaliana*

Je rappelle que le gène *sufE3* est constitué de deux domaines : un domaine *sufE*-like en partie N-terminale et un domaine possédant une forte homologie de séquence avec la quinolinate synthase d'*E. coli* en C-terminal (Figure 56). L'alignement de séquence présenté dans la Figure 57 montre une homologie de séquence de 25 % entre le domaine C-terminal de la protéine SufE3 et la protéine NadA d'*E. coli*. On peut noter que 4 cystéines sont conservées, elles correspondent aux cystéines Cys113, Cys200, Cys294 et Cys297 d'*E. coli*.

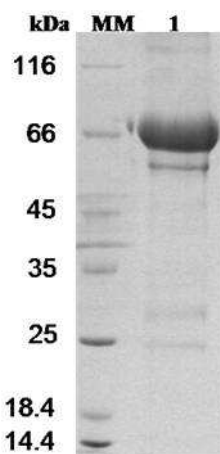


Figure 58 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la protéine SufE3 après une étape de purification sur Ni-NTA (piste 1). MM : marqueurs de masses moléculaires connues.

SufE3	Rendement / 10L	Pureté
<i>A. thaliana</i>	25 mg	95 %

Tableau 20 : Le rendement obtenu pour 10L de culture et l'état de pureté de la protéine SufE3 d'*A. thaliana*.

- Dosage fer soufre :

Des quantités de fer et de soufre proches de la stœchiométrie (3.4 Fe et 2.7 S) déterminées par dosage colorimétrique ont été obtenues pour la quinolinate synthase d'*A. thaliana* (Tableau 21).

	Fe	S
SufE3 <i>A. thaliana</i>	3.4	2.7

Tableau 21 : Récapitulatif du contenu en fer et en soufre de SufE3 d'*A. thaliana*. Valeurs donnant une quantité de mole de Fe et de S par mole de monomère de protéine.

- Spectroscopie UV-visible

Le spectre UV-visible (Figure 59), montre comme obtenu précédemment avec les quinolinate synthases d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*, une bande caractéristique à 420 nm nous permettant de proposer un centre de type $[4Fe-4S]^{2+}$ pour la quinolinate synthase d'*A. thaliana*.

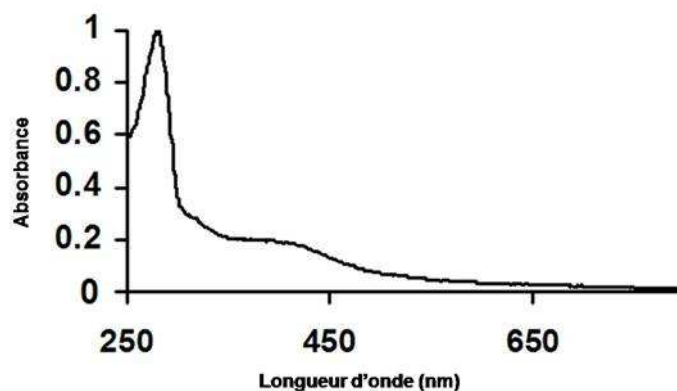


Figure 59 : Spectre UV-visible de la protéine SufE3 d'*A. thaliana* (11 μ M) dans du Tampon C mesuré entre 250 et 800 nm.

- Spectroscopie RPE :

Le signal RPE de la protéine SufE3 d'*A. thaliana* réduite avec du dithionite (2 mM) a été enregistré à 10 K et 0.1 mW (Figure 60). Le signal obtenu est complexe, en effet il est composé d'une superposition de deux espèces de spin $S=1/2$. La première (1) présente des valeurs de g de 2.07, 1.94 et 1.83. La seconde (2) possède des valeurs de g de 2.03 et 1.94 (Figure 60). L'analyse du comportement en puissance et en température des deux espèces est en accord avec la présence d'un centre $[4Fe-4S]^{+1}$. L'intégration du signal dans sa totalité, nous permet de dire que 80 % du fer total de la protéine est sous cette forme. Une exposition de 10 minutes à l'oxygène de la solution protéique après décongélation du tube RPE entraîne la disparition totale du signal RPE, confirmant la sensibilité à l'oxygène du centre métallique, sans apparition transitoire d'une autre espèce de type $[3Fe-4S]^{+1}$.

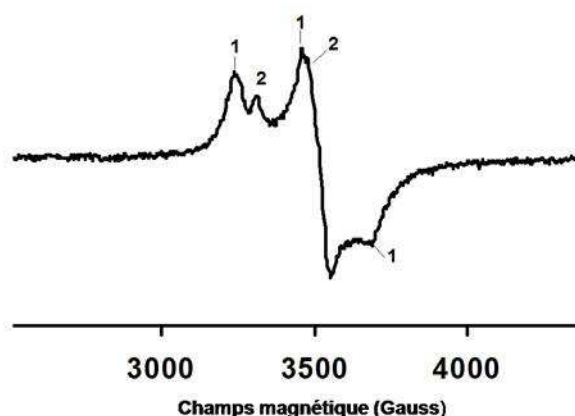


Figure 60 : Spectre RPE de la protéine SufE3 (120 μ M) réduite au dithionite (2 mM), T= 10 K, P = 0.1 mW, G = 2.10^5 , amplitude de modulation 10 mT.

- Spectroscopie Mössbauer

Afin d'effectuer une analyse par spectroscopie Mössbauer de NadA d'*A. thaliana*, la surexpression de la protéine a été réalisée en présence de ^{57}Fe dans les conditions décrites dans la partie M&M. La protéine contient alors un centre $[\text{}^{57}\text{Fe-S}]$. La spectroscopie Mössbauer permet de distinguer et quantifier les différentes formes de centre $[\text{Fe-S}]$: $[\text{2Fe-2S}]$, $[\text{3Fe-4S}]$, $[\text{4Fe-4S}]$ et leur état d'oxydation. Les spectres expérimentaux obtenus sont en général simulés par une combinaison de différents signaux correspondant chacun à une espèce bien déterminée de centre $[\text{Fe-S}]$. La proportion des différents doublets théoriques dans la représentation du spectre complet permet de déterminer la proportion des différentes espèces de centre $[\text{Fe-S}]$ dans notre l'échantillon.

Les spectres Mössbauer mesurés à 4.2 K et à 78 K de la protéine SufE3 d'*A. thaliana* sont présentés dans la Figure 61. A ces deux températures le spectre est constitué d'un doublet caractéristique possédant les paramètres suivants $\delta(1) = 0.45$ (2) mm/s et $\Delta E_Q = 1.12$ (4) mm/s (Tableau 22). Des paramètres identiques rappelés dans le Tableau 22 avaient été déterminés pour NadA d'*E. coli*, et correspondent à la présence d'un centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$. A 78 K, 85 % du fer est présent sous cette forme dans la protéine SufE3 d'*A. thaliana* (Figure 61, doublet en trait plein). A cette température, un second doublet minoritaire représentant 15 % du fer avec les paramètres suivants $\delta = 0.36$ mm/s et $\Delta E_Q = 0.44$ mm/s est également présent (Figure 61, doublet en pointillés). Absent à 4.2 K, il est attribué à des espèces paramagnétiques.

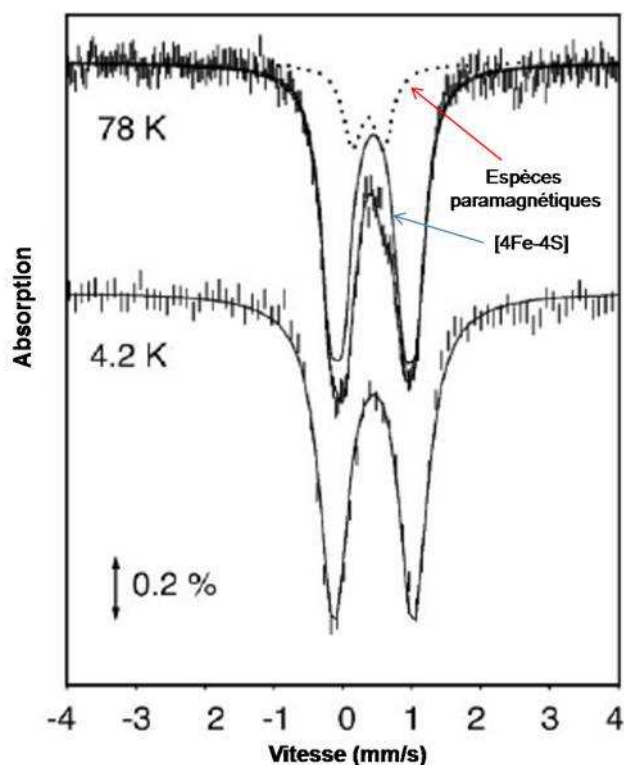


Figure 61 : Spectres Mössbauer obtenus pour la protéine SufE3 d'*A. thaliana* enregistrés à 4.2 K et 78 K. Les spectres expérimentaux obtenus sont indiqués par (◻). A 78 K le doublet en trait plein représente un doublet théorique pour un centre [4Fe-4S], le doublet en pointillés représente des espèces paramagnétiques.

Espèces	NadA d' <i>E. coli</i>			SufE3 d' <i>A. thaliana</i>		
	ϵ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire %	ϵ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire %
[4Fe-4S] ²⁺	0.43- 0.44	1.11	100	0.45 (2)	1.12 (4)	85
Espèces paramagnétiques	/	/	/	0.36	0.44	15

Tableau 22 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus à 78 K par simulation pour la quinolinate synthase d'*E. coli* et d'*A. thaliana*. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux incertitudes sur le(ou les deux) dernier(s) chiffre(s).

d- NadA de *T. maritima*

```

MVDEILKLLKKEKGYIILAHNYQIPELQDIADFGDSLQLARKAMELSEKKILFLGVDFMA 1-60
ELVKILNPKKVI VPD RSATCPMANRLTPEIIREYREKFPDAPVVLYVNSTSECKTLADV 61-120
ICTSANAVEVVKKLDSVVI FGPDRNLGEYVAEKTGKKVITI PENGHCPVHQFNAESIDA 121-180
VRKKYPDAKVI VHPECPKPVRDKADYV GSTGQMEKI PEK DPSRIFVIGTEIGMIHKLKKK 181-240
FPDRE FVPLEMAVCVNMKKN TLENTLHALQTESFEVILPKEVIEKAKKPILRMFELMG 241-298
    
```

Figure 62 : Séquence en acides aminés de la quinolinate synthase de *T. maritima*. Les cystéines sont indiquées en rouge. La quinolinate synthase de *T. maritima* possède 33 % d'homologie de séquence avec la quinolinate synthase d'*E. coli*.

- Purification

La protéine NadA provient de la bactérie hyperthermophile *T. maritima* dont la température optimale de croissance est de 80° C. La protéine NadA de *T. maritima* a donc des propriétés intrinsèques qui lui permettent de résister à des températures auxquelles la plupart des protéines d'*E. coli* se dénaturent. Ainsi une étape de chauffage est couramment utilisée comme étape de purification permettant d'éliminer la quasi totalité des protéines d'*E. coli* qui sont extraites en même temps que la protéine NadA de *T. maritima* puisque cette dernière est exprimée en général chez *E. coli*. L'application d'un tel traitement sur les extraits protéiques contenant NadA de *T. maritima* a permis d'obtenir la protéine pure mais a conduit à la perte du centre métallique. En effet après chauffage, la protéine est quasi incolore avec 0.2 mole de fer et soufre /mole de monomère. Une diminution de la température et/ou du temps de chauffage n'a pas permis d'améliorer les quantités de fer et soufre dans la protéine. Par conséquent, la protéine a été purifiée à l'air et son centre métallique reconstitué chimiquement en anaérobiose à partir de fer et soufre en solution selon un protocole couramment utilisé et maîtrisé au laboratoire (voir Chapitre M&M). La purification se déroule comme suit : les extraits débarrassés de l'ADN par traitement au streptomycine sulfate 3 % et PEI 1 % sont chauffés à 75 °C, puis précipités au sulfate d'ammonium 60 %. Après centrifugation le culot protéique est repris dans du Tampon F contenant du sulfate d'ammonium (1 mM) puis chargé sur une colonne de Butyl Sépharose préalablement équilibrée avec ce même Tampon F. Après lavage avec ce même Tampon, la protéine est éluée par l'application d'un gradient linéaire décroissant en sulfate d'ammonium (correspondant à un gradient linéaire croissant de 0-100 % de Tampon F sans AS) Comme on peut le voir sur le chromatogramme de la Figure 63A représentant le profil chromatographique de la Butyl Sépharose après application, on obtient trois pics. Le premier correspond à de l'ADN comme en atteste l'absorbance en UV-visible avec un maximum d'absorption à 260 nm, le second correspond à la protéine NadA (comme vérifié sur gel d'électrophorèse) mais contaminée par de l'ADN (Abs UV-visible à

260 nm). Seul le troisième pic correspond à la protéine NadA pure avec un maximum d'absorbance à 280 nm, cette fraction est éluée pour 30 % de Tampon F sans sulfate d'ammonium.

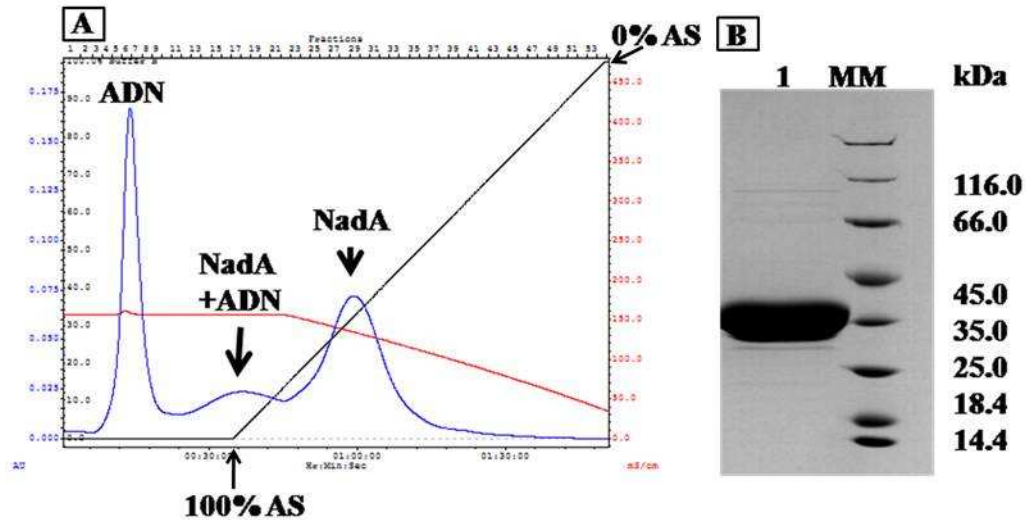


Figure 63 : (A) Profil chromatographique de la quinolinate synthase de *T. maritima* sur Butyl Sépharose. En bleu, détection UV à 280 nm de la protéine, en rouge suivi de la conductivité et en noir gradient linéaire croissant de Tampon F (-AS). (B) Gel d'électrophorèse SDS-Page de la quinolinate synthase de *T. maritima*, piste 1 : pool des fractions du troisième pic d'éluion. MM : marqueurs de masses moléculaires connues.

Dans ces conditions, la protéine NadA est obtenue avec un rendement de 25 mg par litre de culture et une pureté <95 % d'après le gel SDS-PAGE (Tableau 23, Figure 63B).

NadA <i>T. maritima</i>	Rendement / L	Pureté
298 acides aminés	25 mg	<95 %
33617 Da, pI _{théorique} = 7.58		

Tableau 23 : Récapitulatif des paramètres physicochimiques de NadA de *T. maritima* : taille de la protéine en acides aminés, Masse moléculaire (MM) en Da et Point isoélectrique (pI_{théorique}). Le rendement obtenu pour 1L de culture et l'état de pureté de la protéine sont également indiqués.

Comme je l'ai dit précédemment, la purification est effectuée en condition aérobie, la protéine est donc obtenue sous la forme d'une apoprotéine (sans son centre métallique). Le centre [Fe-S] a été reconstitué par ajout de 5 excès fer et soufre à la protéine pendant 3 heures en boîte à gants, à la suite de quoi, la préparation a été passée sur NAP-25. La protéine est de couleur noire et elle contient des quantités de Fe et de S stœchiométriques proches de 4 comme indiqué dans le Tableau 24.

	Fe	S
NadA <i>T. maritima</i>	4.1	4.2

Tableau 24 : Récapitulatif du contenu en fer et en soufre de NadA *T. maritima*. Valeurs donnant la quantité de moles de Fe et de S par mole de monomère de protéine

- Superdex-75:

La protéine NadA de *T. maritima* est destinée à des études cristallographiques, l'homogénéité de la préparation est donc primordiale pour ce type d'études. Pour cela, la protéine a été déposée, après reconstitution, sur colonne de Superdex-75. Dès le chargement de la protéine sur la colonne, on remarque l'apparition de deux anneaux de couleurs différentes : un anneau noir élué en premier et un anneau jaune-marron élué plus tardivement. Le profil chromatographique correspondant est montré Figure 64. On obtient trois pics. Le premier pic correspond à des agrégats [Fe-S] en solution (pas d'absorbance UV-visible à 280 nm et pas de bande sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes). Ce sont des oligomères de NadA qui sont élués dans le second pic. Le dernier pic, majoritaire, associé au second anneau coloré « jaune-marron » correspond à la protéine NadA, sous forme de monomère d'après la calibration avec des protéines de masse moléculaire connue. Les fractions correspondant à ce pic ont été « poolées » et concentrées. Ce sont elles qui vont servir aux tests de cristallisation de la protéine.

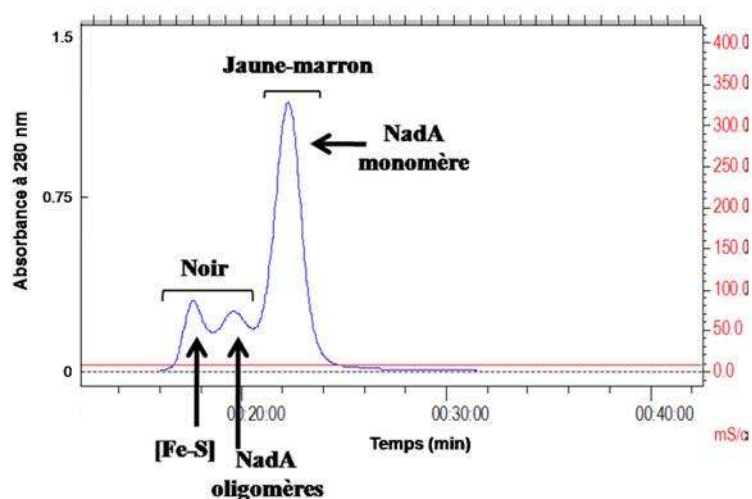


Figure 64 : Analyse de l'état d'oligomérisation de NadA (200 μ M) de *T. maritima* après reconstitution chimique du centre [4Fe-4S]. Profil d'élution obtenu sur Superdex-75 analytique à 0.5 mL/min dans du Tampon E.

- Spectroscopie UV-visible :

Le spectre UV-visible de la protéine NadA de *T. maritima* après reconstitution et passage sur Superdex-75 analytique (correspondant au pic 3, Figure 64), mesuré entre 250 et 800 nm présente une bande de transfert de charge S→Fe(III) à 420 nm et un très léger d'épaulement vers 330 nm (Figure 65). Cette caractéristique suggère la présence d'un centre de type [4Fe-4S]²⁺ de même nature que celui déjà rapporté pour les quinolinate synthases d'*E. coli* de *M. tuberculosis* et d'*A. thaliana*.

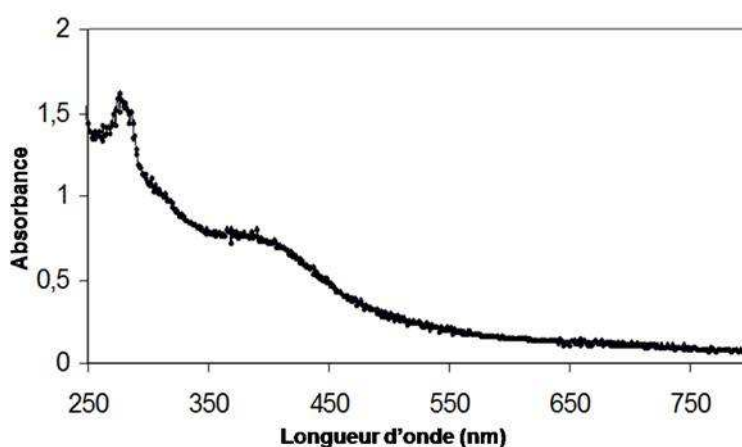


Figure 65 : Spectre UV-visible de la protéine NadA de *T. maritima* reconstituée dans Tampon E.

- Dosage fer et soufre :

Après reconstitution chimique de la protéine, des quantités stœchiométriques de Fe et de S sont obtenues, avec des valeurs proches de 4 moles de fer et de soufre par mole de protéine. Le passage de cette protéine reconstituée sur Superdex-75 entraîne comme je l'ai précédemment mentionné l'élimination de centres [Fe-S] non spécifiques avec alors des quantités de fer et de soufre obtenues, proches de 3 (Tableau 25).

	Fe	S
NadA <i>T. maritima</i> (Butyl Sépharose)	0	0
NadA <i>T. maritima</i> (rec) (NAP-25)	4.1	4.2
NadA <i>T. maritima</i> (rec) (Sdx-75)	3.1	2.9

Tableau 25 : Récapitulatif du contenu en fer et en soufre de NadA de *T. maritima* aux différentes étapes de purification et reconstitution. Valeurs donnant une quantité de mole de Fe et de S par mole de monomère de protéine.

Stabilité à l'oxygène

Lors de l'exposition de la quinolinate synthase de *T. maritima* à l'oxygène, nous avons constaté que la disparition de bande de transfert de charge S→Fe(III) ne se faisait pas aussi rapidement que ce que nous avons précédemment observé pour les protéines d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*. En effet, comme on peut le constater sur la Figure 66, après 60 minutes d'exposition, la bande à 420 nm n'a que faiblement diminué. Une plus longue exposition à l'oxygène ne modifie pas le spectre UV-visible, suggérant un centre [4Fe-4S] assez stable. Cette stabilité plus importante du centre [Fe-S] semble de bonne augure pour l'obtention d'une structure tridimensionnelle de la protéine métallée et confirme la plus grande stabilité des protéines thermophiles.

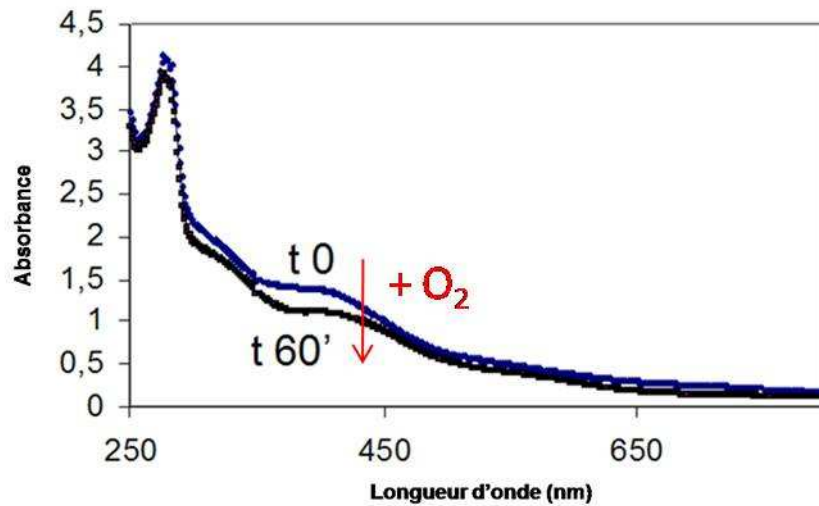


Figure 66 : Spectre UV-visible de la protéine NadA de *T. maritima* (250 μM) enregistré entre 250 et 800 nm. Le spectre en bleu est enregistré en absence d'oxygène. Le spectre en noir est enregistré après exposition de la protéine 60 min à l'oxygène.

En Conclusion, nous avons montré dans ce début de chapitre que les différentes quinolinate synthases de *M. tuberculosis*, *T. maritima* et *A. thaliana*, que nous avons purifiées et caractérisées biochimiquement et spectroscopiquement, possèdent toutes un centre [4Fe-4S]²⁺ comme ce qui avait déjà été mis en évidence pour la quinolinate synthase d'*E. coli* (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005).

I-2-3 Mesure de la concentration des protéines : dosage des acides aminés.

La concentration d'une protéine est en routine évaluée par le dosage mis au point par la méthode de Bradford (Bradford M.M., 1976). Les résultats de ce dosage donnent une valeur approximative avec 5 à 10 % d'erreur. Dans l'objectif de déterminer des quantités de fer et soufre précises ainsi que de déterminer les activités spécifiques des protéines, nous avons besoin de connaître très précisément la concentration protéique de nos échantillons. Nous avons donc choisi la méthode de mesure de la concentration protéique qui s'appuie sur la séquence en acides aminés de la protéine (voir Chapitre M&M). Cette méthode nous a permis d'obtenir des facteurs correctifs de la concentration obtenue par dosage de Bradford, comme indiqués dans le Tableau 26. Nous avons globalement pu constater une surestimation de la concentration des protéines par Bradford. Les concentrations en protéines permettant de déterminer les bilans en purification ainsi que les quantités de fer et soufre/monomère de protéine mentionnées précédemment ont été calculées en tenant compte de ces facteurs correctifs.

	Facteur correctif du dosage Bradford
<i>NadA E. coli</i>	[Bradford] / 2.45
<i>NadA M. tuberculosis</i>	[Bradford] / 2.3
<i>NadB E. coli</i>	[Bradford] / 2.45
<i>NadA T. maritima (apoprotéine)</i>	[Bradford] / 1.3
<i>NadA T. maritima (holoprotéine)</i>	[Bradford] / 1.2

Tableau 26 : Facteur correctif du dosage de la concentration des protéines NadA et NadB par le dosage de Bradford grâce à la méthode du dosage des acides aminés.

II- Mesure des activités enzymatiques

II-1 L'activité L-Aspartate Oxydase (NadB)

La mesure de l'activité L-Aspartate oxydase est réalisée en utilisant le cytochrome c comme accepteur d'électrons. Comme je le rappelle dans la Figure 67A, au cours de la conversion du L-Aspartate en iminoaspartate il y a production de FADH₂. Le cytochrome c oxydé va être réduit par le FADH₂ permettant la régénération du FAD et donc un nouveau cycle catalytique. Le suivi de l'absorbance à 550 nm correspondant à la forme réduite du

cytochrome c au cours du temps nous renseigne sur la quantité de FADH₂ produit, et donc sur le L-Aspartate transformé, et par conséquent sur l'activité NadB.

Nous nous sommes tout d'abord assurés qu'aucune réduction du cytochrome c n'est observée en présence de L-Aspartate oxydase sans substrat (L-Aspartate) sur 15 min. Ceci est illustré sur la Figure 67B (courbe rose), où l'on voit que l'absorbance à 550 nm du cytochrome c ne varie pas sur 15 minutes. Lorsque maintenant on ajoute le substrat, le L-Aspartate, on procède de la façon suivante : le cytochrome c (100 µM) est ajouté à du L-Aspartate (1 mM) dans 100 µl de Tampon G, puis l'absorbance à 550 nm mesurée. Lorsque celle-ci est stable, la protéine NadB (15 µM) est ajoutée et la variation d'absorbance à 550 nm mesurée sur une échelle de temps de 15 minutes (Figure 67, droite en bleu). La pente de la droite obtenue (droite rouge Figure 67B) nous donne la variation d'absorbance à 550 nm par minute (soit 0.0216 Abs/min). Grâce à la loi de Beer Lambert cette valeur est ensuite reliée à la concentration en cytochrome c (grâce à $\epsilon_{550\text{nm}} = 22.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ du cytochrome c) (soit 0.96 mM/min) et par conséquent à l'activité enzymatique de la L-Aspartate oxydase égale alors à 1.06 µmoles/min/mg. Un facteur 2 est appliqué puisqu'il faut 2 cytochromes c pour régénérer 1 FAD et donc 2 cytochromes c pour un L-aspartate consommé. Ainsi l'activité spécifique de l'enzyme NadB est égale à 0.53 µmoles/min/mg. Cette activité est environ 15 fois plus importante que celle proposée par l'équipe de Booker S. dans un rapport non publié qui propose une activité spécifique égale à 3.67×10^{-2} µmoles/min/mg.

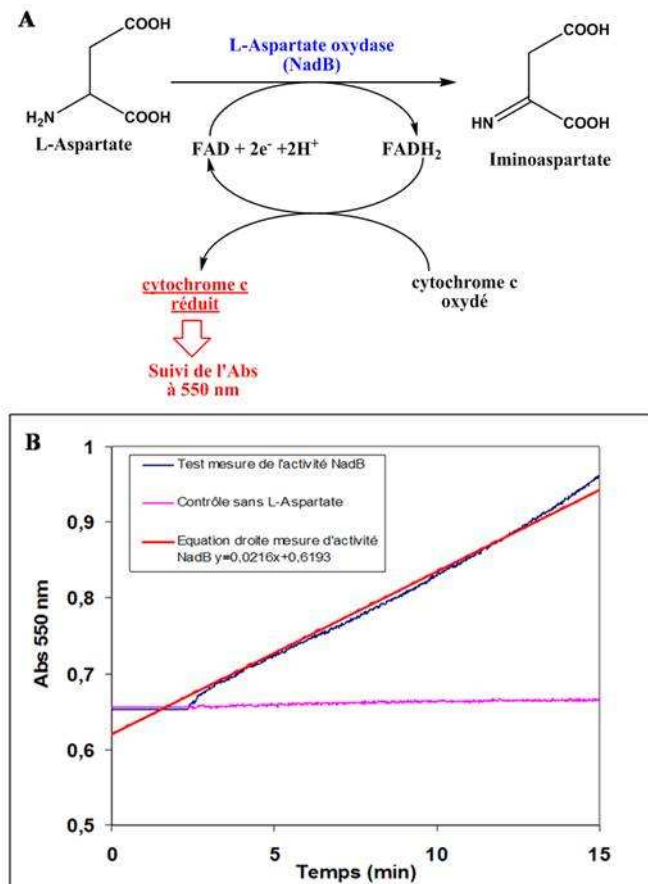


Figure 67 : (A) Principe de la mesure de l'activité L-Aspartate oxydase en utilisant le cytochrome c
 (B) Détermination de l'activité Spécifique de la L-Aspartate oxydase (15 µM) par réduction du cytochrome c. Le tracé rose constitue le témoin en absence de L-Aspartate, le tracé bleu correspond au test de l'activité NadB en présence de L-Aspartate. La droite rouge donne l'équation de la droite $y = 0.0216x + 0.6193$ permettant de déterminer l'activité de NadB connaissant le $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 22.60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II-2 L'activité quinolinate synthase (NadA)

La mesure de l'activité quinolinate synthase est réalisée selon le test mis au point par S. Booker. Il propose la quantification du produit formé par l'enzyme, l'acide quinolinique, par HPLC (comme décrit dans Chapitre M&M) (Cicchillo R.M., 2005). Brièvement, la réaction est réalisée en anaérobiose afin de conserver l'intégrité du centre métallique essentiel à l'activité. La quinolinate synthase (7.1 µM) est mise en présence de ses substrats le DHAP (2 mM) et l'iminoaspartate qui est généré soit chimiquement soit enzymatiquement par NadB et après différents temps d'incubation, le test enzymatique est stoppé par ajout d'acide sulfurique 2 M. Les protéines précipitées sont éliminées après centrifugation. Sur 100 µL d'essai, 50 µL sont récupérés et complétés à 100 µL avec du Tampon TFA pH 2.4 et injectés sur la colonne HPLC. L'acide quinolinique en condition acide possède ses deux fonctions

carboxylates protonnées, il est alors présent sous forme de quinolinate. La colonne HPLC utilisée est une colonne phase inverse permettant la séparation des composants du mélange en fonction de leur polarité. Le quinolinate est très polaire et va donc être élué tout au début du gradient d'acétonitrile (Figure 68A). L'acide quinolinique est une molécule aromatique et possède un maximum d'absorbance à 273 nm. La molécule peut donc être détectée grâce à son absorption dans l'UV-visible à une longueur d'onde choisie de 260 nm. Afin de quantifier précisément l'acide quinolinique présent dans chacun de nos échantillons, nous avons effectué une gamme étalon avec de l'acide quinolinique commercial. L'acide quinolinique est élué à 10.2 minutes. Des quantités croissantes comprises entre 0 et 40 nanomoles ont été injectées. L'équation obtenue nous permet de relier l'aire sous le pic élué à 10.2 minutes à la quantité d'acide quinolinique présent dans l'échantillon (Figure 68B). Dans un test standard c'est-à-dire en utilisant NadA et NadB dans un rapport 1/1 (7.1 μ M), le DHAP (2 mM), le L-Aspartate (33 mM) et le fumarate (25 mM), effectué sur 20 minutes, le profil chromatographique obtenu est typiquement celui de la Figure 68A. L'acide quinolinique est élué à 10.2 minutes, le fumarate à 13.1 minutes et le FAD à 20 minutes. L'acide quinolinique est donc bien séparé des autres composants du système, ce qui nous permet sans ambiguïté de le quantifier.

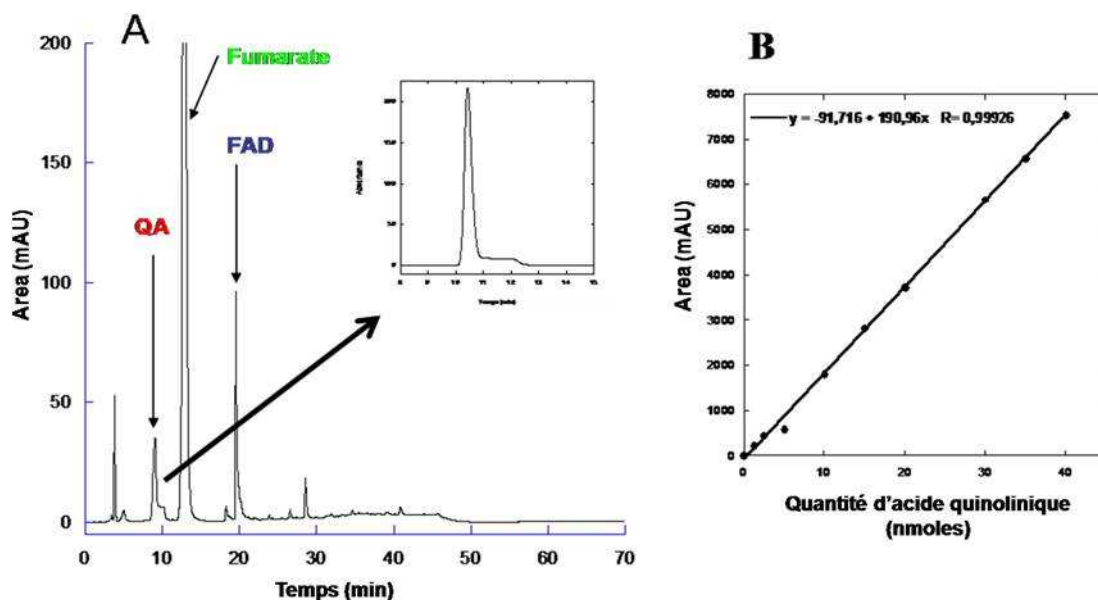


Figure 68 : (A) Profil Chromatographique obtenu après injection du test enzymatique, sont indiqués par des flèches les différents produits élués : l'acide quinolinique (QA) $t_R = 10.2$ min, fumarate $t_R = 13.1$ min, FAD $t_R = 20$ min. L'encart sur la Figure 68A montre un zoom du profil chromatographique d'élué de l'acide quinolinique avec un temps de rétention de 10.2 minutes. (B) Courbe étalon obtenue pour des quantités d'acide quinolinique comprises entre 0 et 40 nanomoles permettant de définir l'équation : $y = -91.716 + 190.96x$.

II-2-1 Cinétique de formation de l'acide quinolinique

Dans un premier temps il est important de déterminer sur quelle échelle de temps la formation d'acide quinolinique se fait de façon linéaire. Nous avons déterminé ce paramètre en suivant la formation d'acide quinolinique sur une échelle de temps allant de 0 à 3 heures de réaction à 37 °C. Comme le montre la Figure 69A, nous avons déterminé qu'une formation d'acide quinolinique se faisait de façon linéaire pendant 30 minutes (Figure 69B). Afin de garantir la meilleure précision lors de la détermination des paramètres cinétiques (V_{max} , K_m), nous avons choisi d'effectuer nos tests d'activité sur une durée de 20 minutes à 37 °C.

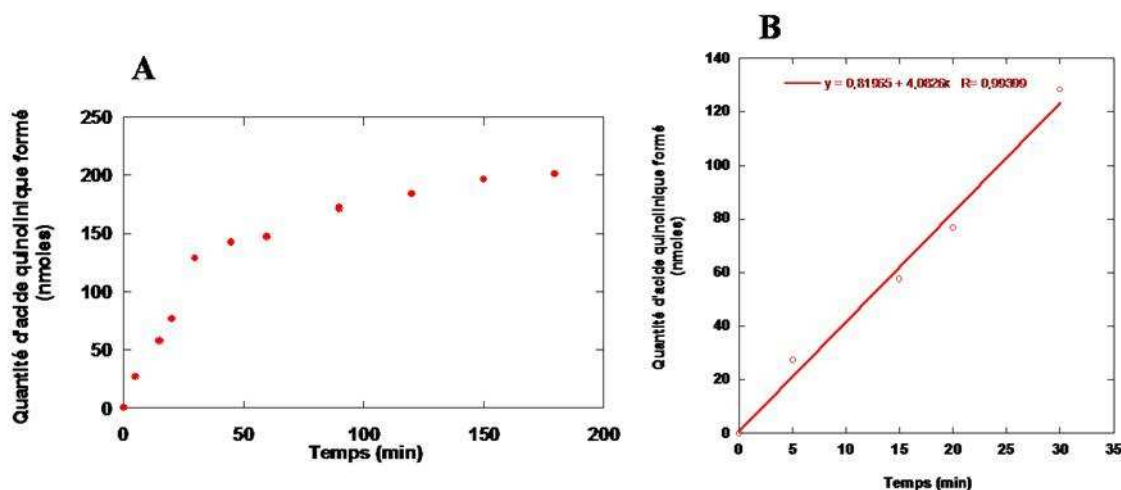


Figure 69 : (A) Suivi de la formation d'acide quinolinique dans le temps entre 0 et 3 heures avec NadA (7.1 μ M), L-Aspartate (33 mM), DHAP (2 mM), fumarate (25 mM) et NadB (7.1 μ M). (B) Agrandissement de la Figure A : Formation d'acide quinolinique par NadA de façon linéaire sur 30 minutes.

II-2-2 Génération chimique d'iminoaspartate

Une seconde manière de générer l'iminoaspartate lors de notre étude consiste de façon chimique à mélanger de l'acide oxaloacétique et du sulfate d'ammonium. La mise au point des conditions de génération chimique d'iminoaspartate a été faite par Nasu en 1981 (Nasu S., 1981). Il avait déterminé alors un maximum d'activité quinolinate synthase pour les concentrations suivantes : 10 mM de sulfate d'ammonium (AS) et 5 mM d'acide oxaloacétique (OAA). Nous avons testé à nouveau ces différents rapports OAA/AS et observé la quantité d'acide quinolinique formée. Nous avons ainsi déterminé que des concentrations de 10 mM de sulfate d'ammonium et 5 mM d'OAA correspondaient bien aux conditions optimales pour une formation d'acide quinolinique maximale. Par ailleurs, nous avons observé que des concentrations supérieures de sulfate d'ammonium entraînaient une précipitation de la protéine.

II-2-3 Influence du rapport NadA/NadB sur l'activité quinolinate synthase

Il est décrit dans la littérature l'utilisation systématique d'un rapport 1/1 pour les enzymes NadA et NadB (Cicchillo R.M., 2005). Nous avons voulu savoir si effectivement une quantité d'acide quinolinique maximale était formée lors de l'utilisation des enzymes dans ces proportions. Pour ceci nous avons suivi la formation d'acide quinolinique pour différents rapports de NadA/NadB utilisés ceci est représenté Figure 70. Cette étude nous a permis de déterminer qu'un rapport de 1/1 pour NadA/NadB n'est pas nécessaire. En effet, une même activité spécifique est obtenue pour des rapports d'enzymes NadA/NadB de 1/10, 1/5 et 1/1 (Figure 70). Pour les mesures de K_m et V_{max} que je vais présenter dans le paragraphe suivant, j'ai utilisé un rapport NadA/NadB de 1/1.

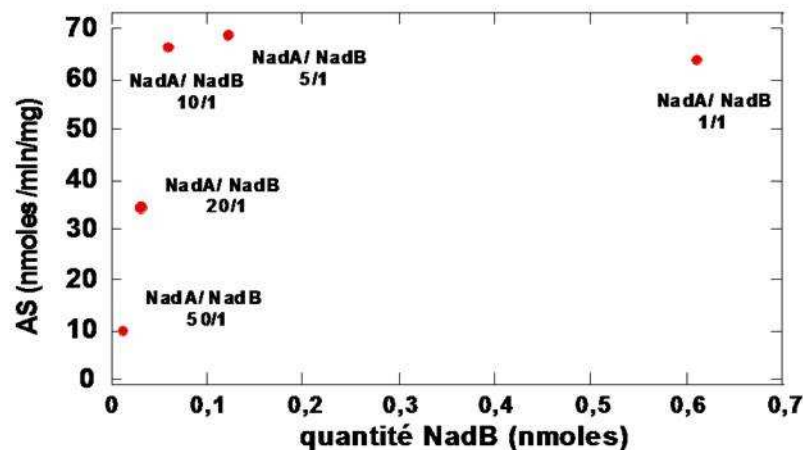


Figure 70 : Variation de l'activité spécifique de l'enzyme AS pour différents rapports d'enzymes NadA/NadB compris entre 1/50 et 1/1. NadA (7.1 μ M), les concentrations de NadB ajoutées varient entre 0.142 μ M et 7.1 μ M. Toutes les mesures ont été réalisées avec du DHAP (2 mM), du L-Aspartate (33 mM) et du fumarate (25 mM) avec un temps d'incubation à 37 °C de 20 min.

II-2-4 Les différentes constantes cinétiques de la quinolinate synthase d'*E. coli*

a- K_m et V_{max}

Les paramètres cinétiques de l'enzyme ont été déterminés dans des conditions saturantes en iminoaspartate, soit 33 mM de L-Aspartate correspondant à 10 fois le K_m donné par Nasu S. pour la L-Aspartate oxydase. Nous avons mesuré la quantité d'acide quinolinique formée en fonction de différentes quantités de DHAP (0 à 5 mM) sur une durée de 20 minutes. La quantité d'acide quinolinique formée par minute pour chaque concentration de DHAP utilisée nous a permis de déterminer la vitesse maximale ainsi que le K_m de l'enzyme pour le DHAP. La Vitesse maximale (V_{max}) est définie comme la vitesse initiale théorique

d'une réaction enzymatique pour une concentration infinie de substrat. Le K_m est le reflet de l'affinité de l'enzyme pour le substrat, plus la valeur est faible plus l'affinité sera grande. La représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en DHAP représentée Figure 71A nous a donné une V_{max} de 1.90 nmoles/min et un K_m de 0.44 mM.

La représentation de Lineweaver-Burk avec $1/v$ en fonction de $1/[DHAP]$, donne quant à elle une V_{max} égale à 1.99 nmoles/min (soit pour $x=0$ on a $1/V_{max}$) et un K_m de 0.38 mM (pour $y=0$, on a $-1/[K_m]$) (Figure 71B).

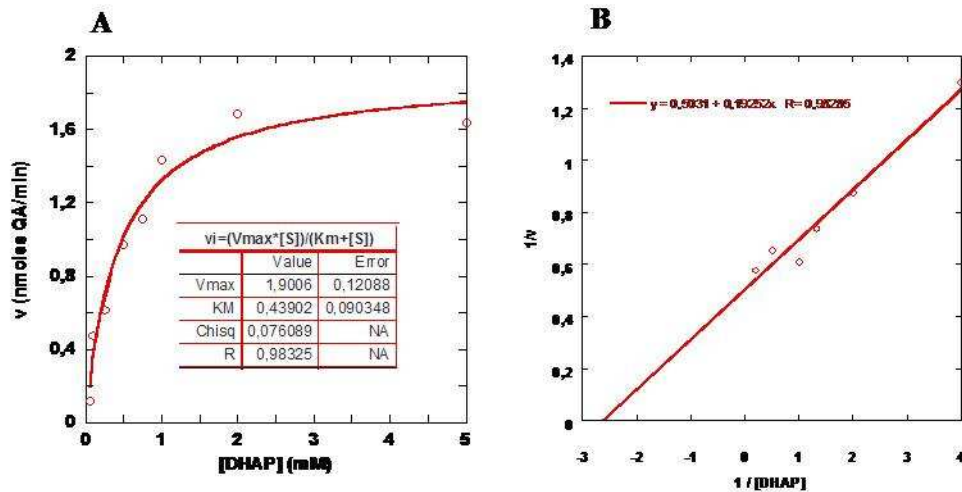


Figure 71 : Détermination de la vitesse maximale (V_{max}) et de la constante d'affinité (K_m) de la quinolinate synthase pour le DHAP. En (A) est indiqué la vitesse de formation de l'acide quinolinique pour différentes concentrations de DHAP comprises entre 0 et 5 mM avec NadA (7.1 μ M) NadB (7.1 μ M), le L-Aspartate (33 mM) et du fumarate (25 mM), le test enzymatique est réalisé sur un temps de 20 min. En (B) est indiqué la représentation de Lineweaver-Burk ou encore la représentation en double inverse ($1/v$ en fonction de $1/[DHAP]$) de la courbe obtenue en A.

b- L'activité spécifique (AS)

Les activités enzymatiques des quinolinate synthases de tous les organismes ont été déterminées. L'activité spécifique d'une enzyme est la quantité de produit (en μ moles) formée par unité de temps (en général la minute) et par mg de protéine. Les activités spécifiques des quinolinate synthases des différents microorganismes étudiés, rapportées dans le Tableau 27, ont été mesurées dans les conditions expérimentales décrites dans le paragraphe précédent.

	AS(μ moles/min/mg)
NadA <i>E. coli</i>	0.061
NadA <i>M. tuberculosis</i>	0.020
NadA <i>A. thaliana</i>	0.050
NadA <i>T. maritima</i> reconstituée	0.040

Tableau 27 : Récapitulatif des activités spécifiques (AS) (nanomoles d'acide quinolinique/min/mg de protéine) déterminées pour les différentes quinolinate synthases d'*E. coli*, de *M. tuberculosis*, d'*A. thaliana* et de *T. maritima*.

Plusieurs remarques peuvent être faites sur ces différentes activités : l'activité spécifique de NadA d'*E. coli* est plus forte que celles mesurées pour les enzymes de *T. maritima*, de *M. tuberculosis* et d'*A. thaliana*. Ces différences d'activité peuvent être liées au fait que les activités spécifiques de NadA *A. thaliana*, *T. maritima* et *M. tuberculosis* sont mesurées en utilisant la L-Aspartate oxydase d'*E. coli*. On peut imaginer que l'utilisation de la protéine NadB correspondant à chaque organisme (pour *M. tuberculosis* et *A. thaliana* mais pas pour *T. maritima* qui ne possède pas de L-Aspartate oxydase) permettrait d'augmenter l'activité quinolinate synthase de ces organismes. De plus, dans le cas de la quinolinate synthase de *T. maritima*, le test a été réalisé à 45 °C, à cette température l'activité de NadB n'est peut être pas optimale.

L'activité enzymatique des différentes quinolinate synthases a également été mesurée en aérobiose dans les mêmes conditions que celles définies précédemment (concentrations en substrats, enzymes et temps de réaction). Nous avons constaté qu'aucune de ces enzymes ne possède d'activité en présence d'oxygène, confirmant la nécessité du [Fe-S] pour l'activité de toutes les quinolinate synthases. Dans ce cas, la protéine NadB utilise l'oxygène comme accepteurs d'électrons.

III- Etude des ligands du centre [4Fe-4S]

Lors de mon arrivée au laboratoire, la caractérisation de la quinolinate synthase d'*E. coli* avait été réalisée et la protéine définie comme une protéine contenant un centre [4Fe-4S]²⁺ sensible à l'oxygène et essentiel à son activité. Les ligands du centre métallique étaient inconnus même si Fridovich I. avait proposé 3 cystéines comme ligands (Cys291, Cys294 et Cys297) (Figures 72) (Gardner P.R, 1991a). Il nous a paru important de déterminer quelles cystéines étaient ligands du centre pour plusieurs raisons :

1) La séquence en acides aminés montre que parmi les 3 cystéines proposées par Fridovich I. (Cys291, Cys294 et Cys297), deux ne sont pas strictement conservées (Cys291 et Cys294). Si on regarde la conservation des cystéines dans les quinolinate synthases de plusieurs organismes on s'aperçoit que NadA d'*E. coli* contient 9 cystéines que l'on peut diviser en deux groupes :

- Un 1^{er} groupe qui comprend trois cystéines strictement conservées : Cys113, Cys200 et Cys297.
- Un 2^{ème} groupe qui comprend cinq cystéines partiellement conservées : Cys64, Cys119, Cys128, Cys195, Cys291, Cys294. Sur celles proposées par Fridovich I., seule la cystéine Cys297 est strictement conservée.

2) Le centre [Fe-S] est essentiel pour l'activité. L'un de nos objectifs étant de relier le rôle du centre [Fe-S] à la catalyse enzymatique, il était donc important d'étudier la nature des ligands du centre pour mieux connaître l'environnement de ce centre [Fe-S].

Afin de déterminer lesquelles de ces cystéines sont impliquées dans la coordination du centre [4Fe-4S], nous avons effectué une série de simples, doubles et triples mutants. Les différentes cystéines mutées ont été remplacées par des alanines par mutagenèse dirigée comme décrit dans le Chapitre M&M.



Cys proposées
par Fridovich I.

Figure 72 : Alignement de séquences des quinolinate synthases de différents organismes. *ECOLI*, *Escherichia coli* ; *MYCTU*, *Mycobacterium tuberculosis* ; *VIBCH*, *Vibrio cholerae* ; *HELPHY*, *Helicobacter pylori* ; *PYRHO*, *Pyrococcus horikoshii* ; *BACSU*, *Bacillus subtilis* ; *CLOAB*, *Clostridium acetobutylicum* ; *LISIN*, *Listeria innocua* ; *PSEAE*, *Pseudomonas aeruginosa* ; *SALTY*, *Salmonella typhimurium* ; *SHIFL*, *Shigella flexneri* ; *YERPE*, *Yersinia pestis*. Les cystéines présentes dans les différentes sequences sont encadrées. (*) indique les acides aminés strictement conservés pour les 12 espèces alignées, (:) indique les résidus fortement conservés et ayant des propriétés physico chimique proches. (.) indique les résidus moyennement conservés, une ★ indique les trois cystéines conservées.

III-1 Caractérisation biochimique et spectroscopique de protéines mutées

III-1-1 Purification et détermination des quantités de Fe et de S

Les premières observations après purification des différentes protéines mutées, à savoir la coloration et les quantités de fer et soufre donnent rapidement des informations quant à l'importance des cystéines pour la coordination et la stabilisation du centre [Fe-S]. En général, la couleur de la protéine corrèle avec la présence du centre [Fe-S]. On remarque que certaines des protéines *NadA* mutées sont complètement incolores, alors que d'autres protéines ont conservé une coloration marron quasi identique à celle de la protéine *NadA* sauvage. Ceci est résumé dans le Tableau 28. Nous avons constaté qu'en l'absence de [Fe-S] la protéine est moins stable et a tendance à précipiter.

	Couleur	Quantité de fer / S mole/mole de protéine
NadA sauvage	+	4
NadAC113A	-	1.0
NadAC119A	+	2.9
NadAC200A	-	0.9
NadAC291A	+	3.9
NadAC294A	+	3.2
NadAC297A	-	0.4
NadAC291A-C294A	+	3.7
NadAC113A-200A	-	0.2
NadAC113A-297A	-	0.2
NadAC200A-297A	-	0.1
NadAC294A-C297A	-	0.6
NadAC291A-C294A-C297A	-	0.5

Tableau 28 : Quantités de fer et de soufre et coloration obtenues pour les protéines NadA sauvage et mutées. Dans la première colonne est indiquée par un (+) la présence de coloration et par un (-) l'absence de coloration. Dans la seconde colonne, les quantités de mole de fer et de soufre par mole de monomère de protéine sont indiquées.

On observe que parmi les six simples mutants, trois sont colorés et conservent des quantités de fer et de soufre similaires à la protéine NadA sauvage (4 moles de Fe/S par mole de protéine) : les mutants NadAC119A, NadAC291A et NadAC294A (avec respectivement des quantités égales à 2.9, 3.9 et 3.2 moles de Fe et de S par mole de protéine). Les trois autres mutants, NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A sont incolores et possèdent très peu de fer et de soufre (entre 0.2 et 1 mole de Fe/S par mole de protéine). Les résultats obtenus avec les doubles mutants corrélaient avec ceux des simples mutants associés. En effet, le mutant NadAC291A-C294A est coloré et possède 3.7 Fe et S par protéine ; les autres doubles mutants NadAC113A-C200A, NadAC113A-C297A, NadAC200A-C297A, NadAC294A-C297A et le triple mutant NadAC291A-C294A-C297A sont incolores et possèdent peu de fer et soufre (entre 0.1 et 0.6 Fe et S par protéine).

III-1-2 Analyse en spectroscopie UV-visible

L'analyse en spectroscopie UV-visible montre que les trois mutants (NadAC119A, NadAC291A, NadAC294A) qui possèdent des quantités de fer et de soufre comparables à la

protéine sauvage présentent un spectre UV-visible (Figure 73C) avec une bande de transfert de charge S→Fe(III) à 420 nm semblable à celle présente dans la protéine sauvage (Figure 73A). Ces trois cystéines ne semblent donc pas impliquées dans la coordination du centre [4Fe-4S]. Par contre, les spectres UV-visible des protéines mutées NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A (Figure 73B) ne présentent pratiquement plus la bande de transfert de charge caractéristique ; les cystéines Cys113, Cys200 et Cys297 sont donc essentielles à la stabilisation du centre [4Fe-4S].

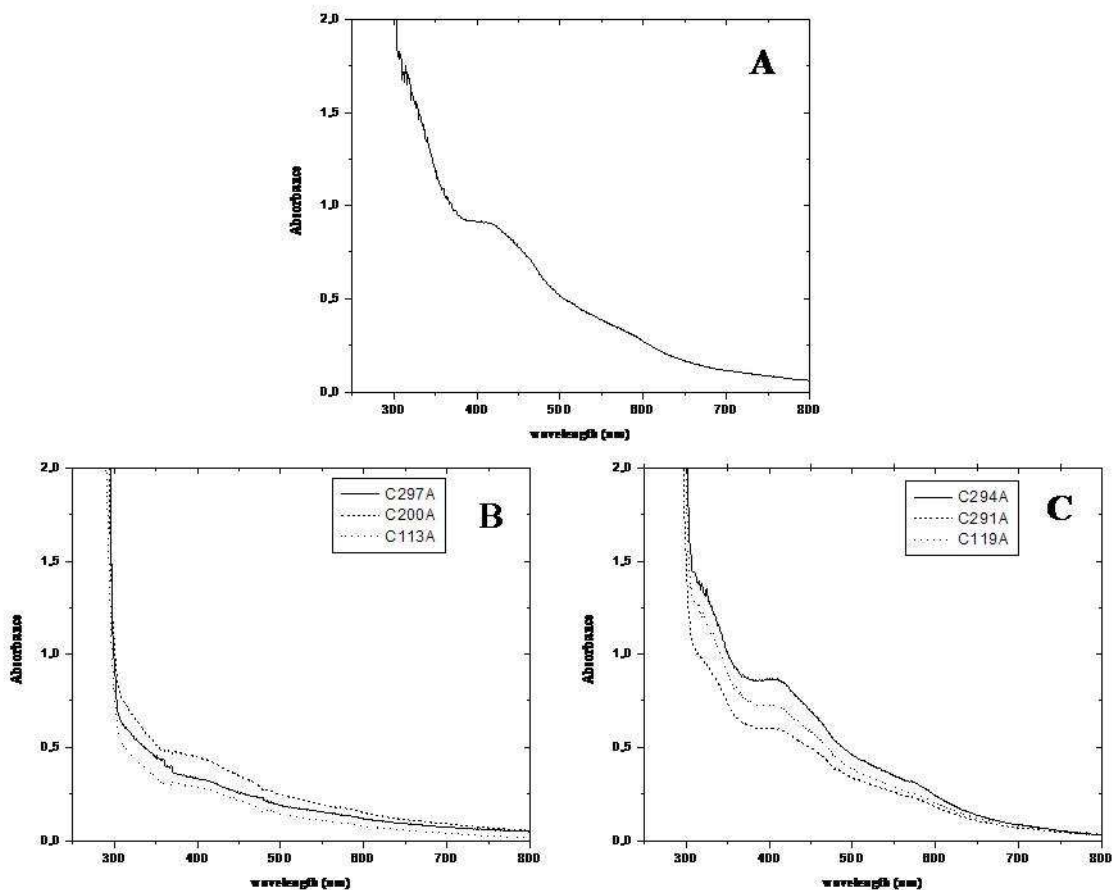


Figure 73 : Spectre UV-visible des protéines NadA sauvage et NadA mutées après purification en anaérobiose. (A) Spectre de la protéine NadA sauvage. (B) Spectres des protéines NadAC297A, NadAC200A, NadAC113A. (C) Spectres des protéines NadAC294A, NadAC291A, NadAC119A.

Lors d'une exposition à l'oxygène, le comportement des protéines mutées NadAC291A et NadAC294A est similaire à celui observé pour la protéine NadA sauvage avec un $t_{1/2}$ mesuré de l'ordre de 15 minutes.

Il semble donc que les Cys113, Cys200 et Cys297 soient les ligands du centre [4Fe-4S]. De plus, les spectres UV-visible des doubles et triples mutants, ainsi que l'analyse en fer et en soufre de ces derniers nous permettent de dire que la présence des 3 cystéines (Cys113,

Cys200, Cys297) est essentielle pour la chélation du centre [Fe-S], et que l'absence d'une seule d'entre elles entraîne l'absence systématique du centre métallique.

III-1-3 Détermination de l'état d'oligomérisation des protéines NadA sauvage et mutées.

Nous avons poursuivi la caractérisation biochimique des protéines NadA mutées par la détermination de leur état d'oligomérisation. Pour cela, les différentes protéines ont été déposées sur une colonne d'exclusion de taille Superdex-200 en anaérobiose, dans des conditions identiques à celles utilisées pour NadA sauvage et rapportées dans le Chapitre M&M. Nous avons obtenu deux types de chromatogrammes suivant les mutants (Figure 74).

Le premier type de chromatogramme (Figure 74A) ressemble à celui obtenu avec la protéine NadA sauvage (Figure 49) : le pic majoritaire, élué à 16.6 min correspond à une masse de 36 400 Da d'après la calibration obtenue avec des protéines de masse moléculaire connue, et correspond à une forme monomérique (la masse théorique donnée pour la quinolinate synthase d'*E. coli* est de 38241 Da). Nous avons obtenu ce chromatogramme pour les protéines mutées NadAC119A, NadAC291A et NadAC294A ainsi que pour le double mutant NadAC291A-C294A.

Le deuxième type de chromatogramme obtenu (Figure 74B) est très différent. Il correspond à un mélange de plusieurs pics mal résolus correspondant à un mélange d'oligomères (dimère, tétramère...). Aucune forme oligomérique majoritaire n'est retrouvée. Ce type de chromatogramme a été obtenu avec les protéines mutées NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A.

En conclusion, une fois de plus, on observe une différence de comportement suivant les cystéines mutées. Les protéines NadAC119A, NadAC291A et NadAC294A présentent les mêmes propriétés que la protéine NadA sauvage avec une protéine majoritairement monomérique alors que les mutants NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A perdent leur état d'oligomérisation monomérique et sont présents sous forme d'agrégats. Les différents états d'oligomérisation des protéines sont résumés dans le Tableau 29.

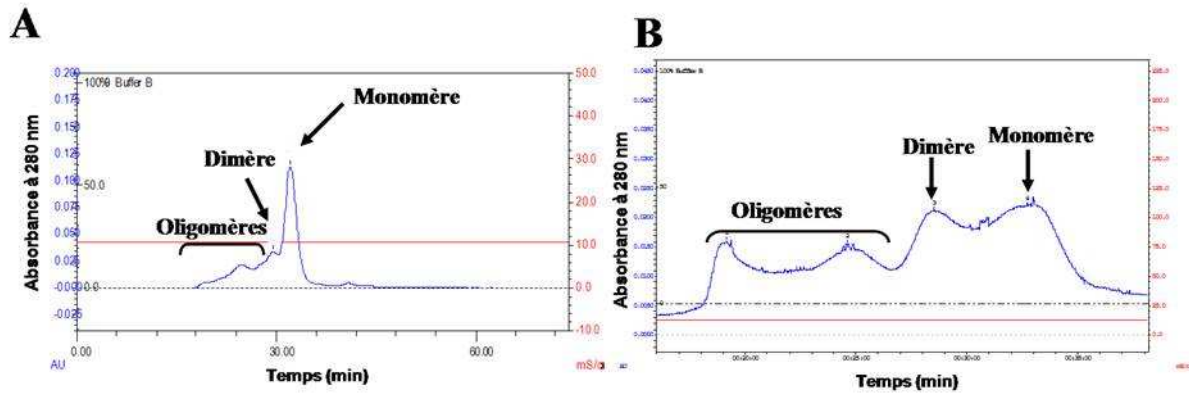


Figure 74 : Détermination de l'état oligomérique des protéines NadA mutées en anaérobiose. Profils d'élution obtenus sur Superdex-200 analytique (A) NadAC119A, NadAC294A et NadAC291A ; (B) NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A.

	Etat d'oligomérisation
NadA sauvage	M
NadAC113A	O
NadAC119A	M
NadAC200A	O
NadAC291A	M
NadAC294A	M
NadAC297A	O
NadAC291A-C294A	M
NadAC294A-C297A	/
NadAC291A-C294A-C297A	/

Tableau 29 : Etats d'oligomérisation des différentes protéines NadA sauvage et mutées déterminés après Superdex-200 analytique. La lettre M indique que la protéine est retrouvée majoritairement sous la forme d'un monomère, la lettre O indique que la protéine est éluée sous la forme d'oligomères. Le signe (/) signifie que les analyses n'ont pas été effectuées.

III-2 Mesure de l'activité des protéines NadA (sauvage et mutées)

III-2-1 Mesure de l'activité quinolinate synthase *in vitro*

Après la purification et la caractérisation biochimique et spectroscopique (en UV-visible) de ces différentes protéines mutées, nous nous sommes intéressés à leur activité enzymatique. Le test enzymatique utilisé est identique à celui mis en place pour la protéine sauvage avec les conditions suivantes : DHAP (2 mM), L-Asp (33 mM), fumarate (25 mM), NadA (7.1 μ M), NadB (7.1 μ M) sur une durée de 20 min. Les résultats obtenus sont indiqués

dans le Tableau 30 avec pour comparaison l'activité de la protéine NadA sauvage. Le centre [Fe-S] étant essentiel pour l'activité de la protéine, j'ai rappelé dans la colonne de droite du Tableau 30 l'absence ou la présence de centre métallique pour chaque protéine mutée. Plusieurs remarques peuvent être faites d'après les résultats obtenus :

1) Nous pouvons voir que le lien entre présence du centre [Fe-S] et activité est bien confirmé : les protéines mutées NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A ainsi que les protéines mutées NadAC294A-C297A et NadAC291A-C294A-C297A qui n'ont pas de centre métallique sont inactives, alors que les protéines NadAC119A, NadAC291A, NadAC294A et NadAC291A-C294A qui peuvent assembler leur centre métallique possèdent une activité quinolinate synthase.

2) Les protéines mutées NadAC119A, NadAC291A, NadAC294A ainsi que NadAC291A-C294A sont moins actives que la protéine NadA sauvage : la protéine NadAC119A est deux fois moins active, et les protéines NadAC291A, NadAC294A et NadAC291A-C294A sont elles dix fois moins actives.

	AS (μ moles/min/mg)	[4Fe-4S]
NadA sauvage	0.056	+
NadAC113A	0	-
NadAC119A	0.030	+
NadAC200A	0	-
NadAC291A	0.0052	+
NadAC294A	0.0031	+
NadAC297A	0	-
NadAC291A-C294A	0.006	+
NadAC294A-C297A	0	-
NadAC291A-C294A-C297A	0	-

Tableau 30 : Activités spécifiques mesurées pour les différentes protéines NadA sauvage et mutées. Dans la seconde colonne est rappelé par un signe (+) la présence du centre [Fe-S], par un signe (-) l'absence de centre.

III-2-2 Mesure de l'activité quinolinate synthase *in vivo* par complémentation

Le but de cette étude par complémentation était de mesurer l'impact de la mutation de chacune des cystéines sur l'activité de l'enzyme *in vivo*.

Nous possédions au laboratoire une souche *E. coli* MG1665 Δ *nadA* (Km résistante) fournie par F. Barras. Cette souche a été mutée au niveau du gène *nadA* par l'insertion d'une cassette Km. La bactérie n'a donc plus la capacité de synthétiser son NAD via sa voie principale. Les deux moyens qui restent à sa disposition pour synthétiser du NAD sont :

- Soit l'utilisation des enzymes de la voie de secours qui sont capables de transformer l'acide nicotinique (Na) en NAD. Dans ce cas, il doit y avoir de l'acide nicotinique dans le milieu de culture.
- Soit par complémentation en rapportant un plasmide contenant le gène codant pour la protéine NadA fonctionnelle.

Les différentes expériences que nous avons effectuées ont été détaillées dans la partie M&M, elles sont brièvement décrites ci-dessous et rappelées dans le Tableau 31.

- La première boîte de pétri est un contrôle de transformation. Après transformation de la souche MG1655 Δ *nadA* par les différents plasmides, les bactéries sont étalées sur milieu LB contenant deux antibiotiques (Kanamycine et ampicilline). Les bactéries MG1665 Δ *nadA* ayant incorporé le plasmide pT7-NadA ou pT7-NadACxA ont acquis cette double résistance et sont donc capables de pousser.
- Avec la seconde boîte, on souhaite vérifier que les bactéries MG1655 Δ *nadA* transformées ou non avec les plasmides pT7-NadA ou pT7-NadCxA sont capables de pousser sur milieu M9 supplémenté avec de l'acide nicotinique (12.5 μ g/mL). Normalement elles doivent toutes pousser.
- Enfin la troisième boîte constitue le test proprement dit. En effet, on va regarder ici si les bactéries MG1655 Δ *nadA* complétementées avec les différents plasmides pT7-CxA contenant les différentes mutations Cys \rightarrow Ala sont capables de pousser sur milieu M9 en absence d'acide nicotinique. En d'autres termes, nous souhaitons savoir si les protéines NadA mutées exprimées *in vivo* sont actives et capables de conduire à la formation d'acide quinolinique. Toutes ces transformations ont été effectuées et les boîtes placées sur la nuit à 37 °C.

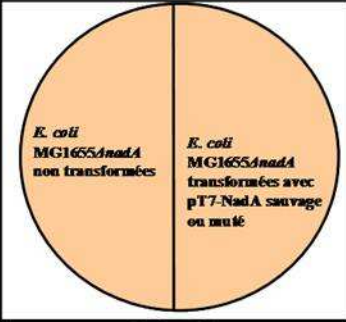
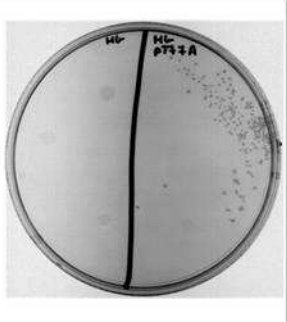
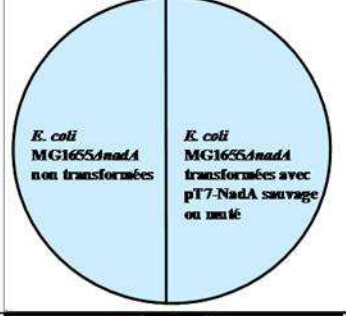

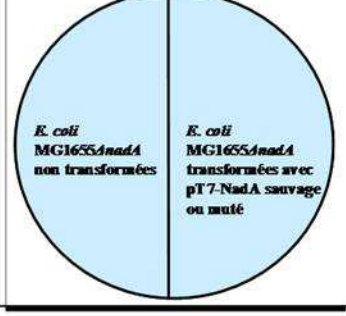

		pT7-NadA WT	
1- Milieu LB + Kanamycine + Ampicilline	Contrôle		
2- Milieu M9 + Kanamycine	+ Acide nicotinique		
3- Milieu M9 + Kanamycine	-Acide nicotinique		

Tableau 31 : Détails des différentes conditions expérimentales utilisées lors de l'étude *in vivo* de l'activité quinolinate synthase par complémentation de la souche d'*E. coli* MG1655 Δ *nadA* avec les différents plasmides. Dans la colonne de droite sont indiqués les résultats obtenus avec le plasmide pT7-NadA dans trois conditions **1-** En milieu LB, + Kanamycine (K), + Ampicilline (A), **2-** En milieu M9, +K, +Acide nicotinique (NA) (12,5 μ g/mL), **3-** En milieu M9, +K, - Acide nicotinique (-NA).

La Figure 75 montre les résultats obtenus avec les différents mutants, résultats résumés dans le Tableau 32 par des (+) ou des (-) suivant si les bactéries ont poussé ou non.

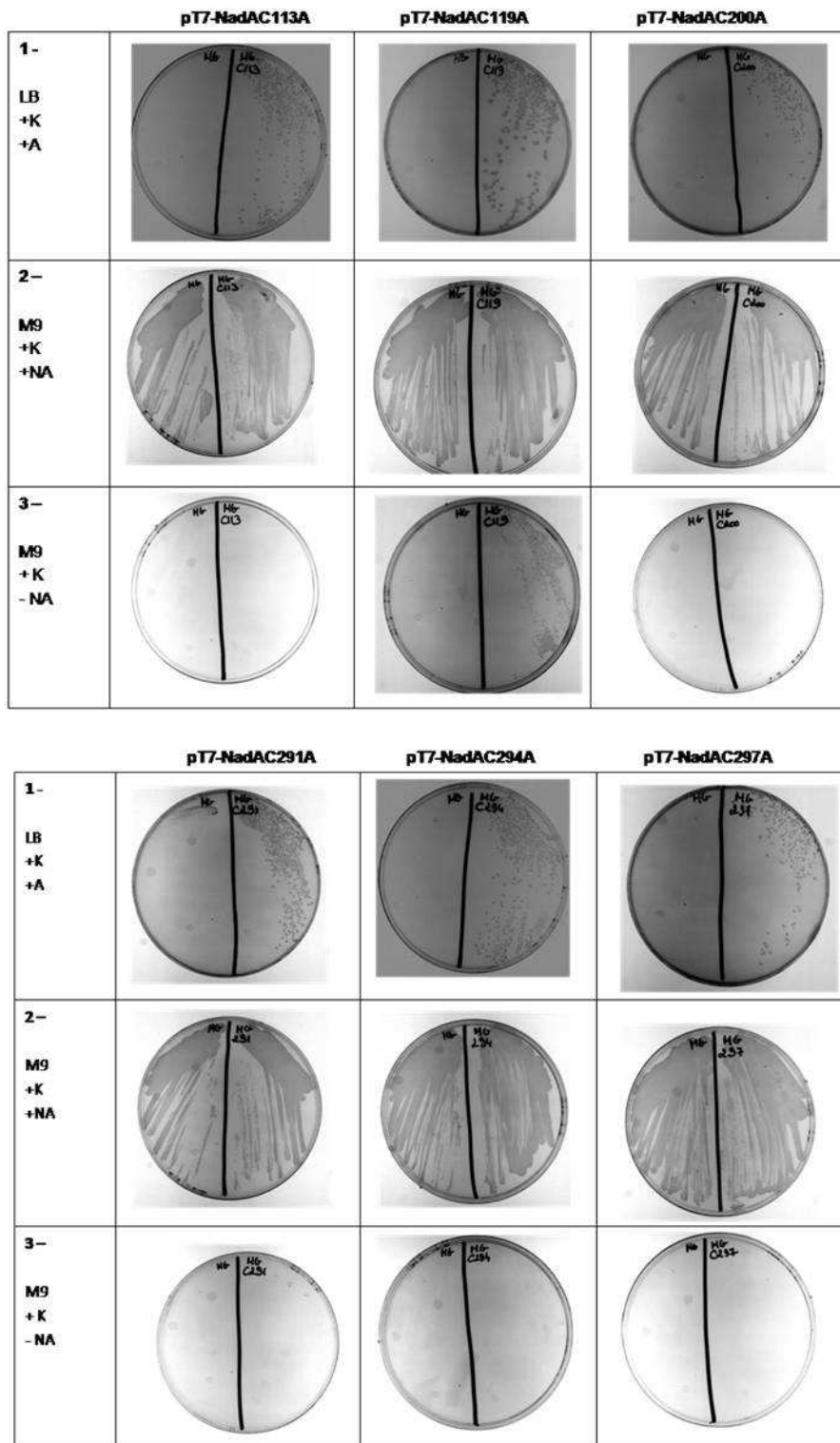


Figure 75 : Etude *in vivo* de l'activité quinolinate synthase par complémentation de la souche d'*E. coli* MG1655 *AnadA* avec les différents plasmides pT7-NadAC113A, pT7-NadAC119A, pT7-NadAC200A, pT7-NadAC291A, pT7-NadAC294A, pT7-NadAC297A dans trois conditions : **1-** En milieu LB, + Kanamycine (K), +Ampicilline (A), **2-** En milieu M9, +K, +Acide nicotinique (NA) (12,5 µg/mL), **3-** En milieu M9, +K, -Acide Nicotinique (-NA).

	Croissance sur milieu minimum + Acide nicotinique (12.5 µg/mL)	Croissance sur milieu minimum – Acide nicotinique
pT7-NadA	+	+
pT7-NadAC113A	+	-
pT7-NadAC119A	+	+
pT7-NadAC200A	+	-
pT7-NadAC291A	+	-
pT7-NadAC294A	+	-
pT7-NadAC297A	+	-

Tableau 32 : Bilan des expériences de complémentation de la souche MG1655 Δ nadA avec les différents plasmides (pT7-NadA, pT7-NadAC113A, pT7-NadAC119A, pT7-NadAC200A, pT7-NadAC291A, pT7-NadAC294A, pT7-NadAC297A) sur milieu minimum. La première colonne donne la croissance en présence d'acide nicotinique et la seconde colonne la croissance en absence d'acide nicotinique. Les + indiquent une croissance des bactéries, les – que les bactéries n'ont pas poussé.

Dans les conditions contrôles effectuées avec le plasmide de NadA sauvage, nous avons obtenu une croissance en milieu LB montrant que les bactéries avaient bien été transformées ; une croissance a également été obtenue pour les bactéries MG1655 Δ nadA transformées et non transformées avec le pT7-NadA sur milieu minimum en présence d'acide nicotinique, comme attendu, puisqu'elles sont capables d'utiliser leur voie de secours. Enfin, une croissance bactérienne a été obtenue sur milieu minimum sans acide nicotinique, ceci témoignant que la quinolinate synthase apportée grâce au plasmide pT7-NadA (sauvage) est active et capable de synthétiser de l'acide quinolinique. Nous savons maintenant que notre test marche bien et qu'une complémentation des bactéries MG1655 Δ nadA avec un plasmide pT7-NadA contenant l'enzyme NadA fonctionnelle conduit à la croissance des bactéries en absence d'acide nicotinique. Nous avons donc effectué les mêmes tests avec les différents plasmides contenant les mutations Cys→Ala dans le gène *nadA*. Comme attendu, les bactéries MG1655 Δ nadA complémentées avec les plasmides pT7-NadAC113A, pT7-NadAC200A, pT7-NadAC297A conduisant à l'expression de protéines dépourvues en [4Fe-4S], ne sont pas capables de pousser sur un milieu sans acide nicotinique et donc de produire du NAD. Ces résultats montrent que *in vivo*, ces protéines mutées sont également incapables d'assembler leur centre métallique et donc que les protéines produites sont inactives et inaptées à synthétiser de l'acide quinolinique nécessaire à la formation du NAD.

Le résultat inattendu est l'incapacité des plasmides pT7-NadAC291 et pT7-NadAC294A à complémenter les bactéries MG1655 Δ nadA. En effet, aucune croissance n'est obtenue sur milieu minimum en absence d'acide nicotinique. Cette inactivité n'est pas due à

l'absence de [4Fe-4S] puisque que les protéines NadAC291A et NadAC294A possèdent un centre [4Fe-4S] et sont actives *in vitro*. Cette étude *in vivo* montre qu'au même titre que les cystéines Cys113, Cys200 et Cys297, les cystéines Cys291 et Cys294 sont essentielles pour l'activité de l'enzyme *in vivo*. Seule la mutation de la cystéine Cys119 n'a pas effet sur l'activité *in vivo* de l'enzyme puisqu'on observe une croissance des bactéries MG1655 Δ nadA complémentées avec le plasmide pT7-NadAC119A sur milieu minimum en absence d'acide nicotinique.

Cette étude de complémentation *in vivo* de la souche MG1655 Δ nadA avec les différents plasmides contenant les différentes mutations dans le gène *nadA* a mis en évidence un rôle essentiel dans l'activité de l'enzyme des cystéines Cys113, Cys200, Cys297, Cys291 et Cys294.

III-3 Etude du rôle des cystéines Cys291 et Cys294

Nous venons de voir que 5 résidus cystéines (Cys113, Cys200, Cys291, Cys294 et Cys297) sont essentiels à l'activité *in vivo* mais seulement trois, les Cys113, Cys200 et Cys297 sont impliqués dans la coordination du centre [4Fe-4S]. Nous avons donc cherché à comprendre le rôle des Cys291 et Cys294.

Les deux cystéines Cys291 et Cys294 sont présentes dans un motif CXXC. Ce motif est retrouvé dans un grand nombre de protéines à activité redox comme la thiorédoxine et est couramment relié à la présence d'un pont disulfure dans les protéines (Mustacich D., 2000 ; Kadokura H., 2003). Nous nous sommes donc demandés si les cystéines Cys291 et Cys294 formaient un pont disulfure intramoléculaire et si ce dernier était essentiel pour l'activité de l'enzyme. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH afin de doser *in vitro* le nombre de ponts disulfure présent dans la protéine NadA sauvage ainsi que dans les protéines mutées NadAC291A et NadAC294A ainsi que dans le double mutant NadAC291A-C294A.

III-3-1 Mesure des ponts disulfure : Système Thiorédoxine/Thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH)

Le dosage des ponts disulfure est couramment réalisé *in vitro* en utilisant le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (Trx/Trr/NADPH) comme décrit dans le Chapitre M&M. Pour cela, la quinolinate synthase (sauvage et mutée (NadAC291A, NadAC294A, NadAC291A-C294A)) (145 μ M) a été incubée dans un volume final de 100 μ L de Tampon H avec la thiorédoxine (1 μ M) et du NADPH (0.3 mM). Après stabilisation en UV-visible de l'absorbance à 340 nm, la réaction a été initiée par ajout de la thiorédoxine réductase (0.23 μ M). Le suivi de la diminution de l'absorbance à 340 nm du NADPH sur une durée de une heure, correspond à la quantité de NADPH consommée et donc à la quantité de pont(s) disulfure présent(s) dans la protéine, comme expliqué dans le Chapitre M&M.

Le test effectué avec la protéine NadA sauvage (145 μ M) est représenté Figure 76. On observe qu'après 60 minutes de réaction, 274 μ M de NADPH sont convertis en NADP⁺ montrant que la protéine subit une réduction à 4 électrons (soit 2 électrons pour un NADPH), et qu'elle possède donc deux ponts disulfure réductibles. L'expérience a été répétée dans les mêmes conditions avec les protéines NadAC291A, NadAC294A ainsi qu'avec le double mutant NadAC291A-C294A. Les spectres sont tous identiques et correspondent à celui obtenu avec la protéine NadAC294A présenté Figure 76. Après 60 minutes de réaction, pour les différentes concentrations de protéines (145 μ M pour NadAC291A et NadAC294A et 130 μ M pour NadAC291A-NadAC294A), on observe une consommation de NADPH de 156 μ M pour NadAC291A, 139 μ M pour NadAC294A et 118 μ M pour NadAC291A-C294A correspondant à la présence d'un seul pont disulfure dans les trois protéines (Tableau 33).

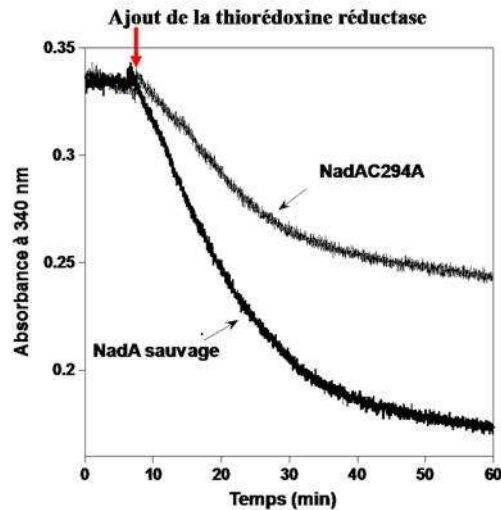


Figure 76 : Dosage des ponts disulfure dans NadA *E. coli* par le système Trx/Trr/NADPH. Mesure réalisée à 340 nm dans une cuve de 1 mm en incubant les protéines NadA (145 μ M) avec du NADPH (0.3 mM), de la Trx (1 μ M) dans du Tampon H. Après 8 minutes, la Trr (0.23 μ M) est ajoutée et la réaction suivie sur 50 minutes. La trace inférieure représente les résultats obtenus avec la protéine NadA sauvage, la trace supérieure représente le résultat obtenu pour la protéine mutée NadAC294A, des tracés similaires ont été obtenus pour les protéines NadAC291A et NadAC291A-C294A.

	[protéine] (μ M)	[NADPH] consommé (μ M)	Nombre de ponts disulfure dosé par protéine
NadA sauvage	145	274	1.89
NadAC291A	145	156	1.08
NadAC294A	145	139	0.96
NadAC291A-C294A	130	118	0.91

Tableau 33 : Résultats obtenus lors du dosage des ponts disulfures avec le système Trx/Trr/NADPH. NadA sauvage, NadAC291A, NadAC294A et NadAC291A-C294A. Dans la première colonne est indiquée la concentration en protéine (en μ M), dans la seconde la concentration NADPH consommée (en μ M) et dans la dernière le nombre de ponts disulfures correspondants.

La protéine NadA sauvage possède donc 2 ponts disulfures alors que les protéines mutées NadAC291A, NadAC294A ainsi que le double mutant NadAC291A-C294A n'en possèdent qu'un seul. Nous avons donc montré ici que les cystéines Cys291 et Cys294 sont impliquées dans la formation d'un pont disulfure et que celui-ci est intramoléculaire. Les cystéines impliquées dans le second pont disulfure n'ont pas été déterminées.

III-3-2 Lien entre activité enzymatique et pont disulfure

Afin d'établir l'importance du pont disulfure pour l'activité de l'enzyme, nous avons mesuré l'activité enzymatique après réduction des ponts disulfures de la protéine NadA sauvage avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH.

a- Mesure d'activité enzymatique après réduction avec le système Trx/Trr/NADPH

Pour cela, la protéine NadA sauvage (12 μ M) est incubée en anaérobiose en présence de thiorédoxine (0.5 μ M), de thiorédoxine réductase (0.1 μ M) et de NADPH (1 mM), conditions pour lesquelles on vérifie en UV-visible que l'on a réduit les ponts disulfures. Après 60 minutes d'incubation, les substrats de la quinolinate synthase sont ajoutés soit le L-Aspartate (33 mM) et le DHAP (2 mM), le fumarate (25 mM) et le test est initié par l'ajout de NadB (12 μ M). Le test enzymatique est stoppé après 30 minutes de réaction par ajout d'acide sulfurique et après centrifugation des protéines et analyse HPLC, l'activité enzymatique est déterminée. Les activités spécifiques mesurées sont rapportées dans le Tableau 34.

Pour la protéine NadA sauvage une diminution de 76 % de l'activité enzymatique est mesurée. On a donc bien une perte d'activité enzymatique mais celle-ci n'est pas totale. En effet, on aurait pu s'attendre au regard des résultats obtenus *in vivo* (expériences de complémentations avec les plasmides pT7-NadAC291A et pT7-NadAC294A) à une perte totale d'activité enzymatique.

	Activité Spécifique (μ moles / min / mg)
1 - Contrôle	
NadA seule (conditions standards)	0.043
2 – Test NadA Réduite	
Avec système Trx/Trr/NADPH	0.0106

Tableau 34 : Activité spécifique quinolinate synthase: 1- Avec NadA non réduite, 2- Avec NadA préalablement réduite avec le système Trx/Trr/NADPH.

b- Mesure d'activité enzymatique après réduction avec du DTT

Lors de la détermination de l'activité enzymatique après réduction de la protéine NadA sauvage avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH, nous nous sommes heurtés à un problème d'analyse des données HPLC. En effet, le NADPH possède un temps de rétention identique à celui de l'acide quinolinique. Nous avons pu régler ce

problème par la quantification du NADPH injecté grâce à une courbe étalon. Par soustraction de la quantité de NADPH injecté à l'aire totale du pic obtenu par HPLC nous avons pu avoir accès à la quantité d'acide quinolinique formée et donc à l'activité enzymatique de NadA réduite. Cependant afin d'obtenir des valeurs plus précises des quantités d'acide quinolinique, nous avons effectué la réduction des ponts disulfures de l'enzyme avec un autre réducteur des ponts disulfures, un réducteur chimique : le dithiothreitol (DTT).

La protéine (12 μ M) a été incubée en présence de 1 mM de DTT pendant une heure à 17 °C en boîte à gants. L'excès de DTT a été éliminé par passage de la protéine sur microbiospin. La mesure d'activité a ensuite été effectuée par HPLC dans les conditions standard décrites dans le M&M. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 35. De façon identique à ce qui a été mis en évidence après réduction des ponts disulfure avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH, on constate une perte de 67 % de l'activité enzymatique en présence de DTT. Il est à noter que nous avons vérifié que le DTT (1 mM) permettait la réduction des deux ponts disulfure de la protéine NadA. Pour cela, nous avons effectué le dosage du nombre de ponts disulfure présents dans la protéine NadA sauvage pré-réduite au DTT avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase/NADPH (dans des conditions identiques à celles du paragraphe précédent). Il apparaît que la protéine NadA réduite avec 1 mM de DTT ne possède plus de ponts disulfure et que donc la perte d'activité obtenue avec le DTT est bien due à la perte du pont disulfure.

Nous avons également vérifié que la diminution d'activité enzymatique constatée en présence de DTT n'était pas due à une perte du centre [4Fe-4S]. Après une incubation de 60 minutes de la protéine NadA sauvage avec du DTT (1 mM) suivi du passage sur microbiospin, 90 % du contenu en fer et en soufre de la protéine sont conservés.

	Activité Spécifique (μmoles / min / mg)
1-Contrôle NadA seule (conditions standards)	0.056
2-Test NadA Réduite avec 1 mM DTT	0.0185

Tableau 35 : Activité spécifique quinolinate synthase: **1-** Avec NadA non réduite, **2-** Avec NadA préalablement réduite avec du DTT (1 mM).

En conclusion, ces résultats confirment que l'activité quinolinate synthase est dépendante de la présence d'un pont disulfure existant entre les cystéines Cys291 et Cys294.

Discussion

A mon arrivée au laboratoire, la quinolinate synthase d'*E. coli* avait été caractérisée. Il avait été établi que l'enzyme possédait un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ essentiel à son activité et sensible à l'oxygène (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005).

Dans ce premier chapitre de résultats, j'ai exposé l'expression, la purification ainsi que la caractérisation biochimique et spectroscopique des quinolinate synthases de différents organismes :

- La quinolinate synthase de *T. maritima* dans le but d'obtenir une structure tridimensionnelle par cristallographie ;
- La quinolinate synthase de *M. tuberculosis* pour les tests de molécules à activités antibactériennes ;
- La protéine SufE3 d'*A. thaliana* pour ses caractéristiques particulières liant une activité NadA et une activité SufE ;
- Enfin toutes ces enzymes ont été comparées à la quinolinate synthase d'*E. coli* sur laquelle j'ai mis au point l'analyse par HPLC de l'activité enzymatique et identifié les ligands du centre $[4\text{Fe-4S}]$.

La quinolinate synthase : une protéine [4Fe-4S] universelle

La purification de NadA est réalisée en anaérobiose afin de conserver l'intégrité du centre métallique. Cette capacité à purifier la protéine avec son centre métallique n'est pas une généralité. En effet, pour une grande quantité de protéines contenant un centre $[\text{Fe-S}]$ sensible à l'oxygène la purification est réalisée en aérobiose, leur centre $[\text{Fe-S}]$ étant ensuite reconstitué de façon chimique en milieu réducteur en ajoutant du fer et du soufre ou encore de façon enzymatique avec l'utilisation d'une cystéine désulfurase, de L-cystéine et de fer(II) (Mulliez E., 1999 ; Ollagnier-de Choudens S., 2000). La reconstitution des centres $[\text{Fe-S}]$ par cette méthode a permis de caractériser de nombreuses protéines. Cependant, dans plusieurs cas la reconstitution chimique conduit à des espèces $[\text{Fe-S}]$ non spécifiques, qui se caractérisent par une couleur « noire charbon » avec d'importantes quantités de fer et de soufre. C'est pourquoi l'obtention d'une protéine, avec son centre métallique sans aucun traitement chimique constitue un objectif majeur qu'il faut essayer d'atteindre aussi souvent que possible.

J'ai effectué la purification en anaérobiose de la quinolinate synthase d'*E. coli*, mais également celle de la quinolinate synthase de *Mycobacterium tuberculosis* et d'*Arabidopsis thaliana*. En anaérobiose, toutes ont été purifiées avec un centre [4Fe-4S] comme l'atteste leur coloration marron. La quinolinate synthase de *Thermotoga maritima* n'a pas pu être purifiée en anaérobiose puisque l'étape de chauffage permettant sa purification entraîne la destruction du centre métallique de l'enzyme. Cette protéine a donc été occasionnellement reconstituée. De plus, le passage sur Superdex-75 a permis d'enlever les espèces [Fe-S] non spécifiques (1^{er} pic élué, noir) et a permis d'obtenir une protéine (dans le 3^{ème} pic) majoritairement sous forme monomérique et dont la coloration est identique à celle des protéines NadA purifiées en anaérobiose présentant une couleur marron jaune.

Nous avons ainsi pu établir que les quinolinate synthases des différents organismes (*M. tuberculosis*, *A. thaliana* et *T. maritima*) possèdent toutes un centre métallique. En accord avec les différentes techniques spectroscopiques utilisées, spectroscopie UV-visible, Mössbauer ainsi que la spectroscopie RPE, nous avons montré qu'elles contiennent toutes, de façon similaire à ce qui avait été précédemment rapporté par le laboratoire et par l'équipe de Booker S. pour la quinolinate d'*E. coli*, un centre de type [4Fe-4S]^{1+/2+} (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005). L'hypothèse de la présence d'un centre métallique dans cette protéine a été émise pour la première fois par Fridovich I. en 1991 (Gardner P.R., 1991a) et ce n'est que 14 ans plus tard que le caractère essentiel du centre métallique a été mis en évidence.

Cependant deux études contredisent le caractère essentiel du centre métallique pour l'activité enzymatique. La première est celle de Cecchiani F. qui purifie la quinolinate synthase d'*E. coli* sous forme de corps d'inclusion en aérobiose, et obtient après dénaturation/renaturation de la protéine une activité enzymatique de 600 µmol/min/mg (Cecchiani F., 2000), soit plus de 10 000 fois supérieure à celle que nous proposons (cette étude). La seconde étude est celle de Sakuraba H. qui rapporte la première structure tridimensionnelle d'une quinolinate synthase, celle de *P. horikoshii*. Il propose également une activité enzymatique pour cette protéine qui ne possède pas de centre métallique. L'activité spécifique qu'il donne est mesurée par HPLC, soit dans des conditions quasi identiques aux nôtres, et est de 2.2 µmoles/min/mg, soit encore une fois nettement supérieure à celles proposées pour l'enzyme contenant un centre [Fe-S] (Sakuraba H., 2005).

Tout récemment, deux nouvelles publications concernant la caractérisation biochimique, structurale et enzymatique de quinolinate synthases sont parues (Saunders A.H., 2008b ; Marinoni I., 2008). Elles rapportent la purification et la caractérisation des quinolinate

synthases de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Pyrococcus horikoshii* et de *Bacillus subtilis*. Ces papiers confirment nos observations à savoir que toutes les quinolinate synthases possèdent un centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R. M., 2005 ; Murthy N.U.M., 2007 ; Saunders A.H., 2008b ; Marinoni I., 2008). Ainsi le Tableau 36 récapitule l'ensemble des résultats obtenus sur les quinolinate synthases de divers organismes en termes de métallation (présence d'un centre fer-soufre) et d'activité enzymatique.

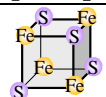
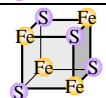
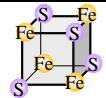
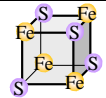
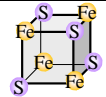
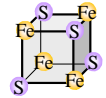
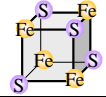
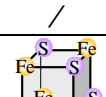
	AS (µmol/min/mg)	[Fe-S]
NadA <i>E. coli</i>	0.06 (cette étude)	
	0.015 (Cicchillo R. M., 2005))	
	600 (Ceciliani F., 2000)	/
NadA <i>M. tuberculosis</i>	0.02 (cette étude)	
	0.012 (Saunders A.H., 2008b)	
NadA <i>A. thaliana</i>	0.05 (Murthy N.U.M., 2007)	
NadA <i>T. maritima</i>	0.04 (cette étude)	
NadA <i>P. horihoshii</i>	0.100 (Saunders A.H., 2008b)	
	2.2 (Sakuraba, H., 2005)	/
NadA <i>B. subtilis</i>	0.05 (Marinoni I., 2008)	

Tableau 36 : Récapitulatif de toutes les activités spécifiques quinolinate synthase chez divers microorganismes présentées dans la littérature.

Pour ce qui est des études sur NadA d'*E. coli* et NadA de *P. horikoshii* rapportant une activité en absence de centre [Fe-S] (Ceciliani F. 2000 ; Sakuraba H., 2005), deux explications sont envisageables : concernant l'étude de Ceciliani F. avec NadA d'*E. coli*, l'activité annoncée pourrait être une erreur d'écriture dans la définition de l'unité enzymatique qui a été définie comme égale à 1 mmol/min au lieu de 1 µmol/min qui est l'unité internationale. Ceci pourrait expliquer l'énorme décalage entre notre activité et la leur,

mais ne permet néanmoins pas d'expliquer le fait qu'une activité enzymatique soit obtenue avec une enzyme dépourvue de centre métallique.

Pour ce qui est de l'activité donnée par Sakuraba H., l'erreur pourrait provenir de la nature du produit quantifié par HPLC. En effet, les auteurs utilisent une génération enzymatique d'iminoaspartate faisant intervenir l'enzyme NadB. Le produit formé l'iminoaspartate est instable en se décomposant très rapidement en acide oxaloacétique. L'acide oxaloacétique possède un maximum d'absorbance à 255 nm alors que le maximum d'absorbance de l'acide quinolinique est situé à 268 nm. Dans ce papier, la détection de l'acide quinolinique est effectuée à 254 nm, par conséquent le produit détecté ne serait donc pas de l'acide quinolinique mais peut être de l'acide oxaloacétique. A la faveur de cette hypothèse, j'ai observé que lors de la génération chimique d'iminoaspartate avec de l'acide oxaloacétique et du sulfate d'ammonium, on obtient deux pics très proches sur le chromatogramme : l'acide oxaloacétique avec un temps de rétention de 8.7 minutes et l'acide quinolinique avec un temps de rétention de 10.2 minutes. Une erreur ou une mauvaise séparation est donc aisément faisable.

D'une manière générale, avec les multiples études parues ces 3 dernières années sur la quinolinate synthase, il semble maintenant établi que toutes ces enzymes possèdent un centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité de l'enzyme. Il est également établi que le centre [4Fe-4S] est sensible à l'oxygène.

Détermination des ligands du centre [4Fe-4S]

Fridovich I. a été le premier à émettre l'hypothèse de la présence d'un centre [Fe-S] dans la quinolinate synthase, qu'il avait relié à la sensibilité de la protéine à l'oxygène et à la séquence caractéristique CXXCXXC retrouvée dans d'autres protéines possédant un centre [4Fe-4S] (Gardner P.R., 1991a). Parmi ces protéines, on peut citer les ferrédoxines de *Desulfovibrio africanus*, *Bacillus Stearthermophilus* ou encore *Desulfovibrio gigas* (Bruschi M., 1988). Des analyses bioinformatiques nous ont permis de mettre en évidence que seulement trois cystéines sur les neuf contenues dans la quinolinate synthase d'*E. coli* sont strictement conservées, à savoir les Cys113, Cys200 et Cys297. Nous nous sommes donc posés la question quant à la nature des ligands du centre [4Fe-4S]. Par des expériences biochimiques, spectroscopiques ainsi que des mesures d'activités enzymatiques *in vitro* et *in vivo*, nous avons clairement établi que le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines, les cystéines strictement conservées : Cys113, Cys200 et Cys297. Cette affirmation est basée sur trois observations :

- Premièrement, lors de la purification en anaérobiose des protéines NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A, nous avons constaté qu'elles ne contenaient quasiment pas de centre [Fe-S] (0.2-1 Fe et S/ monomère) par rapport à la protéine sauvage.
- Deuxièmement, ces trois protéines mutées n'ont pas d'activité quinolinate synthase aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, la complémentation d'une souche d'*E. coli* MG1655 Δ nadA avec les plasmides pT7-NadAC113A, pT7-NadAC200A et pT7-NadAC297A ne restaure pas la croissance des bactéries sur milieu minimum en absence d'acide nicotinique.
- Enfin, par opposition avec la protéine NadA sauvage qui est majoritairement présente sous la forme d'un monomère, les protéines mutées NadAC113A, NadAC200A et NadAC297A ne possèdent pas d'état d'oligomérisation majoritaire et sont éluées sous la forme d'oligomères. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des cystéines sous formes libre, car non impliquées dans la coordination du centre métallique, qui réagissent entre elles et qui via la formation de ponts disulfures forment des oligomères.

Les résultats obtenus quant à l'identification des ligands du centre métallique ont mis en évidence la difficulté de prédiction des ligands du centre [4Fe-4S] en se basant uniquement sur la structure primaire d'une protéine. En effet, seulement une des trois cystéines du motif CXXCXXC est finalement un ligand du centre [4Fe-4S] de NadA d'*E. coli* : la cystéine Cys297. Dans le cas des protéines [Fe-S], on observe l'émergence de plus en plus de cas de centres [Fe-S] coordonnés par des cystéines réparties sur l'ensemble de la séquence de la protéine et non ordonnées selon des motifs canoniques comme c'est le cas pour quelques motifs très conservés. On peut citer l'exemple des protéines de la famille des Radical SAM pour lesquelles le motif CX₃CX₂C était caractéristique et systématiquement retrouvé dans cette famille de protéines avec les cystéines ligands du centre [4Fe-4S] de ces protéines (Nicolet Y., 2004). Cependant, tout récemment (décembre 2008), une protéine a été caractérisée comme appartenant à cette famille (ThiC) bien qu'elle ne contienne pas le motif CX₃CX₂C, mais un motif CX₂CX₄C (Chatterjee A., 2008). Cette dernière étude renforce notre analyse selon laquelle, l'identification de motif caractéristique dans la séquence d'une protéine doit être systématiquement complétée par l'analyse d'un alignement de séquence permettant d'évaluer la stricte conservation des résidus.

Trois des ligands du centre [4Fe-4S] ont pu être identifiés. Quant à la nature du 4^{ème} ligand cela semble peu probable que ce soit un résidu cystéine étant donné la faible conservation des cystéines autres que les cystéines Cys113, Cys200 et Cys297. Un quatrième ligand de type non-cystéinyle est possible. En effet, plusieurs familles de protéines

contiennent un centre [4Fe-4S] lié par uniquement trois cystéines, le quatrième ligand étant une molécule d'eau, une molécule de substrat ou encore un acide aminé de type Asp, Glu et His. Pour l'aconitase, c'est une molécule d'eau provenant du solvant en absence de substrat, et deux atomes d'oxygène du substrat lorsque celui-ci est présent (Beinert H., 1996). On peut également citer les enzymes de la famille des Radical SAM qui contiennent un centre [4Fe-4S] lié par 3 cystéines, le quatrième ligand étant le cofacteur de l'enzyme : la S-Adénosylméthionine (SAM) (Nicolet Y., 2004). D'autres protéines lient leur centre [4Fe-4S] avec 3 cystéines, le quatrième acide aminé étant une histidine dans le cas de l'hydrogénase Ni-Fe ou de la 4-hydroxybutyryl-CoA déshydratase (Volbeda A., 1995 ; Martins B.M., 2004), un aspartate dans celui de la ferrédoxine de *P. furiosus* (Calzolari L., 1995). Enfin pour la dihydroxypyrimidine déshydratase, le quatrième ligand est un oxygène de la fonction carboxylate d'un glutamate (Dobritzsch D., 2001).

Le quatrième ligand du centre [Fe-S] de NadA pourrait donc être un acide aminé de ce type. Lorsque l'on effectue des alignements de séquence de protéines NadA de divers organismes, de potentiels acides aminés candidats, strictement conservés apparaissent, l'aspartate en position 67, l'aspartate en position 178, le glutamate en position 228 ou encore l'histidine en position 226. Il pourrait être intéressant de muter chacun de ces résidus conservés et d'étudier l'influence de la mutation sur l'activité enzymatique. Cependant, dans l'hypothèse où le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase jouerait un rôle dans la catalyse au niveau des étapes de déshydratation avec un des atomes de fer jouant le rôle d'acide de Lewis, je suis plutôt en faveur d'un quatrième ligand de type molécule d'eau en absence de substrat et de type substrat ou intermédiaire réactionnel au cours de la réaction enzymatique. Ceci reste à démontrer bien entendu.

Une caractéristique commune aux centres [4Fe-4S] coordonnés par seulement trois cystéines est leur dégradation lors d'une exposition à l'oxygène, le plus souvent sous différentes formes : [3Fe-4S], [2Fe-2S] allant même parfois jusqu'à la dégradation totale du centre menant à la formation d'une apoprotéine. Lorsque l'on expose le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase durant 10 minutes à l'oxygène, on observe par spectroscopie RPE la présence de 30 à 40 % de centre fer-soufre sous forme d'un centre [3Fe-4S]⁺¹. Par spectroscopie Mössbauer après 30 minutes d'exposition à l'oxygène, on observe la présence de 25 à 30 % de fer sous la forme d'un centre [2Fe-2S]⁺² concomitamment à la diminution de la forme [4Fe-4S]⁺². La présence de trois cystéines coordonnant le centre [4Fe-4S], et l'existence d'un centre [3Fe-4S]⁺¹ après exposition à l'oxygène sont également en faveur d'un

centre [4Fe-4S] coordonné par seulement 3 résidus cystéine. Tout ceci conduit à penser que le centre [4Fe-4S] n'est pas structural. De plus, il n'existe pas à ce jour de centre [4Fe-4S] structural avec seulement 3 cystéines comme ligands. Nous proposons donc que le quatrième fer du centre soit un fer « accessible » (au solvant, aux substrats) de sorte à pouvoir jouer un rôle dans la catalyse enzymatique comme indiqué Figure 77. La question du rôle du centre métallique de la protéine dans la catalyse enzymatique sera développée plus amplement au cours ma troisième partie (Chapitre III des Résultats).

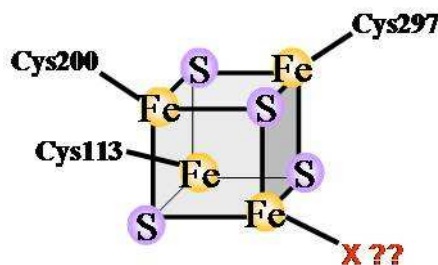


Figure 77 : Représentation de la coordination du centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase d'*E. coli* par les cystéines Cys113, Cys200 et Cys297, X étant le quatrième ligand à déterminer.

Lien entre structure tridimensionnelle et centre [4Fe-4S] de NadA

Deux structures tridimensionnelles obtenues par RX de quinolinate synthase dépourvue de centre métallique existent. Une des structures parue avant le début de ma thèse a été publiée par Sakubara H., il s'agit de la quinolinate synthase de *P. horikoshii* résolue à 2.0 Å (Figure 78A) (Saburaba H., 2005). Une seconde structure d'apoprotéine résolue à 2.8 Å a récemment été déposée dans la PDB par Ealick S.E., il s'agit de la structure RX de la quinolinate synthase de *P. furiosus* (code PDB : 2QSO).

Lorsque l'on observe la structure de la quinolinate synthase de *P. horikoshii*, on peut noter que trois zones de la protéine (79-90 ; 165-175 et 257-260) ne sont pas visibles sur les cartes de densité électronique à cause de leur nature désordonnée. Ces trois régions séparent chacun des 3 domaines de la protéine (Figure 78A). Deux de ces boucles désordonnées contiennent chacune une cystéine impliquée dans la coordination du centre [Fe-S] (Cys83 et Cys170 chez *P. horikoshii* équivalent aux cystéines Cys113 et Cys200 de NadA d'*E. coli*). La troisième cystéine conservée (Cys256) est visible sur la structure, cependant elle se trouve à la limite de la région non définie (257-260). On peut donc penser que l'absence du centre [Fe-S] de la protéine rend certaines boucles mobiles, rendant impossible la résolution de ces dernières et que la présence du centre [4Fe-4S] pourrait apporter l'organisation nécessaire pour l'obtention de la résolution complète de la structure tridimensionnelle de l'enzyme.

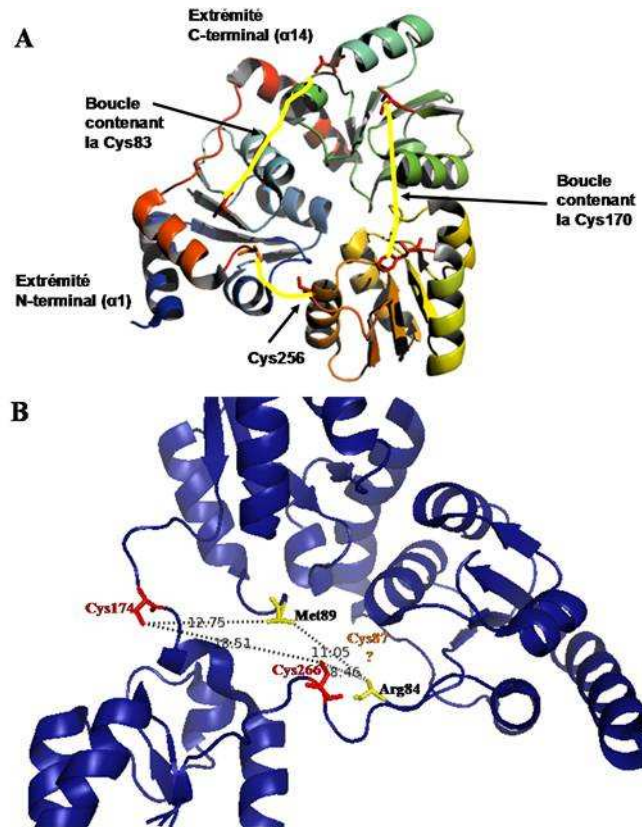


Figure 78 : (A) Structure de la quinolinate synthase de *P. horikoshii* (code PDB : 1WZU). Les trois régions non définies sont mises en évidence par un trait jaune reliant les derniers acides aminés définis de chacune de ces zones (79-90 ; 165-175 ; 257-260) et la zone définie suivante. L'extrémité C-terminale est représentée en rouge, l'extrémité N-terminale est en bleu. (B) Agrandissement d'une zone de la structure de la quinolinate synthase de *P. furiosus* (code PDB : 2QSO) contenant les deux cystéines Cys174 et Cys266 (en rouge) conservées ainsi que la zone non résolue comprise entre la Met89 et l'Arg84 (en jaune) dans laquelle se situe la Cys74 (en orange). Les distances (en Å) sont indiquées en noir.

Sur la structure quinolinate synthase de *P. furiosus*, deux des trois cystéines strictement conservées (Cys174 et Cys266 indiquées en rouge sur la Figure 78B) sont résolues, seule la Cys74 (en orange Figure 78B) est située dans une région comprise entre la Met89 et l'Arg84 (en jaune Figure 78B) non déterminée. La mesure des distances entre ces différentes cystéines donne des valeurs incompatibles avec l'existence d'un centre [4Fe-4S] au sein de la protéine sans changement de conformation. Il est donc raisonnable de penser que l'existence du centre [4Fe-4S] implique un changement conformationnel de la protéine. Une des conséquences est que l'on ne peut pas envisager d'utiliser les données structurales obtenues avec les deux apoprotéines pour des études mécanistiques ou dans la recherche de molécules inhibitrices.

Présence d'un pont disulfure entre les cystéines Cys291 et Cys294 essentiel à l'activité

La partie inattendue de notre étude concernant la détermination de la nature des ligands du centre a été la mise en évidence du caractère essentiel des Cys291 et Cys294 dans l'activité *in vivo*. En effet, bien que les protéines NadAC291A et NadAC294A soient capables de coordonner un centre [4Fe-4S], elles sont inactives *in vivo* et dix fois moins actives *in vitro* que la protéine NadA sauvage.

Nous avons pu montrer que la protéine NadA sauvage est capable d'oxyder deux équivalents de NADPH alors que les protéines mutées NadAC291A et NadAC294A (simple et double mutant) n'en oxydent qu'un seul. Le résultat obtenu avec le double mutant nous conduit à proposer que les cystéines Cys291 et Cys294 sont impliquées dans la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. En effet, si ces cystéines (Cys291 et Cys294) formaient un pont disulfure intermoléculaire, la quantité de pont disulfure dosé pour les deux simples mutants serait alors supérieure à 1 pont disulfure par monomère de protéine (Figure 79).

Nous avons également pu mettre en évidence l'importance de ce pont disulfure dans l'activité de l'enzyme NadA. Nous avons constaté que les protéines mutées NadAC291A et NadAC294A ne possèdent que quelques dizaines de pourcents d'activité enzymatique *in vitro* par rapport à la protéine sauvage. Un pourcentage d'activité enzymatique similaire (de l'ordre de 25 %) est obtenu *in vitro* lors de la réduction des ponts disulfures de la protéine sauvage par le DTT ou par le système Trx/Trx/NAPDH préalablement à la mesure d'activité enzymatique nous conduisant à penser que la protéine sauvage dépourvue de pont(s) disulfure(s) a une activité de quelques dizaines de pourcents par rapport à la protéine sauvage contenant des ponts disulfures. Cependant, nous n'observons aucune activité *in vivo* puisqu'aucune croissance bactérienne n'est détectée lors des tests de complémentation de la souche MG1655 Δ nadA avec les plasmides pT7-NadAC291A et pT7-NadAC294A. Comment expliquer le manque total d'activité *in vivo* et les quelques dizaines de pourcents d'activité mesurée *in vitro* mesuré sur les protéines mutées purifiées (NadAC291A et NadAC294A) ? Une possibilité est que les protéines NadAC291A et NadAC294A présentent qu'une dizaine de pourcents d'activité *in vivo*, mais que ces quelques pourcents ne suffisent pas à combler les besoins de la bactérie en acide quinolinique, et par conséquent en NAD, d'où l'absence totale de croissance bactérienne.

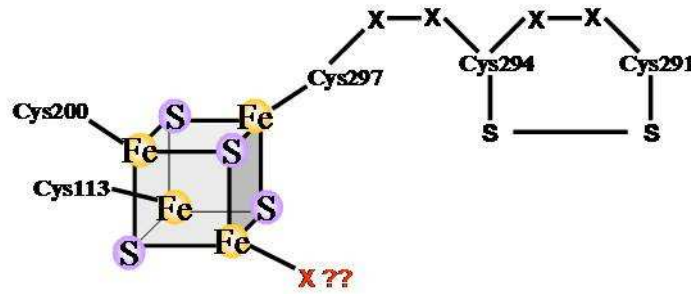


Figure 79 : Structure du centre [4Fe-4S] de la protéine NadA d'*E. coli* avec la schématisation des ligands et du pont disulfure existant entre les Cys291 et Cys294.

Nous avons émis plusieurs hypothèses quant au rôle essentiel de ce pont disulfure entre les cystéines Cys291 et Cys294. La première est liée à sa localisation avec un rôle stabilisation du centre fer-soufre. En effet, le motif $C_{291}XXC_{294}$ est très proche de la Cys297 essentielle à la coordination du centre [4Fe-4S], et on peut donc supposer que la destruction de ce pont disulfure puisse influencer le repliement de la protéine et la stabilité du centre métallique. Ceci ne semble pas être le cas puisque le centre métallique des protéines NadAC291A et NadAC294A possède une stabilité similaire à la protéine NadA sauvage lors de l'exposition à l'oxygène. Une autre hypothèse serait un rôle rédox du pont disulfure. Cette hypothèse est favorisée par l'équipe de Booker S. qui dans une étude parallèle à la notre sur les mutants cystéines de NadA, confirme la formation d'un pont disulfure entre les Cys291 et Cys294 pour lequel il mesure un potentiel redox de -264 mV (/ENH) (Saunders A.H., 2008a). Dans cette étude, il est montré une régulation de l'activité de l'enzyme par le pont disulfure existant entre les cystéines Cys291 et Cys294 : une augmentation de l'activité d'un facteur 3,3 de la protéine sauvage est observée lors de son exposition 150s à l'oxygène préalablement à la mesure d'activité enzymatique, la valeur de la $V_{max}/[E_T]$ (avec $[E_T]$ correspondant à la concentration de NadA dans le test) passant de 5.8 min^{-1} en conditions d'anaérobiose à 19.2 min^{-1} après la brève exposition à l'oxygène. Inversement, lorsque le pont disulfure est réduit une perte d'activité (notons qu'elle n'est pas totale) est constatée ($V_{max}/[E_T]=1.6 \text{ min}^{-1}$). Cette observation d'un changement de l'activité enzymatique de la protéine lors d'une exposition brève à l'oxygène suggère une régulation redox de l'enzyme qui peut être liée : soit à la formation du pont disulfure (entre les cystéines 291 et 294), soit à l'oxydation du centre [4Fe-4S] en $[4Fe-4S]^{3+}$ ou $[3Fe-4S]^{+1}$. L'existence de l'espèce $[4Fe-4S]^{3+}$ n'a pas été observée par RPE et seulement 10 % de $[3Fe-4S]^{+1}$ ont été détectés ne permettant pas de conclure à une activation de la protéine par oxydation du centre métallique (Saunders A.H., 2008a).

Ainsi, il semble raisonnable de conclure qu'il existe une régulation de l'activité par oxydation-réduction du pont disulfure, avec une protéine active quand le pont disulfure existe,

et une protéine inactive lorsque celui-ci est réduit comme proposé par Saunders A. H et représenté Figure 80.

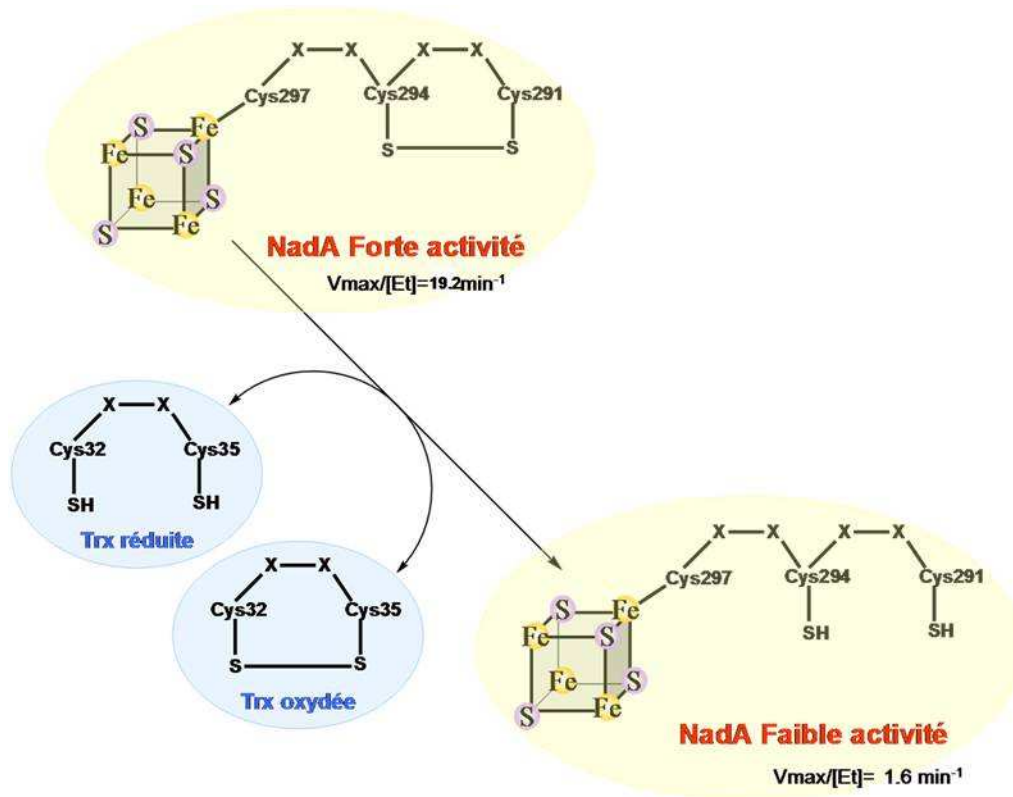


Figure 80 : Proposition pour une régulation rédox de l'activité quinolinate synthase par l'intermédiaire de la formation du pont disulfure entre les cystéines Cys294 et Cys291 (Saunders A.H., 2008a).

Cependant lorsqu'on observe un alignement de séquences en acides aminés de quinolinate synthases de divers organismes, on s'aperçoit que les cystéines Cys291 et Cys294 impliquées dans le pont disulfure chez *E. coli* ne sont pas conservées chez tous les organismes comme par exemple chez *M. tuberculosis*, *T. maritima*, *P. horikoshii* et *B. subtilis* (Rousset C., 2008). L'existence d'un pont disulfure chez ces organismes, nécessaire pour l'activité mais impliquant des cystéines autres que celles mises en évidence chez *E. coli*, est possible mais peu probable au vu de la faible conservation de ces résidus. Existe-t-il donc un lien entre le métabolisme de la bactérie (aérobie/anaérobie), et l'existence d'un tel pont disulfure (donc des cystéines conservées présentes dans le motif CX₂C) contrôlant l'activité enzymatique ? Il apparaît comme une règle générale que chez les bactéries qui possèdent la capacité de vivre en anaérobiose et en aérobie (bactéries anaérobies « facultatives »), *E. coli*, *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, la présence des cystéines sous forme du motif CX₂C est observée. Par opposition, les bactéries capables de pousser soit en anaérobiose,

soit en aérobiose (bactéries « strictes »), *M. tuberculosis*, *T. maritima*, *H. pylori*, *P. horikoshii*, *B. subtilis*, *C. acetobutylicum* et *L. innocua*), ne possèdent pas ces cystéines (CX₂C) dans leur séquence et par conséquent ne possèdent probablement pas de pont disulfure. Le pont disulfure présent dans le premier type de bactéries (« facultatives ») pourrait donc servir de senseur rédox pour la protéine lors du changement de conditions aérobie/anaérobie. En effet, il a été montré que lors du passage d'une croissance aérobiose en anaérobiose, chez certaines bactéries facultatives, le niveau de NAD intracellulaire diminue rapidement (Wimpenny J.W.T., 1972). Cette diminution pourrait être reliée à une diminution de l'activité de la quinolinate synthase.

Informations apportées par notre étude sur l'existence d'un complexe NadA/ NadB

Comme je l'ai brièvement évoqué dans mon introduction, la question de la formation d'un complexe entre les protéines NadA et NadB reste ouverte puisqu'aucune donnée biochimique disponible à ce jour ne permet de répondre de façon claire à cette question. Cependant une multitude de constatations ont été faites sur cette question. Je vais rapidement à nouveau faire un état de l'art de l'apport des différentes études parues avant mon arrivée en thèse, celles obtenues par moi-même ainsi que par d'autres équipes entre 2005 et 2008. Le fonctionnement en complexe des protéines NadA et NadB vient du fait que dans de nombreux organismes les gènes *nadA* et *nadB* sont situés dans le même opéron ; de plus NadB catalyse la formation de l'iminoaspartate qui est un des substrats de NadA. Donc il ne paraît pas incohérent de penser que la protéine NadB doit interagir avec NadA afin de protéger ce substrat instable et le lui fournir rapidement. Cependant, deux études mènent à penser qu'une interaction entre les deux protéines n'est pas nécessaire puisque premièrement, il a été montré que lorsque les protéines NadA et NadB sont séparées par une membrane de dialyse interdisant toute interaction physique des deux enzymes, de l'acide quinolinique est formé dans les deux compartiments (Wicks F.D., 1978), et que deuxièmement, la quinolinate synthase peut utiliser de l'iminoaspartate généré chimiquement à partir de sulfate d'ammonium et d'acide oxaloacétique pour synthétiser l'acide quinolinique, sans nécessité de NadB (Nasu S., 1981). Ces deux expériences montrent que la quinolinate synthase n'a pas besoin d'interagir avec la L-Aspartate oxydase. Une étude parue tout récemment (Marinoni I., 2008) conclut sur le fait que si les protéines NadA et NadB interagissent alors ceci se fait avec une faible affinité, ceci basé sur des expériences d'affinité : la protéine NadA fusionnée à de la GST (Glutathion S-transférase) est immobilisée sur une colonne d'affinité

gluthation sépharose, la protéine NadB pure est ensuite passée sur cette même colonne, après incubation, les protéines sont éluées. L'analyse sur gel d'électrophorèse des protéines éluées a révélé la présence de NadB en faible quantité par rapport à NadA mettant en évidence une faible interaction entre les deux protéines (Marinoni I., 2008). L'information principale apportée par mon étude, et qui vient renforcer le fait qu'il n'existe pas de complexe NadA/NadB vient du fait que l'utilisation d'un rapport NadA/NadB de 1/1 n'est pas nécessaire pour obtenir une activité quinolinate synthase maximale. En effet, une activité maximale de NadA est atteinte lors de l'utilisation de dix fois moins de NadB que de NadA. On peut donc en faisant le bilan des différentes données disponibles dans la littérature exclure la formation d'un complexe entre NadA et NadB. On peut cependant proposer qu'un complexe transitoire entre les deux protéines puisse mener à un apport efficace et protégé de l'iminoaspartate directement utilisable par NadA.

La quinolinate synthase d'A. thaliana : un modèle pour le processus d'assemblage des centres [Fe-S]

Nous avons mis en évidence le premier exemple d'un organisme eucaryote, *A. thaliana* qui utilise la protéine NadA pour la biosynthèse du NAD : en général, les eucaryotes utilisent la voie de dégradation du Tryptophane (voir Introduction). Par des techniques de biochimie, nous avons montré que la protéine SufE3 possède une double activité : une activité quinolinate synthase possédant un centre [4Fe-4S] essentiel à son activité portée par le domaine C-terminal et une activité SufE, c'est-à-dire de donneur ultime de soufre portée par le domaine N-terminal et dépendante de la cystéine Cys132. Cette dernière activité mise en évidence par S. Ollagnier-de Choudens (Murthy U.M.N., 2007) et non présentée dans mon manuscrit permet la formation *in vitro* du cluster [4Fe-4S] dans le domaine C-terminal à partir de l'apoprotéine SufE3, de fer(II), de L-cystéine et de la cystéine désulfurase de plante (CpNifS). Des études de complémentation *in vivo* ont permis de monter par ailleurs le caractère essentiel du domaine SufE ; en effet un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal seulement et pas le domaine N-terminal ne complémente pas la souche *E. coli nadA*⁻ alors que le plasmide contenant le gène SufE3 dans son intégralité le fait. De plus, un plasmide portant le gène SufE3 muté au niveau de la cystéine catalytique conservée (Cys132 en Ser132) n'est pas capable de complémenter cette même souche (Murthy U.M.N., 2007). Ces résultats n'ont pas été rapportés dans ce manuscrit car ils ont été effectués par S. Ollagnier-de Choudens, mais méritent d'être cités ici pour

illustrer le caractère exceptionnel de cette quinolinate synthase d'*A. thaliana*. L'originalité de ce système réside dans l'association entre ces deux domaines. En effet, c'est la première fois que l'on identifie une protéine fer-soufre dotée d'un domaine lui permettant l'assemblage et/ou la réparation de son centre fer-soufre. SufE3 est localisée au niveau du chloroplaste (Murthy U.M.N., 2007). Ce compartiment est le lieu de la photosynthèse, processus générant des conditions particulièrement oxydantes et donc a priori incompatibles avec le maintien d'un centre [Fe-S] intègre. On peut donc aisément comprendre la nécessité d'une telle association de domaines (SufE et NadA) dans ce compartiment cellulaire « oxydant » peu favorable au maintien de l'activité des protéines fer-soufre. De plus, cette association donne du crédit à l'hypothèse selon laquelle le centre fer-soufre est essentiel à l'activité de l'enzyme et doit être maintenu autant que possible intègre. Par contre, il est assez intrigant de constater que la protéine NadA ne possède qu'un domaine fournissant du soufre pour la synthèse /réparation de son cluster situé dans le domaine quinolinate synthase et pas de domaine associé à une activité liée au fer. Une explication pourrait être que la production de soufre dans la cellule passe nécessairement par une activité enzymatique alors que le fer est déjà présent dans les cellules (au niveau de la ferritine probablement dans les plastes) et doit seulement être transporté/ mobilisé jusqu'à sa cible (NadA).

Chapitre II

La quínolínate synthase comme cible d'agents antibactériens

Ce deuxième chapitre de résultats est axé sur la stratégie antibactérienne visant à inhiber la quinolinate synthase. En effet comme je l'ai détaillé dans mon introduction, chez certains microorganismes pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, la voie de secours de biosynthèse du NAD n'est pas fonctionnelle. De plus, le gène *nadA* a été montré comme essentiel à la croissance et la virulence de *Mycobacterium tuberculosis* (Sasseti C.M., 2003). La quinolinate synthase qui est donc essentielle chez la mycobactérie est absente chez l'homme où l'acide quinolinique provient de la dégradation du L-Tryptophane. Ceci fait de l'enzyme NadA de *M. tuberculosis* une cible de choix pour des agents antibactériens sélectifs.

Qui dit nouvelle cible, dit un très large panel de molécules potentiellement inhibitrices à tester. Ce paramètre à l'esprit, une stratégie de criblage haut débit, consistant à tester le potentiel inhibiteur d'un grand nombre de molécules issues de différentes chimiothèques en un minimum de temps aurait pu paraître très appropriée. Malheureusement sa mise en place n'est pas envisageable pour la quinolinate synthase. En effet, la sensibilité du centre [4Fe-4S] de l'enzyme à l'oxygène nécessiterait l'utilisation d'un robot en conditions d'anaérobiose. Frein pour l'utilisation d'une stratégie de criblage haut débit, le centre métallique de l'enzyme constitue par ailleurs, une cible originale de potentiels inhibiteurs.

L'enzyme de *M. tuberculosis* a été purifiée et caractérisée, et ceci est rapporté dans le Chapitre I des Résultats. Dans ce chapitre, nous avons testé différentes molécules potentiellement inhibitrices de l'activité quinolinate synthase de *M. tuberculosis* mais également d'*E. coli*.

I- Les constantes cinétiques de la quinolinate synthase d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*.

Préliminairement à toutes les expériences avec des molécules potentiellement inhibitrices, il était primordial de déterminer les paramètres cinétiques des enzymes sur lesquelles nous allons effectuer les tests d'inhibition. J'ai déjà présenté ces paramètres pour la quinolinate synthase d'*E. coli* dans le Chapitre I des Résultats. Je les rappelle dans le début de ce chapitre, pour comparaison avec les constantes cinétiques que j'ai obtenues pour la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* qui constitue notre cible d'intérêt dans la recherche de nouvelles molécules antibactériennes.

• **Détermination des constantes cinétiques de la quinolinate synthase de *M. tuberculosis***

Après avoir déterminé que la formation d'acide quinolinique par la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* était linéaire sur 30 minutes (avec une concentration de DHAP de 4 mM), de la même façon que ce qui avait été effectué pour NadA d'*E. coli* ; nous avons déterminé sur un temps de 20 minutes la V_{\max} et le K_m de la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* pour le DHAP. Ceci a été réalisé en faisant varier la concentration de DHAP dans un test où on ajoute du L-Asparate (33 mM), du fumarate (25 mM) et les enzymes NadA et NadB dans un rapport 1/1 et à une concentration de 7.1 μM . Les valeurs obtenues sont indiquées dans la Figure 81 avec pour comparaison celles obtenues pour la quinolinate synthase d'*E. coli*.

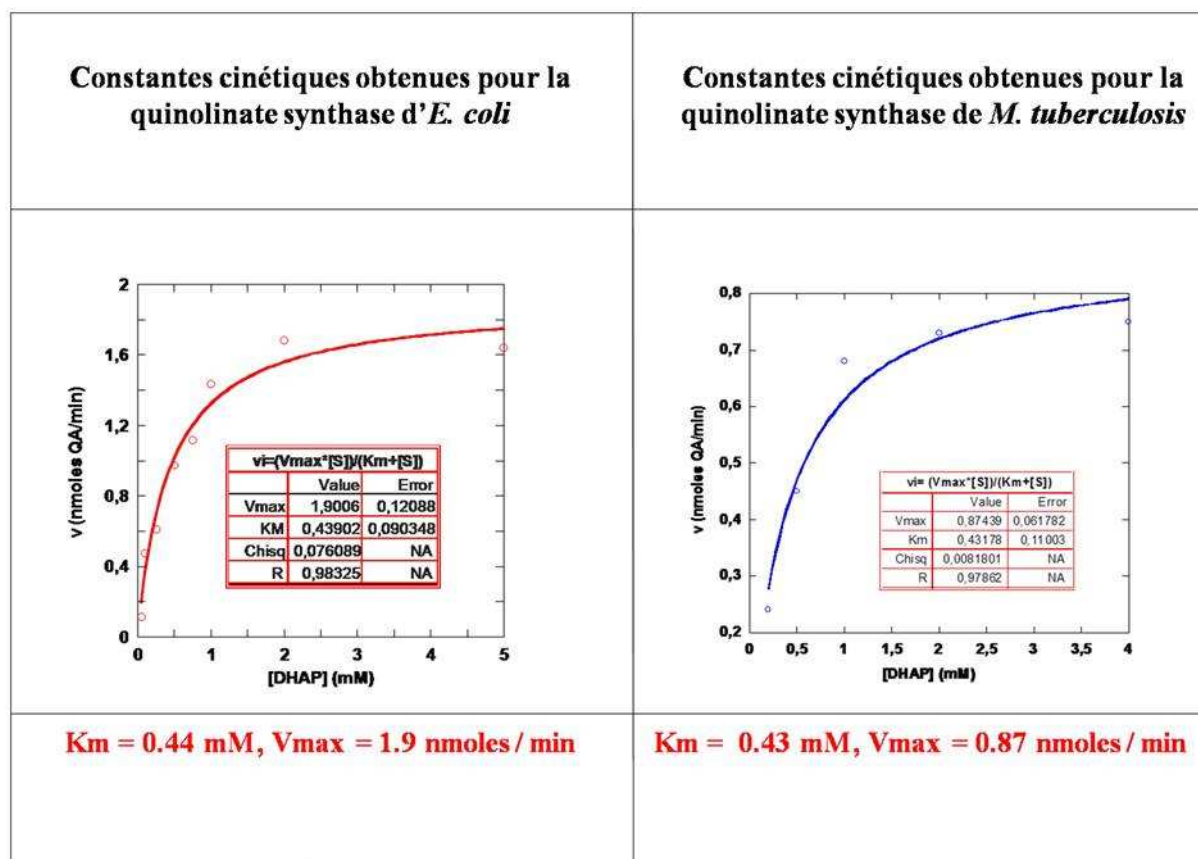


Figure 81 : Les différentes constantes cinétiques déterminées pour la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* (K_m et V_{max}) en comparaison de celles obtenues avec NadA d'*E. coli*.

D'après la Figure 81, on remarque que des valeurs de constantes d'affinité (K_m) pour le DHAP similaires ont été obtenues pour la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* et d'*E. coli* avec respectivement des valeurs de 0.43 mM et 0.44 mM. Par contre, on remarque que la V_{max} de NadA de *M. tuberculosis* est inférieure à la V_{max} de NadA d'*E. coli* (V_{max} 1.9 nmoles/min pour *E. coli* contre $V_{max} = 0.87$ nmoles/min pour *M. tuberculosis*). Il est important de noter que les constantes cinétiques de cette dernière ont été déterminées en utilisant la L-Aspartate oxydase d'*E. coli*; l'utilisation de la L-Aspartate oxydase de *M. tuberculosis* permettrait peut être d'augmenter l'activité de l'enzyme.

Les résultats obtenus ci-dessus, notamment la détermination du K_m pour le DHAP, nous ont conduit à choisir, pour les tests d'inhibition effectués sur les deux enzymes NadA (*E. coli* et *M. tuberculosis*), une concentration de DHAP de 2 mM, et une durée du test enzymatique de 20 minutes.

II- La quinolinate synthase comme une cible d'agents antibactériens

La quinolinate synthase d'*E. coli* étant plus active et obtenue en quantité plus importante que celle de *M. tuberculosis*, nous avons choisi d'effectuer les premiers tests d'inhibition sur cette dernière, et dans un second temps de tester les molécules les plus actives sur la réelle cible d'intérêt que constitue la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*.

II-1 Choix et tests des différentes molécules inhibitrices sur la quinolinate synthase d'*E. coli*

Nous avons choisi de tester plusieurs familles de molécules : des molécules analogues des substrats de l'enzyme (DHAP et Iminoaspartate) ainsi que des molécules analogues d'intermédiaires réactionnels et du produit de la réaction, l'acide quinolinique.

a. Les différentes familles de molécules testées

Le DHAP est le substrat de trois enzymes du métabolisme énergétique de la cellule bactérienne. Ces enzymes sont la triose phosphate isomérase (TIM), la glycérophosphate déshydrogénase (GPDH) et la fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBPA). Des inhibiteurs de chacune de ces enzymes existent dont certains ont été synthétisés par M. Thérissod de l'ICMMO à Orsay, les molécules synthétisées étant des analogues du DHAP. Le Professeur M. Thérissod nous a fourni certaines de ces molécules (numérotées de 1 à 8 dans le Tableau 37) que nous avons testées sur notre enzyme. Ces molécules constituent ce que j'appelle « les analogues du DHAP ».

Les autres molécules testées analogues de l'iminoaspartate (Tableau 37, composés 9 et 10) et de l'acide quinolinique ou de certains intermédiaires réactionnels (Tableau 37, composés 11 à 21) ont été choisies pour leur ressemblance chimique ou stérique avec le substrat de l'enzyme, les intermédiaires réactionnels ou encore le produit de la réaction, l'acide quinolinique. Sur la Figure 82 sont indiqués les endroits dans le mécanisme réactionnel où les analogues de substrats, d'intermédiaires réactionnels et du produit de la réaction pourraient intervenir c'est-à-dire avoir un rôle inhibiteur. Dans un souci de simplification, j'ai choisi l'hypothèse de mécanisme proposée par Nasu S. pour présenter les possibles points d'impact des molécules (Nasu S., 1982a).

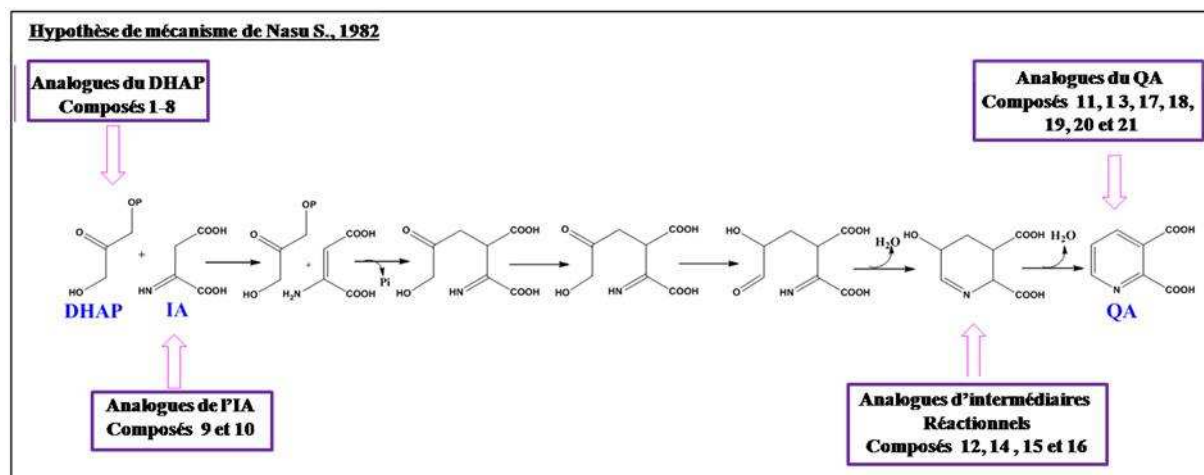
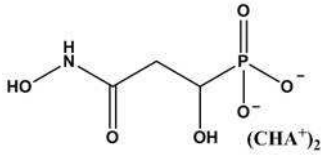
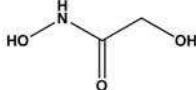
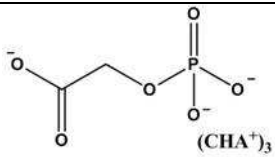
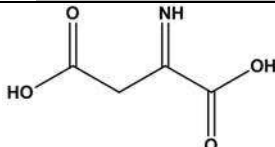
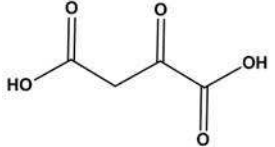
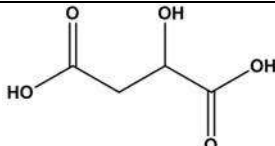
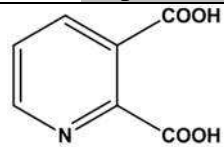
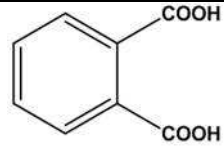
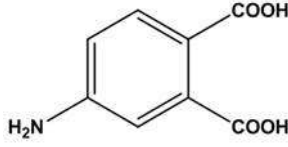


Figure 82 : Possibles points d'impacts des différentes molécules testées sur le mécanisme réactionnel.

N°	Structure chimique	Caractéristiques
		DiHydroxyAcétone Phosphate DHAP MM = 170,1 g/mol
1		Acide PhosphoGlycoloHydroxamique PGH MM = 353,39 g/mol
2		PhosphoGlycoloHydraZide PGHz MM = 368,41 g/mol
3		Acide 3-amino-3-phosphono-propionohydroxamique PnGH MM = 283,26 g/mol
4		Acide 3-phosphono-propionohydroxamique PnGH MM = 367,42 g/mol
5		Phosphoglycoloamide PGAm MM = 353,39 g/mol

6		<p>Acide-3-phosphono-3-hydroxy-propionohydroxamique PoGH MM = 383,42 g/mol</p>
7		<p>Acide glycolohydroxamique GHA MM = 87 g/mol</p>
8		<p>Acide phosphoglycolique PGA MM = 453 g/mol</p>
<p>➤ Analogues de l'iminoaspartate</p>		
		<p>Iminoaspartate IA MM = 131,09 g/mol</p>
9		<p>Acide oxaloacétique OAA MM = 132,07 g/mol</p>
10		<p>Acide hydroxybutanedioïque (ou D,L-Acide malique) MA MM = 178,05 g/mol</p>
<p>➤ Analogues cycliques d'intermédiaires réactionnels ou du produit (acide quinolinique)</p>		
		<p>Acide Quinolinique QA MM = 167,12 g/mol</p>
11		<p>Acide phtalique AP MM = 166,13 g/mol</p>
12		<p>Acide 4-AminoPhtalique 4-AP MM = 181,15 g/mol</p>

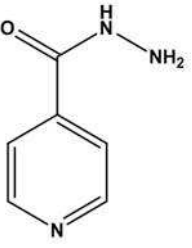
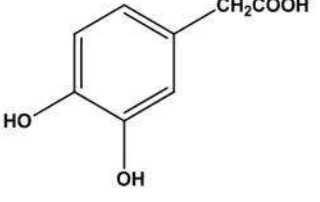
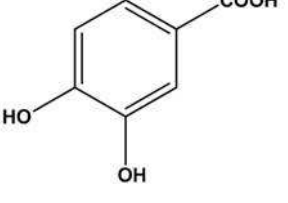
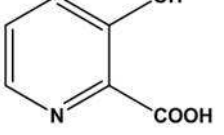
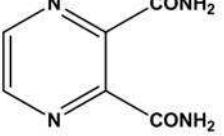
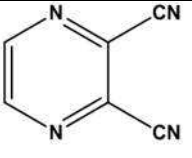
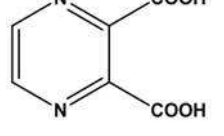
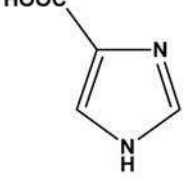
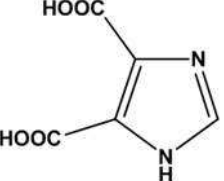
13		Isoniazide (Isonicotinyl hydrazine) INH MM = 137.14 g/mol
14		Acide 3,4-Dihydroxyphénylacétique 3,4-DHPAA MM = 168,15 g/mol
15		Acide 3,4-dihydroxybenzoïque 3,4-DHBA MM = 154,12 g/mol
16		Acide 3-Hydroxypicolinique 3-HPA MM = 139,11 g/mol
17		2,3-Pyrazine dicarbamide 2,3-PDCM MM = 166 g/mol
18		2,3-Pyrazine dicarbonitrile 2,3-PDCN MM = 130 g/mol
19		Acide 2,3-pyrazine dicarboxylique 2,3-PDCA MM = 168 g/mol
20		Acide 5-imidazole carboxylique 5-ImA MM = 112,09 g/mol
21		Acide 4,5-imidazole dicarboxylique 4,5-ImDA MM = 156,1 g/mol

Tableau 37 : Structures chimiques, noms et abréviations des différentes molécules testées

b. Mise au point du test d'inhibition

Comme je l'ai déjà évoqué précédemment, les premiers tests des molécules inhibitrices ont été effectués sur la quinolinate synthase d'*E. coli*. Afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur des différentes molécules, nous avons procédé de la façon suivante. Le premier test enzymatique a été réalisé avec une concentration assez élevée de chacune des molécules (1 mM) de sorte à cibler rapidement « la » ou « les » molécule(s) inhibitrice(s). Dans le cas où une inhibition importante de NadA est observée, un second test enzymatique a été effectué en faisant varier la concentration de la(es) molécule(s) vers des plus basses concentrations afin de déterminer plus précisément le pouvoir inhibiteur de la molécule (IC_{50} et K_i).

Afin de déterminer l'activité inhibitrice des molécules sur NadA, le test enzymatique est effectué dans les conditions suivantes : un même mélange réactionnel contenant le DHAP (2 mM), le L-Aspartate (33 mM), le fumarate (25 mM) et NadA (7.1 μ M) dans le Tampon G du test enzymatique est préparé. Ce mélange est divisé en autant de tests à effectuer, et dans chacun des tubes est additionnée la molécule à tester à la concentration choisie. Après une pré-incubation de chaque tube 5 min à 37 °C, la réaction est initiée par l'ajout de NadB (7.1 μ M) et poursuivie pendant 20 minutes à 37 °C. L'analyse du test par HPLC se fait comme indiqué dans le Chapitre M&M.

Comme contrôles, chaque molécule testée est injectée sur la colonne HPLC dans les mêmes conditions que l'échantillon issu du test enzymatique (avec l'ajout d'acide sulfurique et dilution dans le Tampon TFA pH 2.4), afin de vérifier que son temps de rétention est différent de celui de l'acide quinolinique et qu'ainsi sa présence en excès ne gênera pas la détermination de l'activité quinolinate synthase.

c. Résultats

Les premiers résultats obtenus pour le test des molécules inhibitrices à forte concentration (1 mM) avec NadA (7.1 μ M) sont représentés sur les Figures 83 et 84 qui montrent les activités spécifiques de NadA (%) obtenues pour les différentes molécules testées. Les activités spécifiques sont calculées avec comme référence (100 %) l'activité spécifique de NadA obtenue sans molécule inhibitrice, égale à 0.053 μ moles/min/mg. La Figure 83 concerne les résultats obtenus avec les molécules analogues de l'iminoaspartate et de l'acide quinolinique ou intermédiaires réactionnels alors que la Figure 84 expose les résultats obtenus avec molécules analogues du DHAP. Toutes ces expériences ont été effectuées plusieurs fois et les Figures 83 et 84 correspondent à une expérience isolée, reflétant la tendance obtenue.

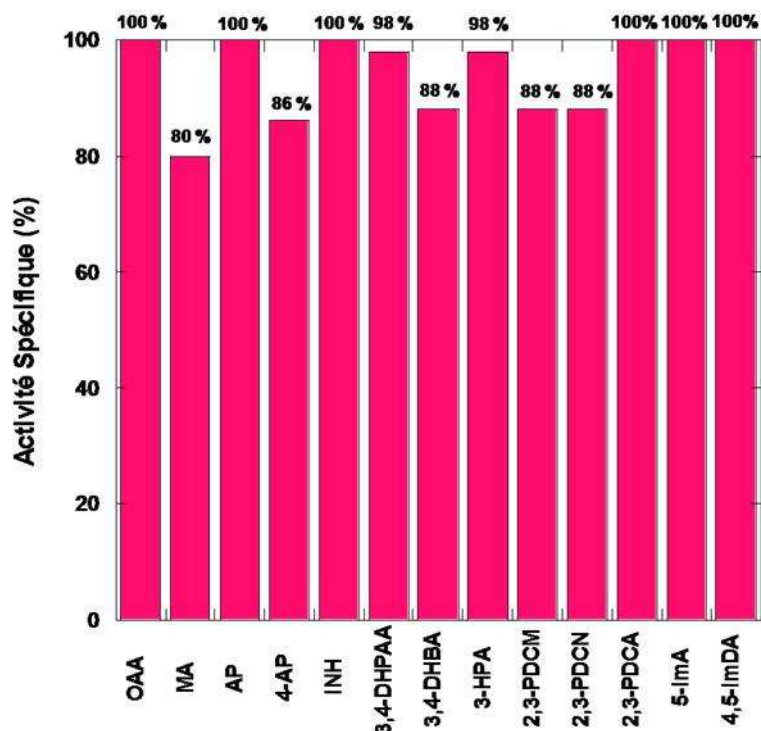


Figure 83 : Activités spécifiques (%) de NadA obtenues lors du test des molécules analogues d'intermédiaires cycliques, d'analogues de l'acide quinolinique ainsi que d'analogues de l'iminoaspartate à une concentration de 1 mM. Les activités spécifiques sont calculées avec comme référence (100 %) l'activité spécifique de NadA obtenue sans molécule inhibitrice qui est égale à 0.053 μ moles/min/mg.

Sur la Figure 83, on constate qu'aucune des molécules cycliques testées analogues de l'acide quinolinique ou d'un intermédiaire réactionnel c'est-à-dire le AP, 4-AP, INH, 3,4-DHPAA, 3,4-DHBA, 3-HPA, 2,3-PDCM, 2,3-PDCN, 2,3-PDCA, 5-ImA et le 4,5-ImDA, ne possède de forte activité inhibitrice sur la quinolinate synthase. En effet, les taux d'inhibition (%) ne dépassent pas 14 % (obtenus avec la 4-AP). Parmi les molécules analogues de l'iminoaspartate, l'acide oxaloacétique (OAA) n'a aucun effet sur l'activité puisqu'on retrouve 100 % d'activité. Notons que ce résultat est plutôt rassurant car nous utilisons cette molécule lors de la génération chimique d'iminoaspartate. Par ailleurs, l'acide oxaloacétique est également le produit de dégradation de l'iminoaspartate, il est donc nécessaire qu'il n'ait aucune activité inhibitrice sur la quinolinate synthase. L'acide malique (MA) également analogue de l'iminoaspartate a une faible activité inhibitrice sur l'enzyme égale à 20 %.

La Figure 84 illustre les résultats que nous avons obtenus lors du test enzymatique avec des molécules analogues du deuxième substrat, le DHAP, ajoutées également à une concentration de 1 mM. Huit molécules ont été testées (PGH, PnGH, PmGH, PGHz, PGAm,

PoGH, GHA et PGA). Les activités spécifiques obtenues (Figure 84) montrent que toutes les molécules sont inhibitrices de NadA. On distingue cependant deux groupes :

- Le premier groupe comprend cinq molécules (PGH, PnGH, PmGH, GHA et PoGH) qui inhibent moyennement à fortement la quinolinate synthase avec des pourcentages d'inhibition compris entre 100 % pour le PGH et 56 % pour le PoGH. Parmi ces molécules, le PGH se distingue comme étant particulièrement actif, puisque l'on observe la perte totale de l'activité enzymatique à la concentration de 1 mM.
- Le second groupe de molécules est constitué de molécules qui ont un pouvoir inhibiteur plus modéré à faible. Le PGAm et le PGHz conduisent respectivement à 36 % et 35 % d'inhibition, le PGA inhibe beaucoup plus faiblement (10 %).

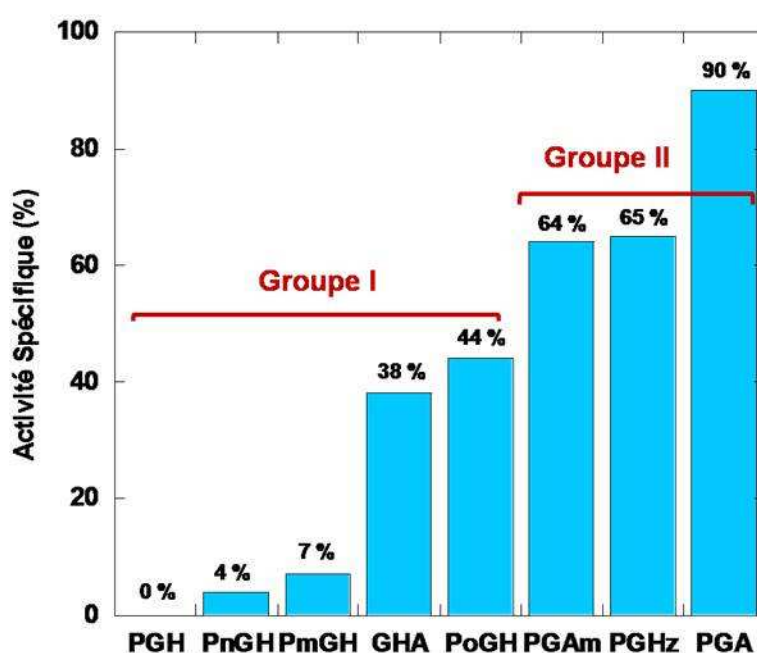


Figure 84 : Activités spécifiques (%) de NadA d'*E. coli* obtenues lors du test enzymatique en présence des molécules analogues du DHAP (1 mM). L'activité spécifique de référence correspondant à 100 % c'est-à-dire en l'absence d'inhibiteur est égale à 0.053 μ mole/min/mg.

Ayant mis en évidence 5 molécules (PGH, PnGH, PmGH, GHA et PoGH), analogues du DHAP, présentant un pouvoir inhibiteur significatif, celles-ci ont ensuite été testées à plus faibles concentrations. Les trois concentrations testées sont 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M. Les résultats obtenus, indiqués dans la Figure 85, confirment le comportement inhibiteur observé lors du test des molécules à 1 mM. Cependant, on peut observer 3 niveaux d'inhibition :

- Le PoGH et le GHA ont le même pouvoir inhibiteur avec une perte seulement d'environ 20 % de l'activité à une concentration de 10 μ M.

- Le PnGH et le PmGH inhibent également l'enzyme de la même façon avec une perte de l'activité située entre 30 et 40 % à une concentration de 10 μM .
- Le PGH montre un comportement très différent des 4 autres molécules puisque l'on observe plus de 80 % d'inhibition de l'activité pour une concentration de 10 μM .

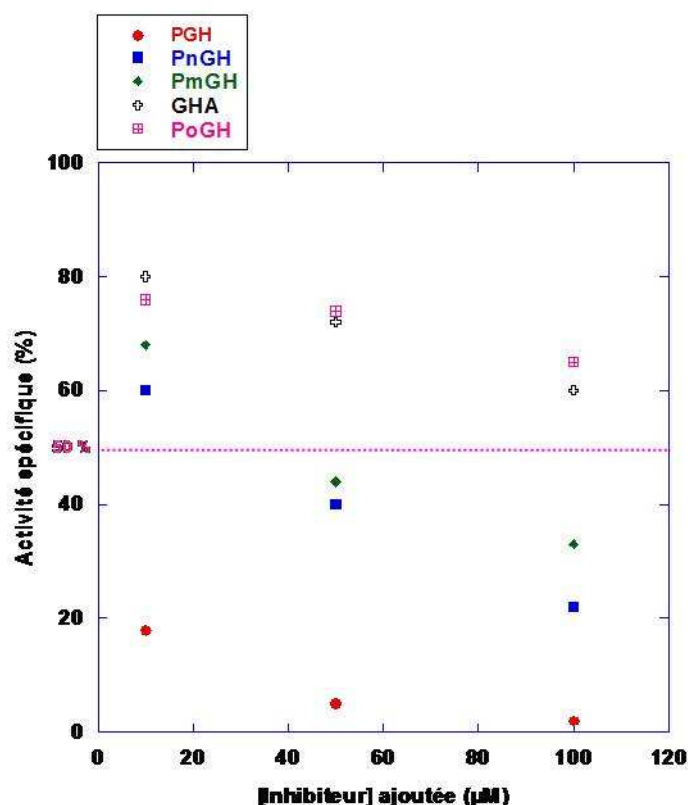


Figure 85 : Activité spécifique (%) de la quinolinate synthase d'*E. coli* lors du test enzymatique en présence des cinq molécules du groupe I analogues du DHAP, testées à des concentrations de 10 μM , 50 μM et 100 μM . Les concentrations de NadA et de NadB sont 7.1 μM . L'activité spécifique de NadA correspondant à 100 % est égale à 0.058 $\mu\text{moles/min/mg}$.

Lorsqu'on regarde de plus près la structure chimique des 5 molécules ayant la plus forte activité inhibitrice, indiquées dans la Figure 86, que sont le PGH, le PnGH, le PmGH, le GHA et le PoGH, on constate que toutes possèdent une fonction acide hydroxamique entourée en bleu sur la Figure 86. Les trois molécules (PGHz, PGAm et PGA) qui ne possèdent pas la fonction hydroxamate possèdent des pouvoirs inhibiteurs moins importants, ce qui nous conduit à penser que la fonction hydroxamate est importante pour l'inhibition. Afin de vérifier cela, nous avons testé l'effet de l'hydroxyurée à 1 mM qui contient une fonction hydroxamate et dont la structure chimique est indiquée sur la Figure 87. L'inhibition de l'activité quinolinate synthase (%) obtenue avec cette molécule est très faible, de l'ordre de quelques pourcents (4 %).

Ces résultats nous mènent à conclure que globalement pour obtenir une bonne inhibition de l'activité quinolinate synthase comme c'est le cas avec le PGH, le PnGH, PmGH, et PoGH la présence à la fois de la fonction acide hydroxamique et de la partie phosphate sont nécessaires. Notons toutefois que le GHA fait exception puisque cette molécule présente un pouvoir d'inhibition sensiblement similaire à celui obtenu avec PoGH alors qu'elle ne possède pas de partie phosphate.

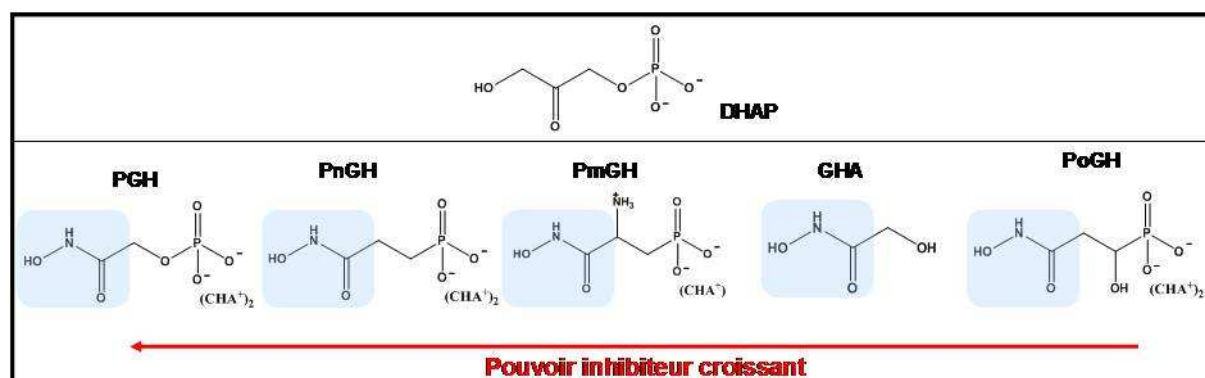


Figure 86 : Classement des cinq molécules inhibitrices de l'activité quinolinate synthase d'*E. coli* par pouvoir inhibiteur croissant. La fonction acide hydroxamique est entourée en bleu.

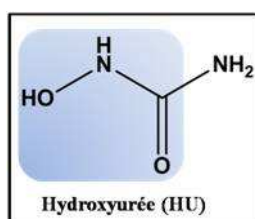


Figure 87 : Structure chimique de l'hydroxyurée (HU)

II-2 Le PGH comme inhibiteur de la quinolinate synthase d'*E. coli*.

Au vu de la forte inhibition du PGH sur l'activité quinolinate synthase, nous avons voulu aller un peu plus loin dans l'analyse de cette inhibition et déterminer les différents paramètres cinétiques du PGH (IC_{50} et K_i) sur NadA d'*E. coli*.

a. Spécificité de l'inhibition

Le test quinolinate synthase met en jeu deux enzymes NadA, la quinolinate synthase, mais également la L-Aspartate oxydase (NadB). Avant d'aller plus loin dans l'étude de l'inhibition, il est important de s'assurer que l'inhibition de l'activité quinolinate synthase

obtenue avec le PGH est spécifique de NadA et n'affecte pas l'activité de la L-Aspartate oxydase, NadB.

Afin de répondre à cette question, nous avons substitué l'utilisation de NadB dans le test enzymatique par une synthèse chimique d'iminoaspartate grâce au mélange d'acide oxaloacétique (5 mM) et de sulfate d'ammonium (10 mM). Nous avons alors comparé l'activité spécifique obtenue dans ces conditions en présence de PGH avec celle obtenue lorsque l'iminoaspartate est généré enzymatiquement par NadB. Les mesures d'activité quinolinate synthase ont été réalisées pour deux concentrations de PGH (15 μ M et 150 μ M). La Figure 88 rapporte les résultats obtenus en exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur. Cette expérience a été effectuée trois fois et la Figure 88 correspondant à une expérience isolée reflétant la tendance obtenue. On observe que pour les deux concentrations de PGH, 15 et 150 μ M, on obtient les mêmes pourcentages d'inhibition de l'activité quinolinate synthase, que l'iminoaspartate soit généré chimiquement ou enzymatiquement. A une concentration de 15 μ M en PGH, on trouve 80 % d'inhibition de l'activité lorsque IA est généré chimiquement, contre 84 % d'inhibition lorsque celui-ci est généré enzymatiquement ; et pour une concentration de 150 μ M en PGH, on a dans les deux cas une perte quasi-totale de l'activité enzymatique (98 % et 99 % d'inhibition). **Ces résultats montrent que le PGH cible spécifiquement la quinolinate synthase (NadA).**

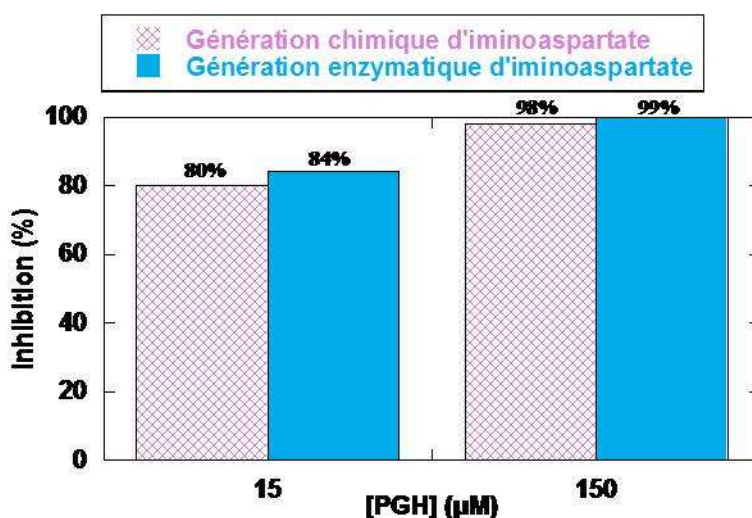


Figure 88 : Inhibition (en %) de l'activité quinolinate synthase d'*E. coli* pour deux concentrations de PGH (15 μ M et 150 μ M) avec une génération chimique (carré rose) ou enzymatique (bleu) d'iminoaspartate. Les tests enzymatiques sont réalisés avec du DHAP (2 mM), du L-Aspartate (33 mM) et du fumarate (25 mM) et NadA (7.1 μ M). Lors de la génération enzymatique d'IA, NadB a une concentration de 7.1 μ M, lors de la génération chimique d'IA, OAA et AS sont à des concentrations respectivement de 5 mM et 10 mM. Dans ce test, l'activité spécifique de NadA de référence en l'absence d'inhibiteur est égale à 0.056 μ moles/min/mg.

b. Détermination des constantes cinétiques

• **Définition de l'IC₅₀ du PGH pour NadA d'*E. coli***

Nous avons déterminé l'IC₅₀ du PGH sur l'activité quinolinate synthase d'*E. coli*. L'IC₅₀ est définie comme la concentration d'un composé conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité de l'enzyme. Nous avons donc effectué le même test enzymatique que celui présenté Figure 85 en faisant varier la concentration de PGH de 0 à 15 µM, et avons déterminé pour quelle concentration de PGH l'activité spécifique de NadA est égale à 50 %. Dans ce test, je rappelle que NadA et NadB sont utilisées dans un rapport 1/1 (à 7.1 µM), le DHAP à 2 mM, le L-Asparate à 33 mM et le fumarate à 25 mM. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 89. Le chromatogramme Figure 89A illustre l'effet des concentrations croissantes de PGH sur la production d'acide quinolinique ; on voit alors clairement que le pic correspondant à l'acide quinolinique élué à 10.2 min diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de PGH. La Figure 89B rapporte les activités spécifiques de NadA calculées pour chaque concentration de PGH ajoutée. D'emblée, on observe un comportement assez atypique de l'inhibition. En effet, la diminution d'activité quinolinate synthase est assez rapide pour les faibles concentrations de PGH, avec une perte de 60 % de l'activité de l'enzyme pour des concentrations de PGH inférieures à 5 µM. Au-delà de cette concentration, la perte d'activité est plus lente, puisqu'il faut un rapport 1/1 (PGH/NadA) pour atteindre 70 % d'inhibition et une inhibition totale de l'activité est obtenue à des concentrations supérieures à 100 µM de PGH (Voir l'encart de la Figure 89B). La concentration pour laquelle on a une inhibition de 50 % de l'activité quinolinate synthase d'après la Figure 89B est comprise entre 2.5 et 3 µM de PGH pour une concentration de 7.1 µM de quinolinate synthase. Cette expérience a été effectuée trois fois et la Figure 89B correspondant à une expérience isolée, reflète la tendance obtenue.

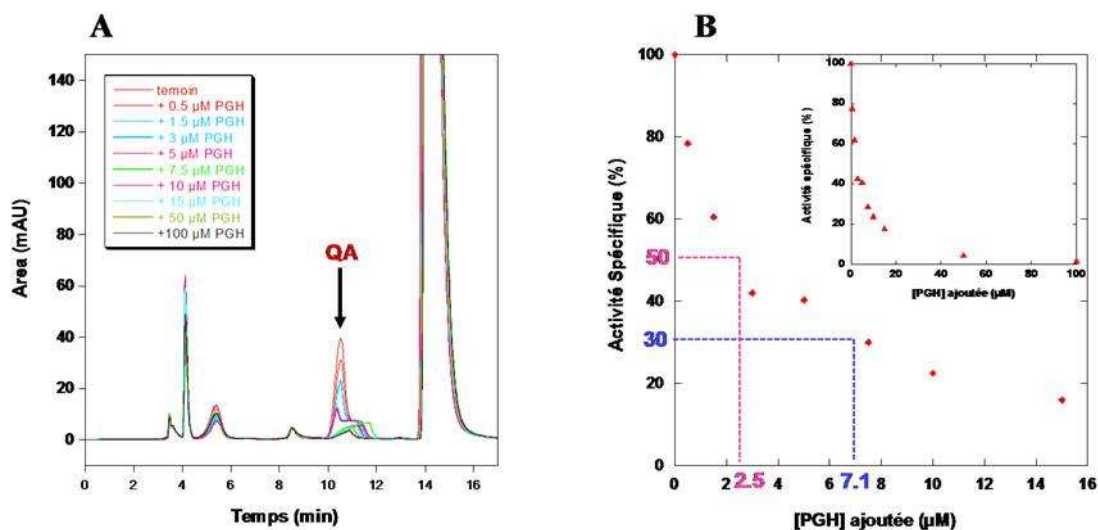


Figure 89 : (A) Superposition des chromatogrammes obtenus après les tests enzymatiques en présence de différentes concentrations de PGH (de 0 à 100 μM). (B) Inhibition de NadA (7.1 μM) par le PGH : Détermination de l'IC₅₀ obtenue après l'ajout de différentes concentrations de PGH. La concentration en PGH pour 50 % d'inhibition de l'activité (IC₅₀) est indiquée par les pointillés en rose ; l'activité enzymatique obtenue pour une quantité stœchiométrique enzyme/inhibiteur égale à 7.1 μM est indiquée par les pointillés en bleu.

- **Définition du K_i du PGH pour NadA d'*E. coli***

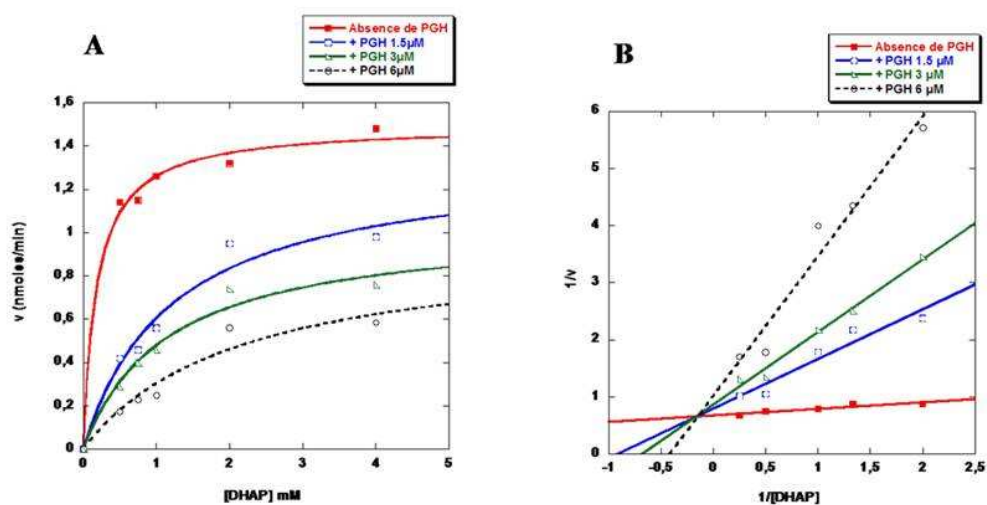
Nous avons ensuite déterminé le K_i c'est-à-dire la constante d'inhibition du PGH pour la quinolinate synthase. Cette constante cinétique est importante puisqu'elle permet d'avoir accès à des informations primordiales comme l'affinité enzyme-inhibiteur et le type d'inhibition exercé par la molécule sur l'enzyme. Pour rappel et de façon simple, une molécule peut inhiber une enzyme de différentes façons :

- 1) On appelle **inhibition compétitive** lorsque la molécule peut prendre la place du substrat dans son site actif empêchant la fixation du substrat.
- 2) On appelle **inhibition non compétitive** lorsque l'inhibiteur se fixe sur un deuxième site différent de celui du substrat, dans ce cas l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme avec ou sans substrat.
- 3) On appelle **inhibition incompétitive** lorsque l'inhibiteur se fixe sur un second site différent du site actif, mais exclusivement sur l'enzyme sans substrat.

Par la suite, pour la détermination du K_i, nous avons travaillé avec des concentrations faibles de PGH permettant néanmoins en un temps de 20 minutes de réaction la détection d'une activité quinolinate synthase par HPLC. Nous avons testé l'activité quinolinate synthase pour différentes concentrations de PGH de 0, 1.5, 3 et 6 μM. Pour cela, un mélange contenant

le L-Aspartate (33 mM), le fumarate (25 mM), NadA (7.1 μM) et le PGH à la concentration choisie ($x \mu\text{M}$) a été effectué dans le Tampon G du test enzymatique. Ce mélange a été divisé en autant de concentrations de DHAP à tester, comprises entre 0 et 4 mM. Après pré-incubation de ce mélange 5 min à 37 °C, la réaction a été initiée par l'ajout de NadB (7.1 μM) et poursuivie pendant 20 min à 37 °C puis analysée par HPLC. Cette expérience a été répétée plusieurs fois, et les résultats présentés ici représentent une expérience isolée qui reflète toutes les autres.

Le récapitulatif de la vitesse initiale de formation d'acide quinolinique obtenue en fonction des différentes concentrations de DHAP, et ce pour différentes concentrations de PGH, est représenté Figure 90A. La représentation en double inverse ou de Lineweaver-Burk donne $1/v$ en fonction de $1/[\text{DHAP}]$ et mène à une série de droites qui sont représentées sur la Figure 90B. Elles se croisent en un même point, ce qui montre en comparaison avec les données disponibles dans la littérature, que **le PGH est un inhibiteur compétitif du DHAP** (Figure 90D). Il est à noter que théoriquement, le point d'intersection des droites se fait au niveau de l'axe des ordonnées. Dans notre cas, ce point d'intersection est légèrement décalé vers la gauche ; un tel décalage est retrouvé dans la littérature sur plusieurs systèmes où les inhibiteurs ont été considérés comme compétitifs. Nous considérons donc aussi que le PGH est un inhibiteur compétitif. Par ailleurs, l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses, obtenue en portant la pente de chacune des droites de la Figure 90B en fonction de la concentration de PGH utilisée, nous donne la valeur de la constante d'inhibition K_i . Celle-ci a été déterminée comme étant égale à 0.46 μM (Figure 90C).



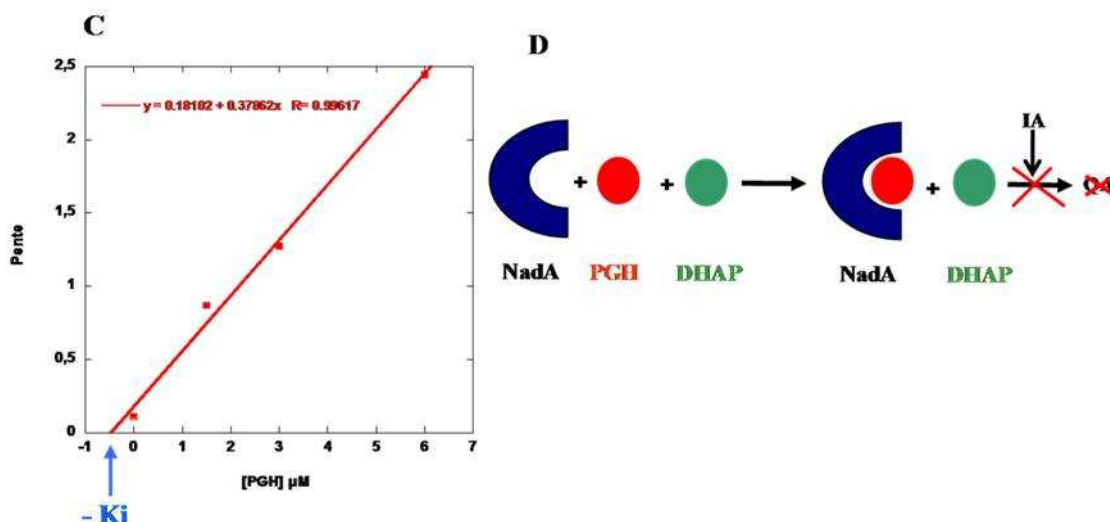


Figure 90 : (A) Représentation de la vitesse initiale de formation d'acide quinolinique en fonction de la concentration en DHAP et pour différentes concentrations de PGH (0, 1.5, 3 et 6 μM). (B) Représentation de Lineweaver-Burk avec $1/v$ en fonction de $1/[\text{DHAP}]$. (C) Détermination du K_i . (D) Représentation du mode d'action du PGH comme un inhibiteur compétitif de la quinolinate synthase.

- **Interaction du PGH avec la quinolinate synthase**

Le PGH est un inhibiteur compétitif et interagit donc avec l'enzyme en se plaçant au sein de son site actif. L'interaction est assez forte puisque l'on détermine un $K_i = 0.46 \mu\text{M}$. D'autres observations permettent d'appuyer notre résultat selon lequel le PGH interagit avec l'enzyme.

- Premièrement, nous avons observé qu'une incubation de l'enzyme ($7.1 \mu\text{M}$) avec différentes concentrations de PGH, comprises entre $0.6 \mu\text{M}$ et $300 \mu\text{M}$ pendant 20 minutes avant d'ajouter le DHAP (2 mM), NadB ($7.1 \mu\text{M}$) et le L-Aspartate (33 mM) ainsi que le fumarate (25 mM), n'avait aucun effet sur l'inhibition (pas d'augmentation constatée par rapport à un test dans lequel PGH, DHAP et NadA sont additionnés en même temps) suggérant que le PGH a une affinité importante pour l'enzyme et qu'il interagit rapidement avec celle-ci.

- Deuxièmement, nous avons incubé l'enzyme soit en absence, soit en présence d'1 équivalent ou de 10 équivalents de PGH pendant 15 minutes à température ambiante. Une partie de ces échantillons a été testée pour son activité quinolinate synthase (Cas 1, 2, 3, Figure 91). L'autre partie de ces échantillons a été déposée sur colonne de dessalage et l'activité quinolinate synthase a été testée sur les fractions récupérées (Cas 1',2',3', Figure 91). L'iminoaspartate a été généré enzymatiquement avec NadB, et NadA/NadB ont été utilisées dans un rapport 1/1. Les résultats sont rapportés dans la Figure 92. Sans passage sur la colonne, on remarque que l'on obtient les pourcentages d'inhibition attendus avec 1 équivalent et 10 équivalents de PGH par rapport à l'enzyme avec respectivement 75% et 100 % d'inhibition (Cas 2, 3) par rapport

à l'enzyme sans PGH (Cas 1). Lorsque ces échantillons sont passés sur colonne (Cas 1', 2' et 3'), des pourcentages d'inhibition du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans les Cas 1, 2 et 3 sont mesurés. En effet, on obtient 64 % d'inhibition contre 75 % pour 1 équivalent de PGH, et 81 % contre 100 % pour 10 équivalents de PGH. L'enzyme NadA sans inhibiteur présente une activité spécifique inchangée après passage sur colonne (Cas 1'), activité égale à 0.061 μ moles/min/mg.

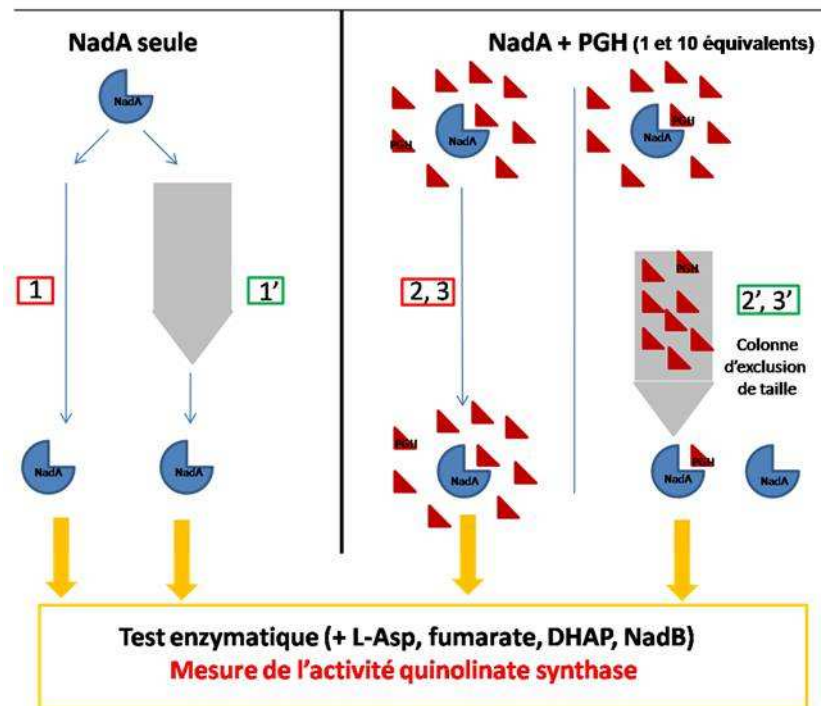


Figure 91 : Illustration des expériences effectuées avec dans la partie gauche celles sans inhibiteur (avec et sans passage sur colonne) et dans la partie de droite, les expériences effectuées en présence d'inhibiteur (1 équivalent (Cas 2 et 2') et 10 équivalents (Cas 3 et 3') de PGH) (avec et sans passage sur colonne).

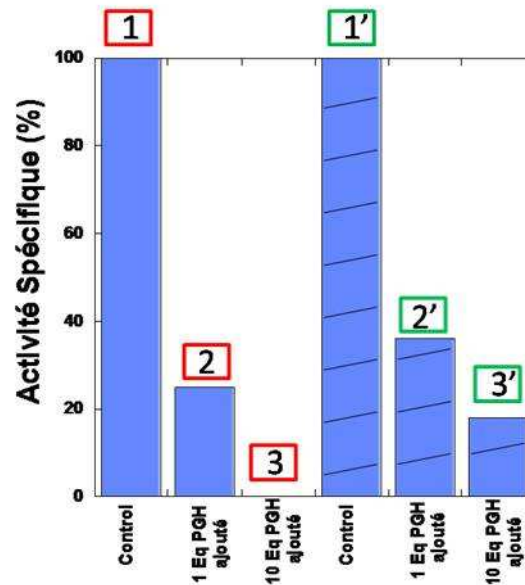


Figure 92 : Activités spécifiques (%) de NadA obtenues en l'absence et en la présence de 1 et 10 équivalents de PGH. Les barres bleues sont les résultats des tests effectués sans passage de la protéine sur colonne de dessalage (Cas 1, 2 et 3) alors que les barres bleues rayées (Cas 1', 2' et 3') montrent les résultats des expériences réalisées après passage de la protéine sur colonne de dessalage.

Les résultats de la Figure 92 montrent que l'inhibition de l'activité NadA est quasi totalement conservée lors du passage de la protéine sur colonne de dessalage, montrant que le PGH reste dans le site actif, et par conséquent qu'il interagit assez fortement avec l'enzyme. Les pourcentages d'inhibition obtenus lorsque l'échantillon est passé sur colonne (avec 1 et 10 équivalents de PGH) sont assez cohérents avec une inhibition de type compétitive. Lorsque la protéine incubée en présence de 1 et 10 équivalents est passée sur colonne, on obtient 20 % et 40 % d'activité soit une moyenne de 30 % d'activité. Cette valeur de 30 % est obtenue lorsque l'enzyme et le PGH sont utilisés dans un rapport 1/1 (voir Figure 89B) et est en accord avec la présence d'une molécule de PGH fixée par site actif de l'enzyme.

c- Le centre [4Fe-4S] comme cible du PGH ?

Le PGH comme toutes les autres molécules possédant une activité inhibitrice sur NadA que ce soit PnGH, PmGH, GHA ou PoGH ont une fonction acide hydroxamique. Cette fonction est connue pour chélater fortement les métaux. En effet, le PGH est un inhibiteur compétitif de la Fructose bisphosphate aldolase (FBPA) de Classe II qui possède dans son site actif deux ions Zn^{2+} essentiels à la catalyse enzymatique. Des études de co-cristallisation de cette enzyme avec le PGH ont permis de montrer une interaction de la fonction acide hydroxamique avec le Zn^{2+} pouvant expliquer l'inhibition observée (Hall D.R., 1999). La

quinolinate synthase ne possède pas d'ions métalliques comme le Zn^{2+} ou Cu^{2+} qui pourraient expliquer l'inhibition observée (résultat obtenu par dosage ICP-MS). Par contre, la quinolinate synthase possède un centre $[4Fe-4S]^{2+}$ essentiel à l'activité. Par conséquent, nous avons cherché à savoir si une interaction entre le PGH et le centre métallique existait permettant alors d'expliquer l'inhibition observée.

- **Démétallation de la quinolinate synthase par le PGH ?**

Nous avons incubé pendant 30 minutes la quinolinate synthase d'*E. coli* avec 10 équivalents de PGH, puis l'enzyme a été passée sur une colonne de dessalage afin d'éliminer l'excès de PGH. La même expérience contrôle a été réalisée sans ajout de PGH. Le dosage du fer et du soufre ainsi qu'une analyse par UV-visible ont été réalisés sur ces deux préparations afin de vérifier l'intégrité du centre $[4Fe-4S]$. Nous avons constaté que les quantités de fer et de soufre avant et après incubation en présence de PGH sont identiques, et de l'ordre de 3.7 moles Fe et S par mole de monomère de protéine. Le spectre UV-visible de la protéine après traitement avec du PGH est inchangé, nous n'avons notamment pas observé de diminution de l'absorbance à 420 nm, caractéristique de la présence du centre $[4Fe-4S]$. La protéine en présence de PGH conserve donc son centre métallique et l'inhibition de l'activité enzymatique quinolinate synthase par le PGH n'est donc pas liée à une inactivation par démétallation ou perte du centre $[4Fe-4S]$ de l'enzyme.

- **Etude de l'interaction du PGH avec le centre $[4Fe-4S]$ par différentes spectroscopies :**

- ***Spectroscopie UV-visible***

Nous avons enregistré le spectre UV-visible de la protéine en présence de 10 équivalents de PGH (Figure 93B). Aucune modification de l'allure du spectre UV-visible de la protéine, que ce soit au niveau de sa forme ou de l'apparition de nouvelle(s) bande(s) d'absorption, n'a été observée par rapport à celui enregistré dans des conditions similaires avec la protéine NadA sans PGH (Figure 93A). De plus, aucun changement de stabilité du centre $[4Fe-4S]$ à l'oxygène n'est constaté lors de l'exposition de la protéine en présence de l'inhibiteur (Figure 93A et 93B, Spectres en bleu). En effet, la dégradation du centre se fait dans la même échelle de temps, avec un $t_{1/2}$ compris entre 10 et 15 minutes pour l'enzyme d'*E. coli*. Ces résultats semblent indiquer que la molécule de PGH n'interagit pas directement avec le centre $[4Fe-4S]$ de l'enzyme.

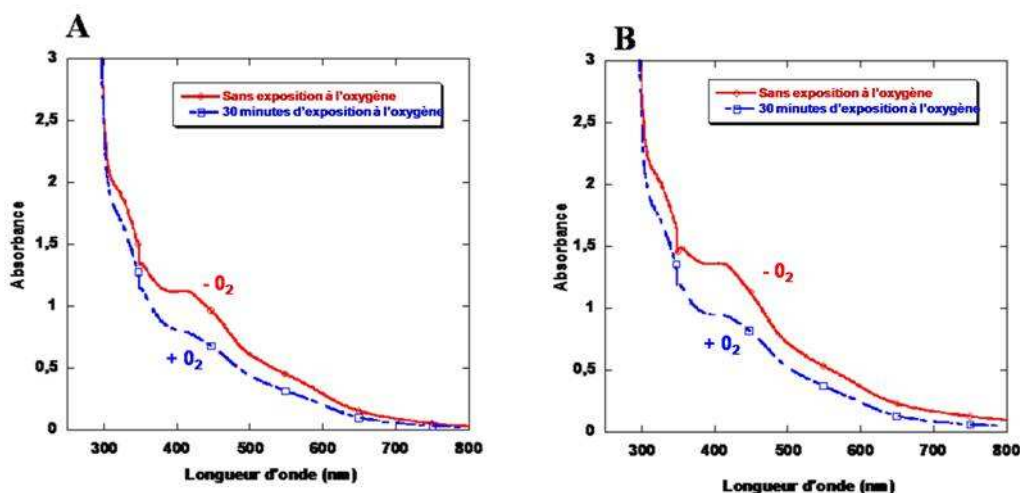


Figure 93 : Effet de l'ajout de PGH (4 mM) sur le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase (400 μ M) en absence (rouge) et en présence (bleu) d'oxygène. (A) Spectre mesuré en absence de PGH. (B) Spectre enregistré en présence PGH (4 mM).

- Spectroscopie RPE et Hyscore

Nous avons effectué une analyse RPE de la protéine NadA en présence de PGH. Deux types d'expériences ont été réalisés :

- La protéine NadA (200 μ M) a été incubée 10 minutes en présence de 10 équivalents de PGH puis réduite avec 2 mM de dithionite pendant 20 minutes. L'analyse RPE de cet échantillon montre un signal de spin $S=1/2$ identique (forme, valeurs de g, comportement en puissance et en température) au contrôle obtenu avec la protéine NadA seule réduite dans les mêmes conditions. Le spectre RPE est identique à celui présenté dans le Chapitre I des Résultats sur l'enzyme NadA d'*E. coli*.

- La quinolinate synthase (200 μ M) a été exposée à l'air pendant 10 minutes, en présence ou en absence de 10 équivalents de PGH. L'analyse RPE de l'échantillon contenant NadA+PGH révèle la présence d'un signal de spin $S=1/2$ correspondant à un centre $[3Fe-4S]^+$ qui intègre pour 20 % du fer total. Avec la protéine seule, c'est-à-dire en absence de PGH, nous avons obtenu une quantité de $[3Fe-4S]^+$ correspondant à 40 % du fer total (Chapitre I des Résultats).

La spectroscopie Hyscore est une technique de RPE à deux dimensions qui nécessite donc au préalable de réduire l'échantillon. Nous l'avons utilisée afin de mettre en évidence d'éventuels couplages entre le centre fer-soufre et certains atomes constituant le PGH qui

présentent un spin nucléaire non nul, comme l'azote. Nous avons également testé d'autres molécules plus riches en azote comme l'imidazole ainsi que le PGHz (qui exercent tous deux une inhibition plus faible sur l'enzyme, 16 % pour le premier et 35 % pour le second à une concentration de 1 mM). Nous avons préparé quatre tubes, le premier contenant la protéine NadA (300 μ M) et 10 équivalents de PGH, le second NadA et 10 équivalents de PGHz, le troisième NadA et 10 équivalents d'imidazole, le dernier servant de contrôle avec simplement NadA. Après une incubation de 20 min à la température de la boîte à gants, les échantillons ont été réduits avec du dithionite (2 mM) pendant 20 min et congelés. Pour les 4 tubes nous avons observé un signal montrant que l'expérience a marché (en termes de réduction). Par contre l'analyse Hyscore, réalisée par Serge Gambarelli (SCIB, CEA Grenoble), n'a pas révélé d'interactions entre le centre métallique et les molécules de PGH, de PGHz et d'imidazole.

Lors de ces analyses par spectroscopies RPE et Hyscore, le centre [4Fe-4S] est présent sous forme réduite [4Fe-4S]⁺¹. Afin de nous assurer que cette absence d'interaction n'est pas due à l'état rédox du centre, nous avons utilisé la spectroscopie Mössbauer permettant l'analyse du centre de la protéine sous forme oxydée [4Fe-4S]⁺².

- *Spectroscopie Mössbauer*

Une cellule Mössbauer a été préparée contenant la protéine NadA [⁵⁷Fe-S] incubée avec 5 équivalents de PGH pendant 20 minutes puis congelée. L'analyse Mössbauer réalisée par Y. Sanakis (NCSR, Grèce) a révélé que dans ces conditions le centre [Fe-S] présent dans la protéine est majoritairement présent sous la forme d'un [4Fe-4S]²⁺ (85 %), ceci aux deux températures analysées (4.2 et 78 K) comme présenté sur la Figure 94. De plus, les paramètres du centre [4Fe-4S]²⁺ obtenus en présence de PGH sont identiques à ceux obtenus en son absence ($\Delta_{EQ} = 1.11$ mm/s et $\epsilon = 0.43-0.44$ mm/s), montrant qu'il n'existe pas d'interactions de la molécule avec le centre [4Fe-4S]²⁺.

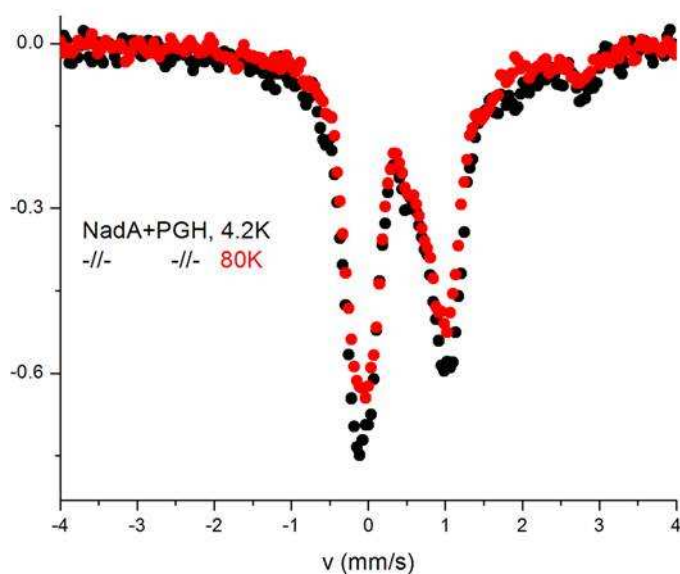


Figure 94 : Spectre Mössbauer de la protéine NadA (500 μ M) en présence de PGH (5 équivalents) enregistré à 4.2 K (spectre en rouge) et 80 K (spectre en noir).

En conclusion, toutes les analyses spectroscopiques effectuées ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'interaction entre le centre métallique et l'inhibiteur PGH, et ce quel que soit l'état rédox du centre [4Fe-4S] de la protéine NadA d'*E. coli*.

II-3 Test *in vitro* du PGH sur la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*

Nous avons établi que la molécule ayant le pouvoir d'inhibition le plus élevé sur la quinolinate synthase d'*E. coli* est le PGH. Par la suite, nous avons testé cette molécule sur l'enzyme de *M. tuberculosis* qui constitue la cible antibactérienne d'intérêt. Comme je l'ai indiqué dans l'introduction, le gène *nadA* de *M. tuberculosis* a été identifié comme essentiel à la survie et la virulence de la mycobactérie (Sassetti C.M., 2003). De plus, la voie de secours chez la mycobactérie est annoncée comme non fonctionnelle. La bactérie n'a donc pas d'autres alternatives que d'utiliser NadA, NadB et NadC pour synthétiser son NAD (Foster J.W., 1980 ; Kasarov L.B., 1972). Pour toutes ces raisons, NadA est une excellente cible d'agents antibactériens chez cet organisme.

Les tests enzymatiques précédemment décrits (en II-) ont été répétés sur la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* avec des concentrations de PGH de 3, 5, 15 et 300 μ M dans les conditions mises au point pour les tests d'inhibition sur l'enzyme d'*E. coli*, c'est-à-dire en

utilisant NadB dans un rapport 1/1 avec NadA (7.1 μM), du L-Aspartate (33 mM) et du fumarate (25 mM) pour générer l'iminoaspartate, le DHAP étant ajouté à une concentration de 2 mM. Les résultats de ces tests sont indiqués dans la Figure 95 (en violet) avec pour comparaison les valeurs d'inhibition obtenues avec la quinolinate synthase d'*E. coli* (en bleu). Nous constatons que l'inhibition de l'activité quinolinate synthase obtenue avec l'enzyme de *M. tuberculosis* est sensiblement identique à celle de l'enzyme d'*E. coli*, et ce pour les quatre concentrations de PGH testées, démontrant que le PGH est également un bon inhibiteur de la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*.

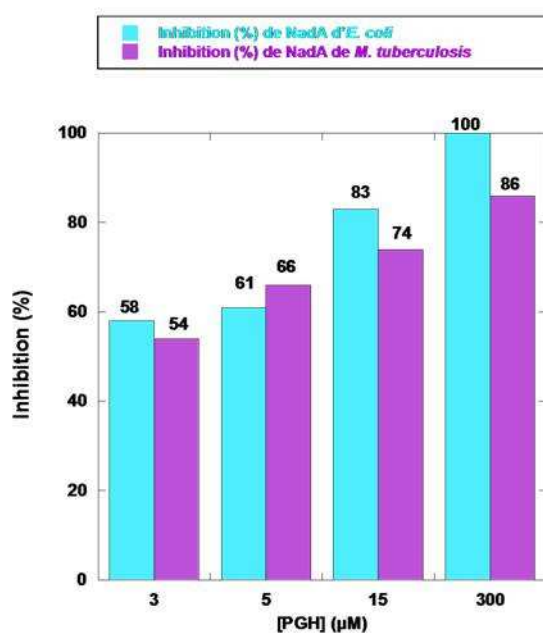


Figure 95 : Inhibition de l'activité quinolinate synthase (%) de *M. tuberculosis* (en violet) et d'*E. coli* (en bleu) obtenue lors des tests enzymatiques en présence de différentes concentrations de PGH comprises entre 3 μM et 300 μM . L'activité spécifique en absence de PGH est égale à 0.058 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ pour NadA d'*E. coli* et de 0.018 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ pour NadA de *M. tuberculosis*.

Le K_i pour le PGH a été déterminé dans des conditions identiques à celles mise au point lors de la détermination du K_i du PGH pour NadA d'*E. coli* (paragraphe II-2). La valeur obtenue dans ces conditions est de 0.63 μM , soit du même ordre de grandeur que celle obtenue pour NadA d'*E. coli* ($K_i = 0.46 \mu\text{M}$).

II-4 Test *in vivo* de trois molécules inhibitrices (PGH, PnGH et PmGH) sur différentes mycobactéries

Etant donné l'activité inhibitrice obtenue avec le PGH sur notre cible, la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*, nous avons souhaité tester, en collaboration avec le laboratoire de S. Cole de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, le pouvoir inhibiteur de cette molécule *in vivo* sur différentes mycobactéries, grâce au test de réduction de la résazurine. Le pouvoir inhibiteur de deux autres molécules (PnGH et PmGH) a également été testé qui je le rappelle conduisent respectivement à des pourcentages d'inhibition de 96 % et 93 %, pour une concentration de 1 mM avec une concentration de NadA de 7.1 μ M. Ce test effectué en microplaques permet la détection rapide et peu coûteuse de la croissance des mycobactéries liée à un changement de couleur de la résazurine. En effet, lors de la croissance bactérienne, la résazurine (rose) est réduite et devient bleue ; si la molécule ajoutée inhibe la croissance des mycobactéries, le milieu reste rose. Les contrôles positifs (d'inhibition) ont été effectués avec deux molécules communément utilisées comme antituberculeux : l'isoniazide et la rifampicine.

Sur trois types de mycobactéries utilisées (*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* (BCG) et *Mycobacterium tuberculosis*), les trois molécules PGH, PmGH et PnGH ont été testées à des concentrations comprises entre 0.1 et 100 μ g/mL. Il s'avère qu'aucune des bactéries n'a présenté de sensibilité particulière aux trois composés aux concentrations testées, alors que les contrôles positifs avec l'isoniazide et la rifampicine ont marché. Les molécules testées PGH, PnGH et PmGH ne sont donc pas actives *in vivo* dans les conditions testées.

Discussion

*L'inhibition de la quinolinate synthase d'*E. coli* et *M. tuberculosis**

Le choix des molécules inhibitrices s'est porté sur différentes classes de molécules analogues des substrats (DHAP et IA) ainsi que des molécules analogues cycliques du produit de la réaction (Acide quinolinique) et d'intermédiaires réactionnels. Le test enzymatique avec différentes concentrations de ces molécules sur la quinolinate synthase d'*E. coli* nous a permis de faire un premier classement entre les molécules possédant une activité inhibitrice sur l'enzyme et celles qui n'ont aucun ou très peu d'effet inhibiteur. Parmi les molécules qui ont très peu ou aucun effet, on retrouve toutes les molécules analogues de l'acide quinolinique, et de potentiels intermédiaires réactionnels ainsi que l'acide oxaloacétique et l'acide malique, deux analogues de l'iminoaspartate. Parmi les 8 molécules testées analogues du DHAP, une seule molécule ne présente que peu d'activité inhibitrice à la concentration de 1 mM, c'est le PGA. Toutes les autres (PGHz, PGAm, GHA, PoGH, PmGH, PnGH et PGH) inhibent plus ou moins fortement l'enzyme (Figure 96).

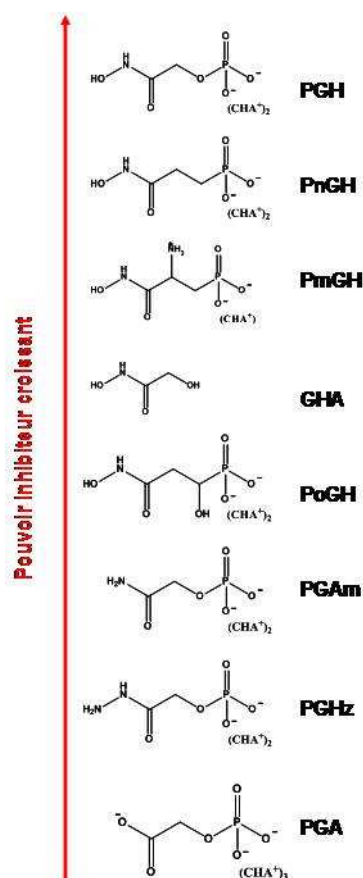


Figure 96 : Classement des molécules testées sur la quinolinate synthase d'*E. coli* en fonction de leur pouvoir inhibiteur. Le pouvoir inhibiteur augmente de bas en haut.

Une molécule se distingue avec une activité inhibitrice importante : le PGH. Les paramètres d'inhibition de cette dernière molécule (IC_{50} et K_i) ont été déterminés avec la quinolinate synthase d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*. Une valeur comprise entre 2.5 et 3 μM a été déterminée pour l' IC_{50} de NadA d'*E. coli* avec un K_i de 0.46 μM ; un K_i égal à 0.63 μM a été mesuré pour NadA de *M. tuberculosis*. Nos résultats ont permis de montrer que le PGH possède une activité inhibitrice similaire sur la quinolinate synthase d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*.

Les différentes enzymes utilisant le DHAP et leurs inhibiteurs.

Trois autres enzymes du métabolisme cellulaire sont inhibées par le PGH. Ces enzymes utilisent le DHAP comme substrat. J'ai résumé dans le Tableau 38 les réactions qu'elles catalysent et quelques uns des inhibiteurs de chacune de ces enzymes, dont le PGH.

Enzymes	Réaction catalysée	Inhibiteurs connus
Triose phosphate isomérase (TIM)	$DHAP \rightleftharpoons G-3P$	Haloacétol phosphate (Hartman F.C., 1971) Glycidol phosphate (Schray K.J., 1973) 3-phosphoglycérate, glycérol phosphate, phosphoenolpyruvate PGH et PGA (Collins K.D., 1974; Wolfenden R.N., 1969)
Glycérophosphate déshydrogénase (GPDH)	$DHAP \xrightleftharpoons{NADH} Glycérol\ 3\text{-phosphate}$	PGII (Fonvielle M., 2006)
Fructose 1,6-bisphosphate Aldolase (FBPA) Classe I et II	$DHAP + G-3P \rightleftharpoons Fructose\ 1,6\text{-bisphosphate}$	Inhibiteurs de la classe II: PGH, PGA, PGHZ (Fonvielle M. 2004)

Tableau 38 : Les différentes enzymes qui utilisent le DHAP comme substrat, la réaction qu'elles catalysent et les inhibiteurs connus pour chacune d'entre elles.

Le point commun entre ces différentes enzymes qui utilisent le DHAP est leur inhibition par le PGH (Tableau 38). La constante d'inhibition K_i du PGH pour ces trois enzymes est indiquée dans le Tableau 39, ces valeurs étant comprises entre 0.01 μM et 10 μM (Fonvielle M., 2006).

	TIM (de lapin)	FBPA		GPDH (de lapin)
		Classe I (de lapin)	Classe II (de levure)	
K_i PGH (μM)	3	1	0.01	10

Tableau 39 : La constante d'inhibition K_i définie pour les trois enzymes TIM, FBPA (classe I et II) et GPDH (Fonvielle M., 2006).

Les quinolinate synthases d'*E. coli* et de *M. tuberculosis* obéissent également à la règle qui consiste à utiliser le DHAP et à être inhibées par le PGH. De plus, on peut noter que les quinolinate synthases d'*E. coli* et de *M. tuberculosis*, tout comme la FBPA de classe II sont inhibées très efficacement par le PGH d'après leur valeur de K_i qui est de 0.01 μM pour la FBPA, 0.46 μM pour NadA d'*E. coli* et 0.63 μM pour NadA de *M. tuberculosis*. Par ailleurs, cette constatation met en évidence la faible spécificité du PGH. En effet, le PGH inhibe avec plus ou moins d'efficacité l'ensemble des enzymes utilisant le DHAP, et l'utiliser pour cibler spécifiquement une enzyme au niveau cellulaire (dans notre cas NadA) ne semble pas être une bonne stratégie.

Sur ce point de la spécificité, la molécule qui pourrait avoir un intérêt dans l'inhibition spécifique de la quinolinate synthase est le PmGH avec laquelle on a 93 % d'inhibition à une concentration de 1 mM. Les constantes cinétiques de la molécule (IC₅₀ et K_i) restent à déterminer, mais parmi les enzymes qui utilisent le DHAP, NadA est la seule sur laquelle cette molécule a un pouvoir inhibiteur.

Les inhibiteurs analogues du DHAP chélatent les métaux :

Le PGH ainsi que ses différents analogues possèdent une partie phosphate et une partie hydroxamate chélatant les métaux, comme indiqué dans la Figure 97.

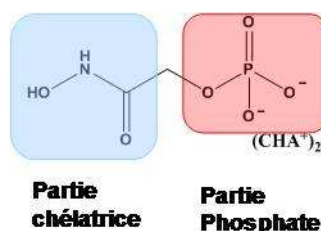


Figure 97 : La partie « chélatrice » des métaux et la partie phosphatedes analogues du DHAP : Exemple du PGH.

Sachant que la quinolinate synthase possède un centre [4Fe-4S], on pouvait imaginer que l'inhibition par le PGH se faisait :

- soit parce que la molécule est un analogue du DHAP et qu'elle peut alors se fixer à sa place dans le site actif de l'enzyme ;
- soit que l'inhibition est comme dans le cas de la FBPA de classe II, liée à l'interaction de la partie chélatrice de la molécule avec le métal (le Zn^{2+} pour la FBPA de classe II), le centre [4Fe-4S] pour NadA (NadA ne contient pas de Zn) ;
- soit par conjugaison des deux effets précédents.

Une partie de nos études (l'étude de l'interaction du PGH avec la quinolinate synthase et la mesure du K_i) ont montré que le PGH et l'enzyme interagissent assez fortement puisqu'on observe une inhibition de l'activité enzymatique après passage sur colonne de dessalage permettant d'éliminer les petites molécules non spécifiquement liées à l'enzyme. De plus, nous avons déterminé que le PGH est un inhibiteur compétitif du DHAP. Le PGH mime donc probablement le DHAP et va se placer dans le site actif prenant sa place.

Les différentes expériences de spectroscopies visant à mettre en évidence une interaction entre les molécules inhibitrices (surtout le PGH) et le centre métallique de la quinolinate synthase n'ont pas donné de résultat positif dans les conditions étudiées. En tout état de cause, même si la molécule inhibitrice ne se lie pas au centre [4Fe-4S], la fonction acide hydroxamique est primordiale pour l'inhibition puisque les 5 molécules possédant le meilleur pouvoir inhibiteur possèdent cette fonction, tout en sachant qu'elle n'est pas suffisante puisque l'hydroxyurée n'a aucune activité inhibitrice sur l'enzyme. Il est à noter que la fonction phosphate est également importante puisqu'on observe une importante différence d'efficacité d'inhibition (à faible concentration de molécules) entre le PGH et le PnGH dans laquelle la fonction phosphate est remplacée par une fonction phosphonate.

Ainsi, l'ensemble des expériences que j'ai effectuées montre que l'inhibition observée sur NadA par le PGH est très probablement due à une analogie structurale entre le PGH et le DHAP.

Au vu de ces résultats, il serait intéressant de continuer les tests d'inhibition avec des molécules analogues des substrats capables de bloquer une des étapes du mécanisme réactionnel (voir fin de l'Introduction). Le fluoroaspartate analogue du L-Aspartate pourrait par exemple bloquer la première cyclisation de la molécule comme indiqué dans la Figure 98.

Une molécule du type haloacétone phosphate (Bromo, chloro ou iodoacétone phosphate) (Norton I.L., 1972), analogue du DHAP pourrait également empêcher la cyclisation de la molécule et donc la formation d'acide quinolinique.

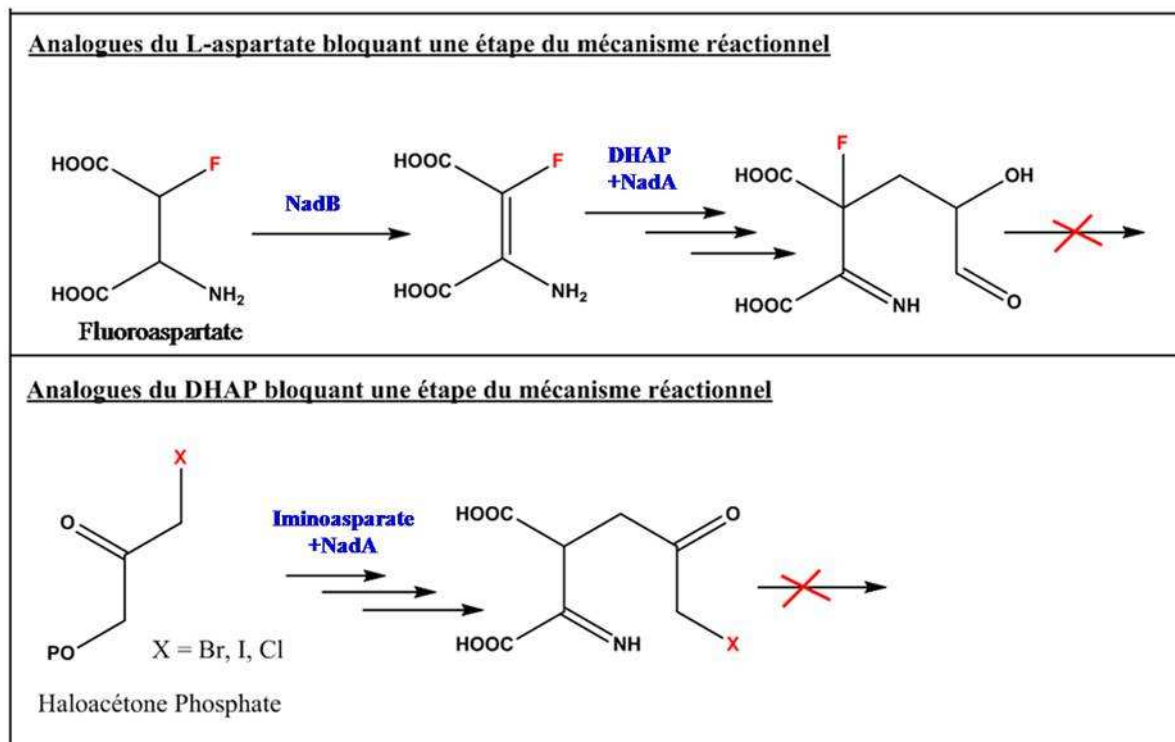


Figure 98 : Propositions de molécules potentiellement inhibitrices à tester.

Les tests *in vivo*

Nous avons montré que le PGH, le PnGH et le PmGH n'avaient pas d'effet sur la croissance de différents types de mycobactéries malgré leur pouvoir inhibiteur *in vitro* sur l'activité quinolinase synthase. Plusieurs explications sont envisageables :

1) la première d'entre elles serait que les molécules ne pénètrent pas dans les mycobactéries. En effet, il a été montré que le passage de la paroi bactérienne est très difficile surtout pour les bactéries pathogènes. En effet, en plus de leur constitution riche en phospholipides, leurs membranes possèdent des acides mycoliques, les rendant très hydrophobes et particulièrement imperméables à toutes les substances qui ont un caractère hydrophile. Les molécules de PGH, PnGH et PmGH sont constituées de plusieurs fonctions polaires (le phosphate ou phosphonate et la fonction acide hydroxamique), donc hydrophiles qui rendent le passage des membranes hydrophobes particulièrement difficile. Afin d'améliorer la pénétration cellulaire, on pourrait

imaginer estérifier la fonction phosphate (ou phosphonate), ce qui rendrait les molécules moins polaires et potentiellement aptes à passer la membrane bactérienne ; resterait à démontrer leur activité inhibitrice.

2) On peut également penser que même si les molécules testées pénètrent dans la bactérie elles sont dégradées avant d'atteindre leur cible. En effet, il est établi que la fonction acide hydroxamique est sensible à l'hydrolyse, la molécule se dégradant en libérant de l'hydroxylamine, un composé particulièrement toxique dans le milieu cellulaire (Figure 99). Dans notre cas, ceci est peu probable car lors des tests *in vivo* sur les mycobactéries, aucune toxicité n'a été observée ; on peut donc penser que la molécule n'est pas hydrolysée lors de nos tests.

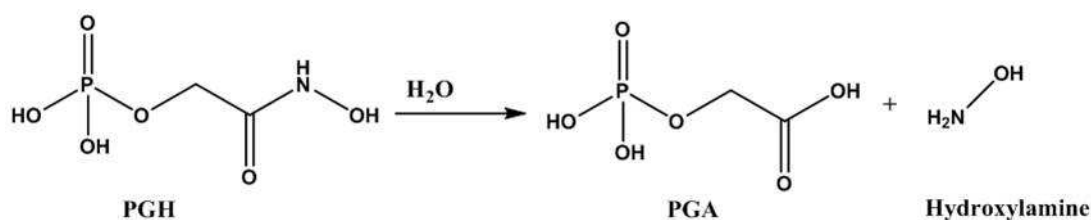


Figure 99 : Réaction possible d'hydrolyse du PGH menant à la formation d'hydroxylamine et d'acide phosphoglycolique (PGA).

3) Une dernière explication possible pour expliquer la non-activité inhibitrice de nos molécules sur les mycobactéries pourrait être liée au fait que la molécule la plus efficace que constitue le PGH cible plusieurs enzymes à la fois et possède une plus forte affinité pour la FBPA de classe II que pour NadA avec je le rappelle un K_i égal à $0.01 \mu\text{M}$ pour la FBPA et un K_i de $0.63 \mu\text{M}$ pour la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*. On peut donc penser que la molécule de PGH pénètre dans la bactérie mais n'atteint pas la cible voulue : la quinolinate synthase.

*La quinolinate synthase de *M. tuberculosis* n'est plus une cible intéressante d'agents antibactériens*

A mon arrivée, la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* était une cible intéressante d'agents antibactériens. En effet, il avait été montré par une étude de mutagenèse que les enzymes de la biosynthèse *de novo* du NAD étaient essentielles *in vivo* établissant que l'enzyme NadA était essentielle à la survie de la mycobactérie. Une étude de marquage avait

par ailleurs montré que malgré l'expression de la nicotinamidase (PncA), la voie secours n'était pas fonctionnelle, cette observation étant basée sur le fait que l'acide nicotinique (marqué) n'était pas incorporé dans le NAD. Ces études établissaient donc qu'une inhibition spécifique de la quinolinate synthase entraînerait l'arrêt du métabolisme du NAD dans la mycobactérie et donc la mort de la bactérie.

En fin de thèse, une étude complète sur la biosynthèse du NAD chez *M. tuberculosis* en conditions d'infection a montré que la quinolinate synthase chez cet organisme n'est finalement pas une bonne cible d'agents antituberculeux (Boshoff H.I.M., 2008). Cette nouvelle découverte, basée sur une étude en conditions d'infection du tissu pulmonaire chez la souris par *Mycobacterium tuberculosis*, démontre sans ambiguïté que la voie de biosynthèse de secours est fonctionnelle chez cet organisme. En effet, cette étude montre que l'ajout de [¹⁴C]-nicotinamide exogène sur des mycobactéries isolées directement de poumons de souris mène à la formation de [¹⁴C]-NAD, témoignant de la présence d'une voie de secours fonctionnelle chez *Mycobacterium tuberculosis*. On voit bien ici que la quinolinate synthase de *M. tuberculosis* ne constitue plus une cible intéressante dans la conception de nouvelles molécules antibactériennes. De ce fait, même si certaines de nos molécules inhibent la quinolinate synthase de *M. tuberculosis*, il est nécessaire de changer de cible biologique.

Il est intéressant de noter, que le fait que la voie de biosynthèse du NAD de secours soit fonctionnelle apporte une justification supplémentaire à l'incapacité du PGH à inhiber la croissance des mycobactéries lors des tests *in vivo*.

Une nouvelle analyse bioinformatique nous a récemment conduits à conclure que deux organismes sont intéressants dans la stratégie antibactérienne : *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium leprae*. En effet, ces organismes effectuent la biosynthèse du NAD uniquement grâce à leur voie principale, les enzymes de la voie de secours étant absentes de leur génome. Le clonage des gènes *nadA* de *H. pylorii* et *M. leprae* sont en cours au laboratoire.

La quinolinate synthase reste donc une cible potentielle d'agents antibactériens intéressante chez les deux micro-organismes *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium leprae*.

Chapitre III

*Etude mécanistique de la
réaction catalysée par la
quinolinate synthase*

Ce dernier chapitre de mon étude concernant le mécanisme réactionnel de la quinolinate synthase, s'articule autour de deux axes :

➔ **Le premier vise à comprendre le rôle du centre [4Fe-4S] de l'enzyme dans l'activité enzymatique.** En effet, il était établi à mon arrivée au laboratoire que le centre métallique était essentiel pour l'activité de l'enzyme cependant aucune démonstration expérimentale n'avait été obtenue permettant d'en définir le rôle exact. La réaction catalysée par la quinolinate synthase fait intervenir des étapes de déshydratation comme dans le cas des déshydratases, dont l'aconitase, qui sont aussi des protéines [4Fe-4S] où le centre fer-soufre joue un rôle dans la catalyse enzymatique ; un des atomes de fer du centre [4Fe-4S] jouant le rôle d'acide de Lewis comme indiqué sur la Figure 100. Dans le Tableau 40, j'ai listé les différentes caractéristiques mises en évidence pour la quinolinate synthase d'*E. coli* et retrouvées chez l'aconitase appuyant notre hypothèse selon laquelle, le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase pourrait avoir un rôle dans la catalyse enzymatique, avec un des atomes de fer jouant le rôle d'acide de Lewis

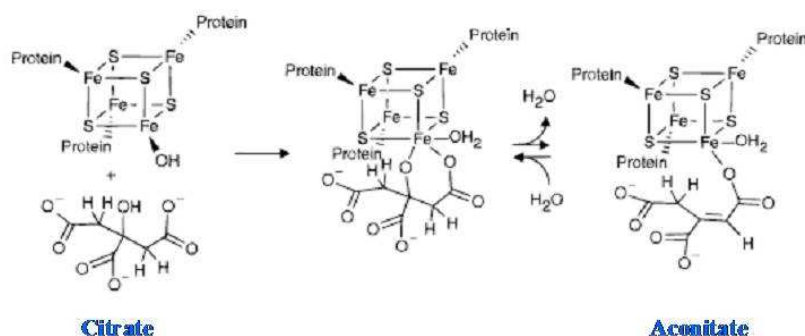


Figure 100 : Rôle du centre [4Fe-4S] de l'aconitase dans la catalyse enzymatique en tant qu'acide de Lewis (Beinert H., 1996).

Aconitase d' <i>E. coli</i>	Quinolinate synthase d' <i>E. coli</i>
1) Présence d'un centre [4Fe-4S] ²⁺ sous forme native, essentiel à l'activité.	Présence d'un centre [4Fe-4S] ²⁺ sous forme native, essentiel à l'activité.
2) L'apoprotéine est inactive	L'apoprotéine est inactive
3) Le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines : Cys358, Cys431 et Cys434	Le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement 3 cystéines : Cys113, Cys200, Cys297
4) Formation d'un centre [3Fe-4S] ⁺ lors d'une exposition à l'oxygène. Réduction de l'activité sous cette forme.	Formation d'un centre [3Fe-4S] ⁺ lors d'une exposition 10 min à l'oxygène de NadA. Forme inative

Tableau 40 : Caractéristiques communes entre l'aconitase d'*E. coli* et la quinolinate synthase d'*E. coli*

➤ **Le second axe vise à une meilleure compréhension du mécanisme réactionnel de l'enzyme.** Deux hypothèses de mécanisme existent comme je le rappelle dans la Figure 101. La différence majeure entre l'hypothèse émise par Nasu S. en 1982 (Nasu S., 1982a) et celle émise par Begley T.P. en 2001 (Begley T.P., 2001) concerne l'ordre de la condensation des carbones des deux substrats. En effet, alors que Nasu S. propose la condensation du DHAP avec l'iminoaspartate avec en première étape le départ du phosphate, Begley T.P. propose l'isomérisation du DHAP en G-3P avant sa condensation avec l'iminoaspartate, ceci facilitant alors l'attaque de l'amine de l'iminoaspartate sur la fonction aldéhyde du G-3P. La molécule de phosphate ne part qu'au moment de la cyclisation. Le passage par l'intermédiaire G-3P oriente l'ordre de condensation des substrats, et par conséquent il nous est apparu essentiel dans un premier temps, de vérifier si l'enzyme NadA était effectivement capable d'utiliser le G-3P rendant possible le mécanisme proposé par Begley T.P.

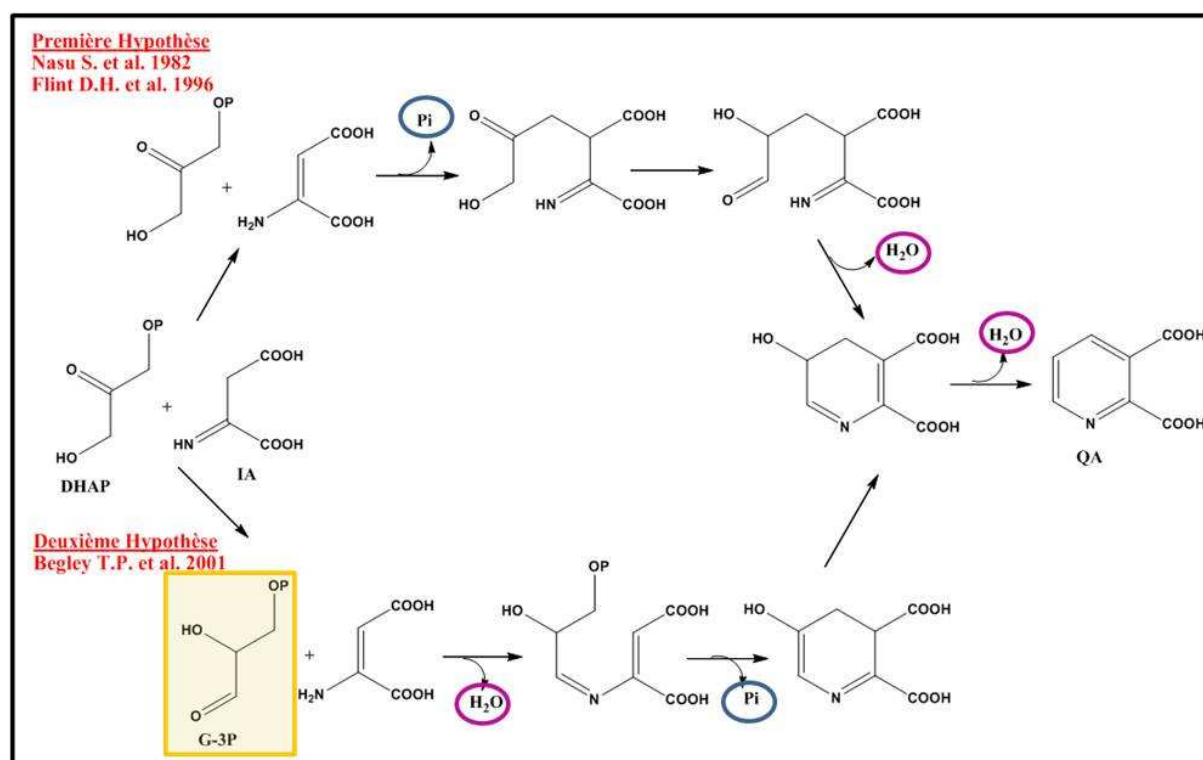


Figure 101 : Les deux propositions de mécanismes de formation de l'acide quinolinique à partir de l'iminoaspartate et du DHAP par la quinolininate synthase.

I- Un centre [Fe-S] essentiel à l'activité de NadA : Implication dans la catalyse ?

Le centre [Fe-S] de la quinolinate synthase pourrait jouer un rôle dans la catalyse enzymatique au niveau de trois étapes illustrées dans la Figure 102. Dans un souci de simplification, j'ai choisi l'hypothèse de mécanisme émise par Nasu S. pour présenter ces différentes propositions pour le centre [4Fe-4S] :

- Dans les **Cas 1** et **Cas 2**, le centre [4Fe-4S] pourrait interagir avec des intermédiaires réactionnels issus de la condensation des deux substrats (Iminoaspartate et DHAP), afin de faciliter le départ d'une molécule d'eau conduisant à la cyclisation dans le premier cas, et à la formation de l'acide quinolinique dans le second cas.
- Dans le **Cas 3**, le centre fer-soufre pourrait interagir avec le DHAP et ainsi aider au départ du groupement phosphate (Scarpellini M., 2003). Il pourrait plus simplement aider au bon placement de la molécule de DHAP au sein du site actif de sorte à ce que la condensation avec l'iminoaspartate se fasse de façon optimale.

Afin de vérifier si ces différentes propositions sont recevables, des études spectroscopiques par RPE et Mössbauer ont été effectuées sur l'enzyme NadA d'*E. coli* contenant son centre [4Fe-4S] et ce en présence de ses différents substrats.

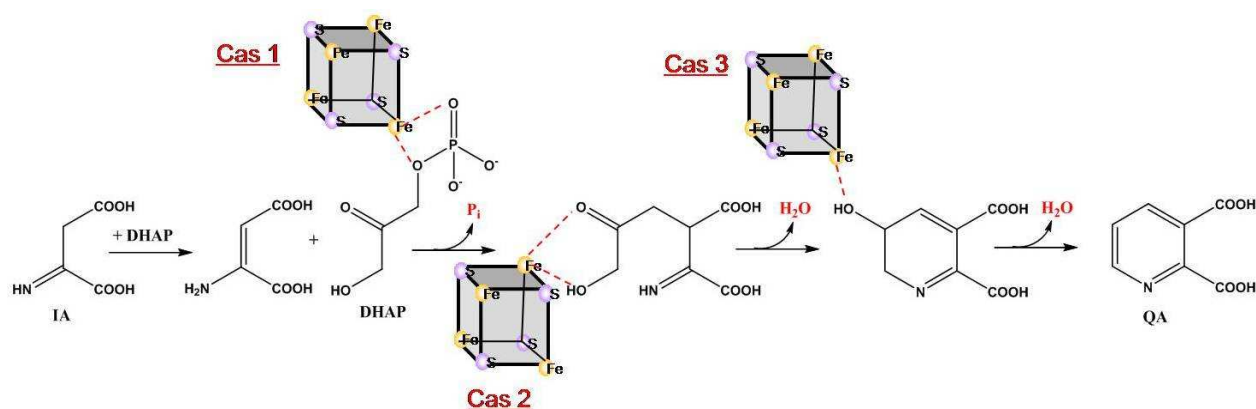


Figure 102 : Les différentes possibilités d'interventions du centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase dans la catalyse enzymatique.

II-1 Existe-t-il une interaction entre le DHAP et le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase ?

Dans cette situation (Cas 3, Figure 102) l'interaction du centre [4Fe-4S] de l'enzyme avec le DHAP devrait pouvoir être visualisée par spectroscopies.

a- Analyse par spectroscopie RPE

La première technique utilisée est la spectroscopie RPE. Un tube RPE a ainsi été préparé en condition d'anaérobiose en mélangeant la protéine NadA (200 μ M) avec 10 excès de DHAP (2 mM). Après 20 minutes d'incubation à température de la boîte à gants (18 °C), la préparation a été réduite avec du dithionite (2 mM) puis congelée. L'analyse RPE de cet échantillon nous a conduits à l'obtention d'un signal dont l'allure (Figure 103), la proportion, les valeurs de g ainsi que le comportement en température et en puissance sont identiques à ceux obtenus pour le centre [4Fe-4S]⁺ de la protéine NadA sans DHAP (voir Chapitre I des Résultats). La présence de DHAP dans l'échantillon n'a donc aucun effet, dans les conditions testées, sur le signal RPE du centre [4Fe-4S]⁺ de la quinolinate synthase, suggérant qu'il n'existe a priori aucune interaction entre le DHAP et le centre métallique.

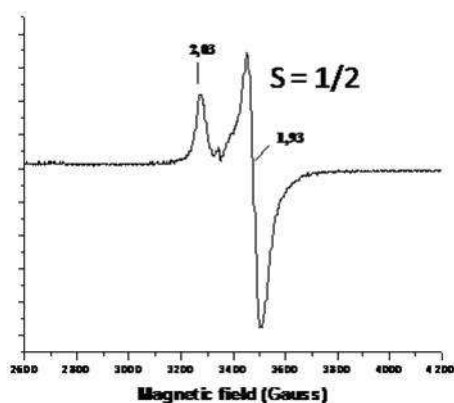


Figure 103 : Spectre RPE en bande X de NadA (200 μ M) en présence de DHAP (2 mM) et réduite avec du dithionite (2 mM), enregistré à 10 K, puissance 0.1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain $2 \cdot 10^5$.

b- Analyse par spectroscopie Hyscore

Malgré l'absence manifeste d'interaction entre le DHAP et le centre [4Fe-4S]⁺ de la quinolinate synthase par RPE, nous avons utilisé une seconde technique spectroscopique. La spectroscopie Hyscore permet l'observation de couplage(s) hyperfin(s) de certains noyaux

avec des moments gyromagnétiques faibles dans des systèmes non orientés, c'est-à-dire entre un spin électronique (ici le centre fer-soufre réduit) et un spin nucléaire (non nul : ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{32}P) (Voir Chapitre M&M). Le noyau de ^{32}P possède un spin non nul égal à $1/2$ et par conséquent, si interaction il y a, entre le DHAP et le centre fer-soufre on devrait voir par Hyscore des couplages hyperfins. L'étude en Hyscore a été réalisée par Serge Gambarelli sur un tube préparé précédemment pour l'analyse RPE contenant la quinolinate synthase ($200\ \mu\text{M}$) et 10 excès de DHAP, le tout réduit avec du dithionite après 20 minutes d'incubation. La Figure 104 montre le spectre Hyscore obtenu. Seuls les couplages entre le centre fer-soufre et les noyaux « distants », ^{13}C en abondance naturelle et ^1H sont observés à respectivement $3.75\ \text{MHz}$ et $14\ \text{MHz}$. Aucune « tache » (vers $5.9\ \text{MHz}$) correspondant au couplage avec le ^{32}P n'apparaît (flèche rouge Figure 104) démontrant qu'il n'y a pas d'interaction entre le DHAP (partie phosphate) et le $[\text{4Fe-4S}]^+$.

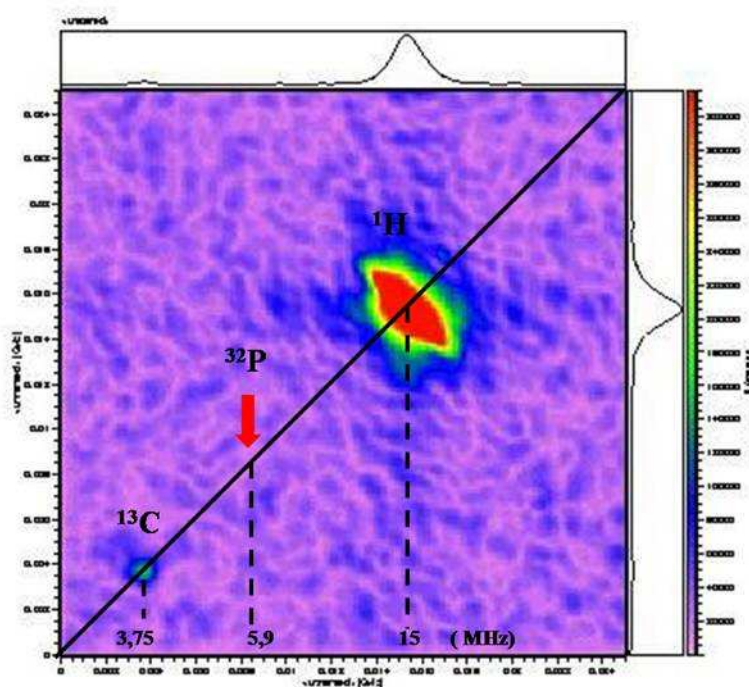


Figure 104 : Spectre Hyscore (cadran +/+) de la protéine NadA ($200\ \mu\text{M}$) incubée avec du DHAP ($2.5\ \text{mM}$) 20 minutes puis réduite au dithionite ($1\ \text{mM}$). Paramètre d'enregistrements $T=10\ \text{K}$, Séquence $\pi/2-\tau-t_1-\pi-t_2-\pi/2$ avec longueur $\pi/2=16\ \text{ns}$ et longueur $\pi=32\ \text{ns}$, $\tau=108\ \text{ns}$.

Après cette analyse en spectroscopie RPE et Hyscore, il semblerait acquis que dans les conditions testées, aucune interaction n'existe entre le DHAP et le centre métallique de la quinolinate synthase.

Cependant, les analyses RPE et Hyscore ont été réalisées sur le centre [4Fe-4S] réduit, et l'on peut imaginer que le substrat DHAP n'interagisse pas avec le centre dans l'état réduit mais plutôt avec la forme oxydée. Ainsi, un échantillon équivalent à celui cité ci-dessus a été préparé (mais sans réduction au dithionite) et analysé par spectroscopie Mössbauer, une des techniques de choix pour l'analyse des espèces [Fe-S] oxydées.

c- Analyse par spectroscopie Mössbauer

Pour plus de détails, nous avons réalisé une cellule Mössbauer de la protéine NadA surexprimée en présence de ^{57}Fe et purifiée en anaérobiose. Cette préparation est active ($AS=0.054 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$), et contient 3.1 atomes fer et 2.9 atomes de soufre par protéine. La protéine NadA (500 μM) a été, soit congelée seule, soit incubée en présence de DHAP (2.5 mM) pendant 20 minutes à température de la boîte à gants (18 °C) puis congelée et analysée par Y. Sanakis (NCSR, Grèce). Les deux spectres Mössbauer obtenus, enregistrés 4.2 K sont présentés Figure 105. A cette température, le spectre expérimental de référence de la protéine NadA seule (Figure 105, Spectre du haut) peut être simulé par deux doublets. Le premier correspond à un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (Spectre en bleu, dont les paramètres sont rappelés dans le Tableau 41) qui contribue pour 90 % du fer total dans la protéine NadA, le second correspond quant à lui à du Fe^{2+} (coordination soufrée) qui contribue pour les 10 % restant. Le spectre expérimental (●) de la protéine NadA incubée avec du DHAP présenté sur la Figure 105 (Spectre du bas) peut également être simulé par deux doublets. Le premier doublet (85 % du fer total dans la protéine NadA) correspond d'après le spectre théorique (en bleu sur la Figure 105) à un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dont les paramètres sont $\epsilon = 0.46 \text{ mm/s}$, $\Delta_{\text{EQ}} = 1.07 \text{ mm/s}$. Le second doublet (en rouge sur la Figure 105), contribuant pour les 15 % restant du fer, possède des paramètres $\epsilon = 0.30 \text{ mm/s}$ et $\Delta_{\text{EQ}} = 0.57 \text{ mm/s}$ correspondant à un centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$.

En l'absence ou en la présence de DHAP, le fer et le soufre contenus dans la protéine NadA se trouvent majoritairement sous la forme d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Cette similarité tend à montrer qu'il n'existe pas d'interaction entre le DHAP et le centre fer-soufre à l'état +2 de la protéine NadA. La présence de centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ lorsque la protéine est mise en présence de DHAP (et qui n'est pas présente en absence de DHAP) est probablement liée à une légère oxydation du centre, que nous savons sensible.

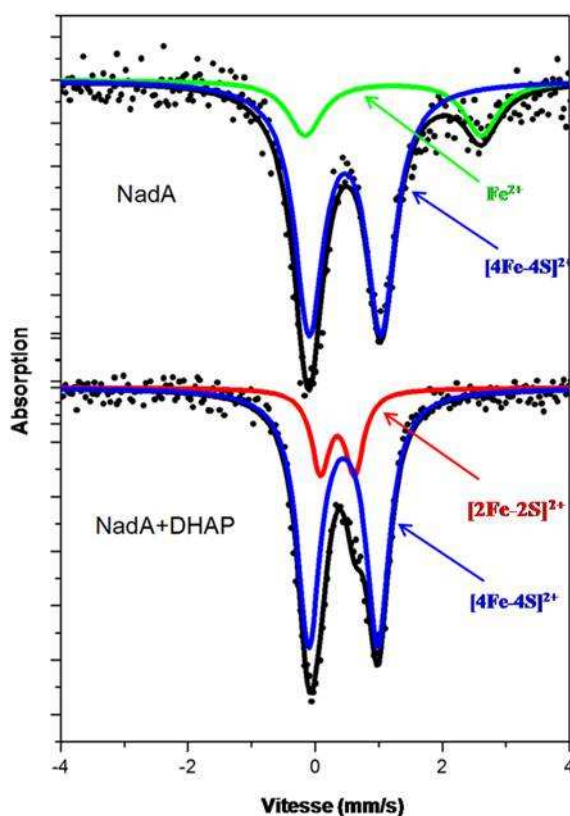


Figure 105 : Spectres Mössbauer obtenus (●) pour la protéine NadA d'*E. coli* (500 μM) seule (en haut) ainsi que celui obtenu avec la protéine NadA incubée avec du DHAP (2.5 mM) (en bas) enregistrés à 4.2 K. Les spectres simulés sont indiqués en bleu, en rouge et en vert.

Espèces	NadA d' <i>E. coli</i>			NadA d' <i>E. coli</i> + DHAP		
	ε (mm/s)	ΔE _Q (mm/s)	Aire %	ε (mm/s)	ΔE _Q (mm/s)	Aire %
[4Fe-4S] ²⁺	0.43- 0.44	1.11	90	0.46	1.07	85
[2Fe-2S] ²⁺	/	/	/	0.30	0.57	15
Fe ²⁺	0.7	3.3	10	/	/	/

Tableau 41 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus par simulation (des spectres à 4.2K) pour la quinolinate synthase d'*E. coli* en absence et en présence de DHAP.

En conclusion, quelque soit l'état rédox du centre [4Fe-4S], il ne semble pas exister d'interaction entre le DHAP et le centre [4Fe-4S].

II-2 Le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase a-t-il un rôle dans les étapes de déshydratation ?

a- Analyse par RPE du centre [4Fe-4S]⁺ de la quinolinate synthase en présence des deux substrats

Dans une seconde hypothèse (**Cas 1** et **Cas 2** de la Figure 102), le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase pourrait interagir avec un (des) intermédiaire(s) réactionnel(s) permettant l'élimination d'une ou, des deux molécule(s) d'eau. Pour information, dans le cas de l'aconitase, lors de l'ajout du substrat, l'interaction de ce dernier avec le centre [4Fe-4S] de l'enzyme entraîne une modification du signal RPE importante. En effet, dans ces conditions on observe un déplacement des valeurs de g ainsi qu'une augmentation de la rhombicité du signal comme montré sur la Figure 106. Nous avons effectué une expérience similaire avec NadA, avec dans notre cas une situation un peu plus complexe puisque les intermédiaires qui sont supposés interagir avec le cluster fer-soufre, sont des produits de condensation des 2 substrats. Par conséquent il nous a fallu ajouter NadA, le DHAP et l'iminoaspartate.

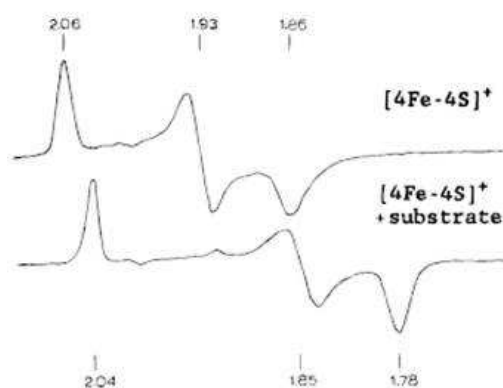


Figure 106 : Spectre RPE du centre [4Fe-4S]⁺ de l'aconitase en l'absence (spectre du haut) et en la présence de substrat (Spectre du bas) enregistré à 13 K, puissance 1 mW et fréquence 9.24 GHz (Beinert H., 1996).

Différents tubes RPE ont ainsi été préparés en boîte à gants. Un premier tube contenant NadA (200 μM) et de l'iminoaspartate (général chimiquement), nous a servi de contrôle afin de vérifier que le centre fer-soufre n'est pas dégradé par ce dernier composé, l'iminoaspartate a été général chimiquement en mélangeant de l'acide oxaloacétique et du sulfate d'ammonium. Un second tube RPE a été réalisé en incubant l'enzyme avec un

mélange des deux substrats (DHAP et Iminoaspartate) pendant 20 minutes, espérant dans ces conditions piéger un intermédiaire réactionnel réagissant avec le centre [4Fe-4S]. Tous les tubes ont été réduits après incubation avec 2 mM de dithionite et analysés par RPE (allure du signal, valeurs de g, comportements en températures et en puissances).

Les signaux obtenus dans les deux conditions testées ci-dessus sont identiques au signal RPE obtenu pour l'enzyme NadA seule (voir Chapitre I des Résultats) réduite avec du dithionite (allure du signal, valeurs de g, comportement en température et en puissance). En effet, le signal obtenu avec le premier tube montre que le centre [4Fe-4S]⁺ ne subit pas de dégradation lors de la génération chimique d'iminoaspartate puisque 80 % du fer total est présent sous cet forme, une proportion similaire à celle obtenue avec la protéine seule. L'analyse du signal obtenu lorsque l'enzyme NadA est mise en présence des deux substrats (IA et DHAP) pendant 20 minutes, montre également un signal RPE avec des valeurs de g ainsi qu'un comportement en puissance et en température identiques à celles obtenues avec l'enzyme seule. Cette analyse par spectroscopie RPE n'a donc pas permis dans les conditions testées de mettre en évidence d'interaction des substrats ou d'intermédiaires réactionnels avec le centre [4Fe-4S]⁺ de l'enzyme.

Cependant, comme dans le cas précédemment rapporté avec le DHAP seul, nous avons voulu nous assurer que l'état rédox n'était pas en cause dans l'absence d'interaction, et par conséquent les mêmes échantillons ont donc été préparés (avec de la protéine marquée au ⁵⁷Fe et sans réduction au dithionite) et analysés par spectroscopie Mössbauer.

b- Analyse par spectroscopie Mössbauer de NadA en présence des deux substrats

Dans des conditions identiques à celles décrites pour le DHAP, nous avons préparé différentes cellules Mössbauer de la protéine NadA [⁵⁷Fe-S]. Quatre conditions ont été testées : NadA seule (500 μM) ; deux conditions contrôle avec la protéine NadA (500 μM) incubée en présence soit du mélange acide oxaloacétique (10 mM) et sulfate d'ammonium (5 mM) (équivalent à IA seul), soit avec du DHAP seul (2 mM) ; le dernier échantillon correspondant à NadA (500 μM) incubée avec les deux substrats : DHAP (2 mM) et le mélange acide oxaloacétique (10 mM) et sulfate d'ammonium (5 mM). Après 20 minutes d'incubation à température de la boîte à gants (18° C), les cellules ont été congelées en anaérobiose et analysées par spectroscopie Mössbauer par Y. Sanakis (NCSR, Attiki, Grèce). Les spectres Mössbauer obtenus dans ces conditions sont présentés Figure 107. L'analyse

effectuée à deux températures 4.2 K et 78 K permet de distinguer pour chacune des conditions testées, les différentes formes de centre [Fe-S] et de les quantifier. La superposition des différents spectres expérimentaux obtenus à 4.2 K correspondant aux 4 conditions citées ci-dessus, indiquée Figure 107, montre de façon immédiate et très claire qu'il n'existe pas de différence entre les spectres. En effet, le spectre de la protéine NadA sans substrats (●) est superposable à celui de la protéine NadA mise en présence de DHAP (●), d'IA (●) et de DHAP+IA (●). Dans toutes les conditions, le spectre expérimental correspond à un mélange de deux doublets dont l'un majoritaire (80 %) possède les paramètres d'un centre $[4Fe-4S]^{2+}$ l'autre, minoritaire (20 %) correspondant au $[2Fe-2S]^{2+}$. Les paramètres obtenus sont donc identiques pour les quatre spectres et sont similaires à ceux obtenus pour l'enzyme seule (Tableau 41).

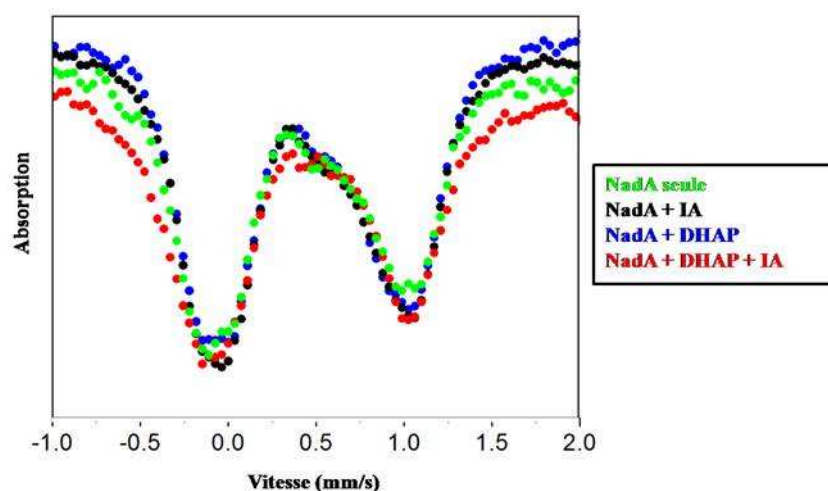


Figure 107 : Spectres Mössbauer enregistrés à 4.2 K obtenus pour la protéine NadA d'*E. coli* sans substrats (en vert), en présence d'iminoaspartate (IA) (en noir), de DHAP (en bleu) et du mélange IA/DHAP (en rouge).

En conclusion, les analyses effectuées par spectroscopie RPE, Hyscore et Mössbauer sur la protéine NadA en présence de ses différents substrats, seul ou en combinaison, n'ont pas permis de mettre en évidence d'interaction entre le centre métallique $[4Fe-4S]$ de l'enzyme et le DHAP ou un (des) intermédiaire(s) réactionnel(s). Ainsi ces analyses ne nous ont pas permis d'avancer dans les conditions testées, dans la validation du rôle du centre [Fe-S] de la quinolinate synthase dans la catalyse enzymatique.

II- Etude du mécanisme réactionnel de la quinolinate synthase

Comme je l'ai indiqué dans la Figure 101, deux hypothèses de mécanismes réactionnels ont été proposées par Nasu S. et Begley T.P. La différence majeure entre les deux hypothèses réside dans le passage ou non par le Glycéraldéhyde 3-P entraînant un départ plus ou moins précoce de la molécule de Pi.

Afin de déterminer précisément l'enchaînement et la nature des différentes étapes du mécanisme réactionnel de condensation de l'iminoaspartate et du DHAP par la quinolinate synthase et dans le but de déterminer si l'une ou l'autre des hypothèses proposées est vérifiable, notre point de départ a été de vérifier si comme le propose Begley T.P., NadA est capable d'utiliser le G-3P comme substrat.

II-1 Le Glycéraldéhyde 3-Phosphate est substrat de NadA

Comme je l'ai indiqué dans mon introduction, le Glycéraldéhyde 3-P a déjà été testé comme substrat en 1973 par Suzuki N., cependant les tests avaient été réalisés sur des protéines partiellement purifiées, conditions dans lesquelles il était difficile de s'affranchir d'une éventuelle contamination (triose phosphate isomérase), ce à quoi d'ailleurs les auteurs avaient conclu (Suzuki N., 1973).

Afin de vérifier si l'enzyme pure et nouvellement caractérisée est capable d'utiliser le G-3P comme substrat, un test enzymatique « quinolinate synthase » a été effectué dans les conditions standard définies dans le Chapitre M&M, en utilisant soit le DHAP soit le Glycéraldéhyde 3-Phosphate comme substrat en plus de l'iminoaspartate. Ce dernier a été généré enzymatiquement à l'aide de NadB (7.1 μ M), de L-Aspartate (33 mM), avec comme accepteur d'électrons le fumarate (25 mM). Des quantités croissantes de DHAP ou de G-3P, comprises entre 0 et 5 mM, ont été utilisées et le test enzymatique effectué sur 20 minutes à 37 °C en boîte à gants. Les quantités d'acide quinolinique formées en une minute lors de l'utilisation de DHAP ou de G-3P comme substrat sont rapportées dans la Figure 108. On remarque rapidement qu'il y a également formation d'acide quinolinique lors de l'ajout de G-3P et que donc le Glycéraldéhyde 3-P est substrat de NadA. Cependant, la production d'acide quinolinique est inférieure à celle obtenue avec le DHAP puisqu'on forme au maximum

1.2 nmoles/min en utilisant du G-3P contre 1.6 nmoles/min avec le DHAP (soit une vitesse de formation d'acide quinolinique de l'ordre de 25 % inférieure avec le G-3P par rapport à la vitesse obtenue avec le DHAP). Cette première observation est favorable à la proposition de Suzuki N. (Suzuki N., 1973) reprise dans l'hypothèse de mécanisme de Begley T.P., proposant que le G-3P peut être utilisé par l'enzyme lors de la formation d'acide quinolinique (Begley T.P., 2001).

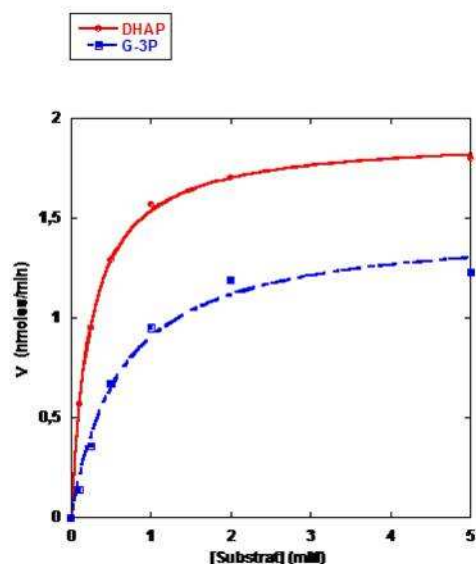


Figure 108 : Suivi de la vitesse de formation de l'acide quinolinique avec des quantités croissantes soit de DHAP, soit de G-3-P.

II-2 Mise en évidence d'une nouvelle activité pour la quinolinate synthase

Nous savons que la quinolinate synthase est capable d'utiliser le Glycéraldéhyde-3-phosphate comme substrat. L'étape suivante dans la validation de l'hypothèse émise par Begley T.P. était de savoir si l'enzyme NadA était capable d'effectuer la conversion du DHAP en G-3P en l'absence d'iminoaspartate. Pour ceci, deux systèmes enzymatiques ont été utilisés, l'un permettant de doser la quantité de DHAP consommé, l'autre la quantité de G-3P formé :

- Le premier utilise la Glycérophosphate déshydrogénase (GPDH) qui convertit le DHAP en Glycérol-3-phosphate en oxydant le NADH en NAD⁺. Cette enzyme nous a permis de mesurer la quantité de DHAP présente dans la solution, et la quantité de DHAP restante après incubation de la quinolinate synthase avec le DHAP.

- La deuxième enzyme est la Glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase (GAPD) qui transforme le Glycéraldéhyde 3-P en 1,3-diphosphoglycérate en réduisant le NAD^+ en NADH. Cette enzyme permet de mesurer la quantité de G-3P présent en solution, et donc potentiellement formé en incubant NadA avec le DHAP.

II-2-1 Conversion du DHAP en Glycéraldéhyde 3-phosphate

a- Mesure de l'activité GPDH

Afin de déterminer si la quinolinate synthase est capable de convertir le DHAP en Glycéraldéhyde 3-P, nous avons utilisé la Glycérophosphate déshydrogénase, qui nous permet de suivre la quantité de DHAP présente dans la solution après incubation de NadA avec le DHAP (Figure 109). En suivant l'hypothèse selon laquelle la quinolinate synthase convertit le DHAP en G-3P, on s'attend à une diminution de la quantité de DHAP présent en solution avec le temps d'incubation (comme indiqué Figure 109) qui se mesure par une diminution de la variation d'absorption à 340 nm correspondant à l'oxydation du NADH.

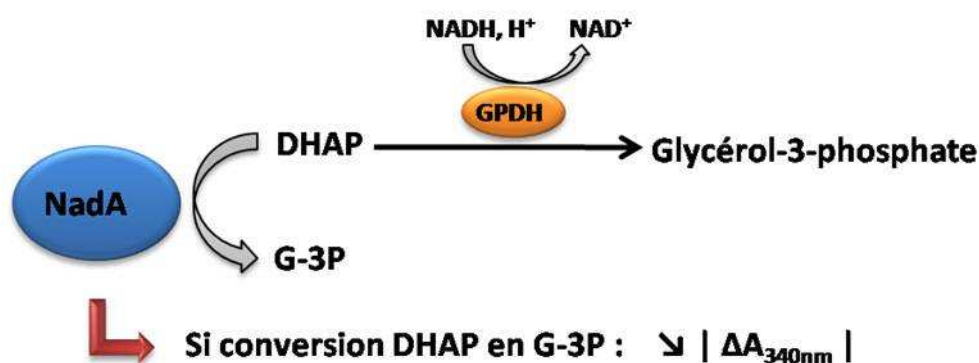


Figure 109 : Système enzymatique (GPDH/NADH) utilisé pour mesurer la quantité de DHAP présente en solution.

Dans un premier temps, nous avons mis au point le test enzymatique et vérifié la capacité de l'enzyme, la GPDH, à catalyser la transformation du DHAP en Glycérol 3-phosphate. La Figure 110A montre la diminution de l'absorbance à 340 nm enregistrée lors de l'ajout de la GPDH (0.25 μM) à une solution contenant du NADH (150 μM) et du DHAP (100 μM) dans du Tampon G. La quantité de DHAP calculée est égale à 96 μM en 2 minutes correspondant à la quasi totalité du DHAP mis en solution. L'activité spécifique de la GPDH déterminée est de 4.8 $\mu\text{moles/mg/min}$. Le même test a ensuite été effectué en incubant NadA avec du DHAP. Pour cela, des aliquots d'un mélange incubé à 37 °C contenant la quinolinate

synthase (25 μM) et du DHAP (100 μM) dans du Tampon G ont été prélevés à différents temps allant de 0 à 60 minutes, temps au bout desquels le NADH (150 μM) et la GPDH (0.25 μM) ont été ajoutés et la mesure de l'absorbance à 340 nm suivie. Sur la Figure 110B, sont représentées trois mesures d'absorbance à 340 nm obtenues lorsque l'enzyme NadA a été incubée avec du DHAP pendant 0, 20 et 40 minutes d'incubation à 37 °C (trace bleue, rose et violette). On remarque une même variation d'absorbance à 340 nm, c'est-à-dire une même quantité de NADH consommée quel que soit le temps d'incubation (88 μM à t_0 , 90 μM à t_{20} et 91 μM à t_{40}). Ceci montre qu'il y a dans le milieu réactionnel la même quantité de DHAP après 20 min. et 40 min. d'incubation que sans incubation (t_0) (Figure 110) semblant indiquer que NadA n'est pas capable de convertir le DHAP en G-3P.

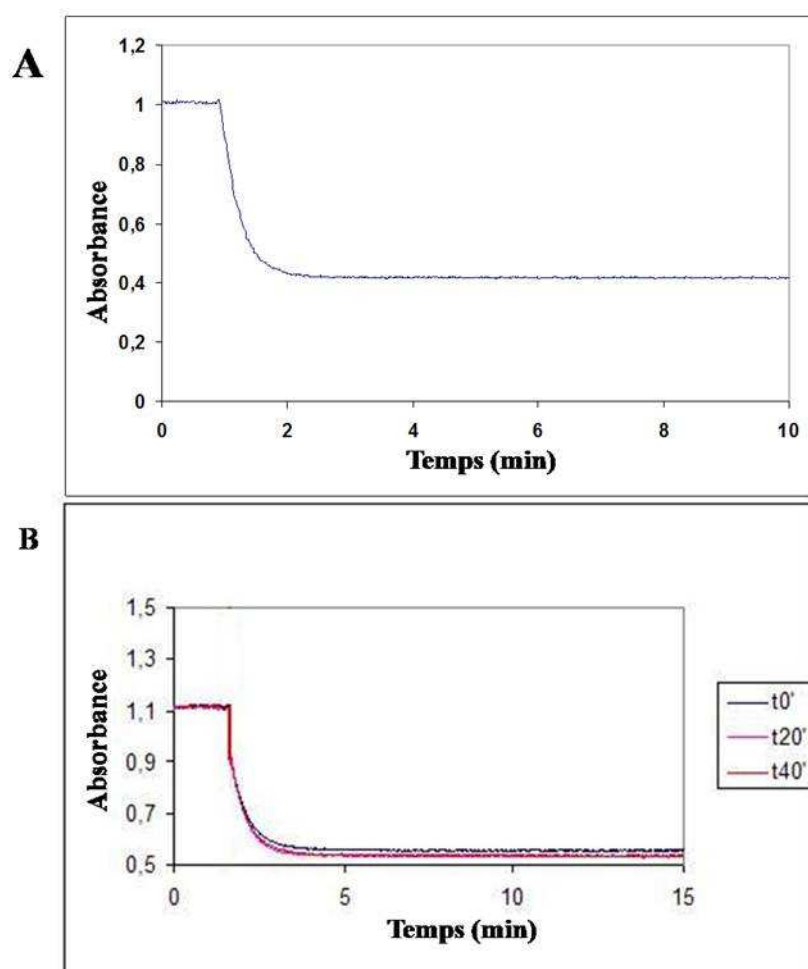


Figure 110 : Dosage de la quantité de DHAP présent en solution par la GPDH grâce au suivi de l'absorbance à 340 nm de l'oxydation du NADH. **(A)** Mesure de l'activité GPDH avec GPDH (0.25 μM), NADH (150 μM) et DHAP (100 μM). **(B)** Mesure de la quantité de DHAP présent dans la solution par mesure de l'activité GPDH (avec GPDH 0.25 μM et NADH (150 μM)) après incubation de NadA (25 μM) avec DHAP (100 μM), différents temps (t_0 , t_{20} et t_{40}) à 37 °C.

b- Mesure de l'activité GAPD c'est-à-dire de la formation de G-3P à partir du DHAP.

La seconde méthode que nous avons choisie pour déterminer si la quinolinate synthase est capable de convertir le DHAP en G-3P utilise la glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase (GAPD). Comme je l'ai déjà dit, cette dernière enzyme utilise le G-3P et le convertit en 1,3-diphosphoglycérate. Si la quinolinate synthase forme du G-3P à partir du DHAP, le G-3P pourra être dosé grâce à ce système enzymatique utilisant la GAPD et le NAD^+ , avec dans ce cas, une augmentation de l'absorbance à 340 nm correspondant à la présence de G-3P (Figure 111).

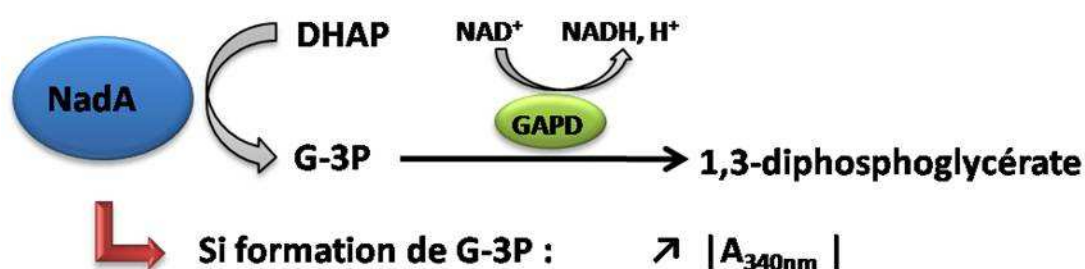


Figure 111 : Système enzymatique (GAPD/ NAD^+) utilisé pour mesurer la quantité de G-3P présente en solution.

Comme précédemment, la GAPD est testée dans un premier temps pour sa capacité à transformer le Glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate. La GAPD ($0.3 \mu\text{M}$) est ainsi ajoutée à un mélange contenant du G-3P commercial ($100 \mu\text{M}$) et du NAD^+ (1 mM) dans du Tampon Phosphate et la variation de l'absorbance à 340 nm mesurée (Figure 112, Courbe bleue). On observe une augmentation de l'absorbance importante sur 5 minutes qui se stabilise à 15 minutes. La variation d'absorbance indique que $96 \mu\text{M}$ de NAD^+ sont convertis en NADH en 15 minutes, et que l'enzyme est donc active puisqu'elle est capable de convertir la quasi intégralité du G-3P ajouté initialement dans le mélange réactionnel ($100 \mu\text{M}$). L'activité enzymatique déterminée ici pour la GAPD correspond à une activité spécifique égale à $0.64 \mu\text{moles/min/mg}$ en accord avec celle proposée par le fabricant.

Afin de déterminer par la suite si la quinolinate synthase est capable de catalyser la formation de G-3P à partir du DHAP, nous avons incubé l'enzyme NadA ($50 \mu\text{M}$) en présence de DHAP (5 mM) pendant 20 minutes à 37°C puis ajouté le NAD^+ (1 mM) et l'enzyme GAPD ($0.3\mu\text{M}$). Le suivi de l'absorbance à 340 nm représenté Figure 112, (Courbe rose) montre une légère augmentation de l'absorbance à 340 nm, nettement inférieure par rapport au contrôle. La variation d'absorbance mesurée sur 15 minutes est égale à 0.04

correspondant à une quantité de 6.4 μM de G-3P soit 0.13 % du DHAP mis au départ. Cette quantité correspond à quelques micromolaires prêts à la quantité de G-3P formé lorsqu'on laisse du DHAP (5 mM) en solution à 37°C pendant 20 minutes. Nous avons par ailleurs vérifié que la présence de DHAP ou de Fe et de S liés à la présence de NadA ne perturbe pas l'activité GAPD (même quantité de G-3P convertie par la GAPD en l'absence ou en la présence de DHAP ou de Fe et de S (quantité ajoutés correspondant à 4 fers par protéine soit 200 μM)). De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons affirmer que la quinolinate synthase ne semble pas catalyser la conversion du DHAP en G-3P.

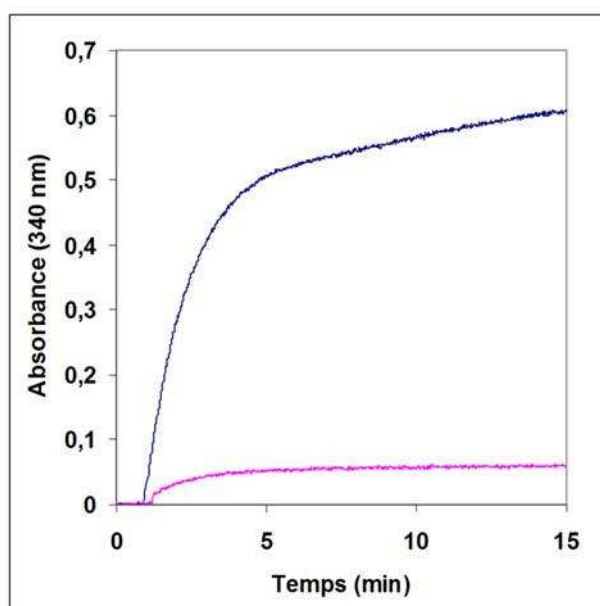


Figure 112 : Dosage de la quantité de G-3P présente en solution par la GAPD grâce au suivi de l'absorbance à 340 nm du NADH. **Courbe bleu :** vérification de l'activité GAPD avec du G-3P commercial (100 μM), du NAD^+ (1 mM) et de la GAPD (0.3 μM) ; **Courbe rose :** mesure de la quantité de G-3P présente en solution par la mesure de l'activité GAPD lorsque NadA (50 μM) est incubée en présence de DHAP (5 mM) pendant 20 min à 37°C suivi de l'ajout de NAD^+ (1 mM) et de GAPD (0.3 μM).

Grâce à ces deux tests enzymatiques utilisant la GPDH et la GAPD, nous avons établi que malgré sa capacité à utiliser le G-3P comme substrat pour l'activité quinolinate synthase, la protéine NadA n'est pas capable d'effectuer la transformation du DHAP en G-3P allant à l'encontre de l'hypothèse de mécanisme proposée par Begley T.P. (Begley T.P., 2001). Nous avons donc cherché à déterminer si, inversement, l'enzyme était capable d'effectuer la réaction de transformation du G-3P en DHAP. Pour ceci nous avons utilisé le système GPDH pour mesurer la quantité de DHAP présente en solution, qui dans cette hypothèse se formerait

au cours du temps et devrait conduire à une variation d'absorbance à 340 nm (diminution de l'absorbance à 340 nm), correspondant à l'oxydation du NADH en NAD⁺ qui est directement reliée à la quantité de DHAP dans le milieu réactionnel (Figure 113).

II-2-2 Conversion du G-3P en DHAP

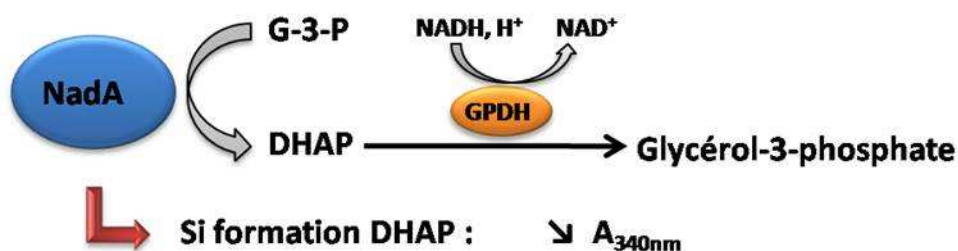


Figure 113 : Système enzymatique (GPDH/NADH) utilisé pour mesurer la quantité de DHAP présente en solution.

Comme contrôle, nous avons vérifié l'activité intrinsèque de la GPDH avec du DHAP commercial comme je l'ai précédemment présenté.

Concernant l'expérience avec NadA, nous avons effectué le suivi de la formation de DHAP à partir de G-3P sur une échelle de temps de l'heure. Pour cela, un même mélange réactionnel contenant la protéine NadA (15 μ M) et du G-3P (1.5 mM) a été effectué dans du Tampon G. A différents temps d'incubation à 37 °C (0, 2', 5', 10', 20', 30', 50' et 60'), un aliquot a été prélevé auquel il a été ajouté du NADH (1.8 mM). Après stabilisation de l'absorbance à 340 nm (30s), la GPDH (0.8 μ M) a été ajoutée et le suivi de l'absorbance à 340 nm initié. La variation d'absorbance mesurée à 340 nm pour chaque aliquot nous a permis de déterminer la quantité de DHAP formée au cours du temps et c'est ce qui est représenté Figure 114. On observe une augmentation de la formation de DHAP avec une quantité maximale de 1.1 mM de DHAP formée au-delà de 10 minutes. Lorsque la même expérience a été réalisée en absence de NadA, on observe au cours du temps une formation linéaire de DHAP. Cette quantité de DHAP formée en absence de NadA est nettement inférieure à celle formée en présence de l'enzyme, puisqu'on dose 20 μ M de DHAP contre 750 μ M en présence de NadA au bout de 10 min. d'incubation. On obtient une activité spécifique de conversion de G-3P en DHAP égale à 0.18 μ mole/min/mg. L'ensemble de ces résultats montre plusieurs choses : (i) NadA est capable de convertir du G-3P en DHAP et possède donc une activité Triose Phosphate Isomérase ; (ii) NadA accélère la réaction de

conversion du G-3P en DHAP d'un facteur 30 par rapport à la conversion du G-3P en DHAP en solution en son absence.

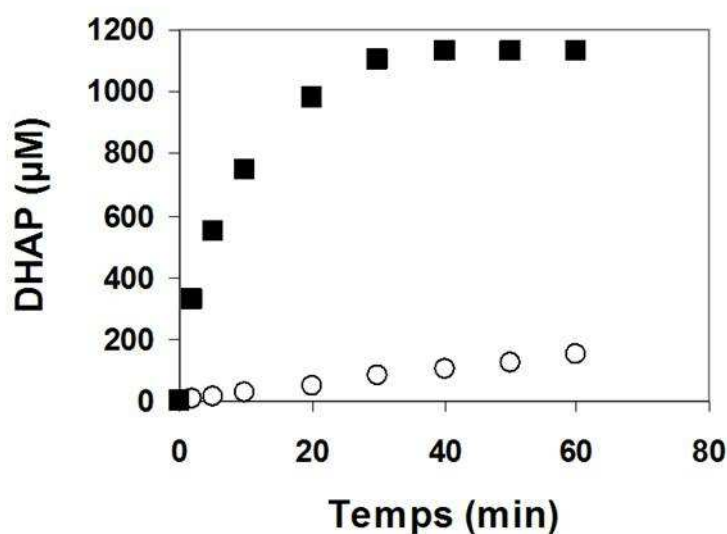


Figure 114 : Cinétique de formation du DHAP à partir de G-3P à 37°C. **Courbe (■) :** en présence de NadA (15 µM) d'*E. coli*, **Courbe (○) :** en absence de NadA. La réaction est réalisée avec du G-3P : 1.5 mM, du NADH : 1.8 mM et de la GPDH : 0.8 µM dans un volume final de 250 µl de Tampon G.

- Nouvelle activité triose phosphate isomérase (G-3P→DHAP) pour NadA, détermination des constantes cinétiques (K_m , V_{max})

Afin de déterminer la V_{max} et le K_m de la quinolinate synthase pour le G-3P, nous avons suivi la quantité de DHAP formée par la quinolinate synthase pour des quantités variables de substrat G-3P comprises entre 0 et 1.4 mM, pour une durée d'incubation de NadA (15 µM) et du G-3P de 2 minutes à 37 °C, temps se situant dans la partie linéaire de formation du DHAP (Figure 114). Les résultats obtenus, correspondant à une expérience isolée, sont représentés Figure 115. La courbe obtenue permet d'accéder au K_m déterminé comme étant égal à 0.20 mM et à la V_{max} déterminée à 35 nmoles/min (Figure 115). Cette expérience a été répétée 4 fois et conduit à des résultats similaires (variation de 0.05 mM pour le K_m et de 5 nmoles/min pour la V_{max}). Le K_m de NadA pour le G-3P est donc légèrement inférieur à celui que nous avons déterminé pour le DHAP qui je le rappelle est égal à 0.4 mM. La quinolinate synthase possède donc une affinité du même ordre de grandeur pour le G-3P et pour DHAP.

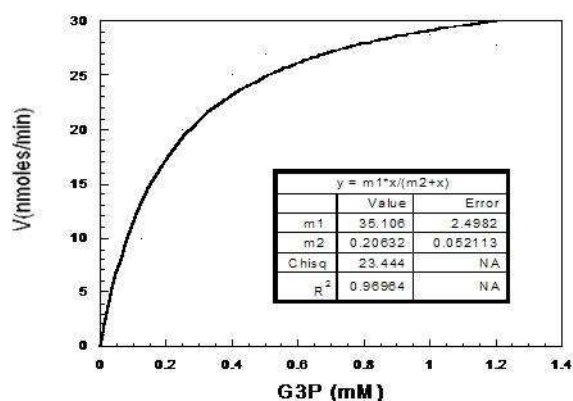


Figure 115 : Détermination de la vitesse maximale (V_{\max}) et de la constante d'affinité (K_m) de la quinolinate d'*E. coli* pour le G-3P.

- Nécessité du centre [Fe-S] pour la transformation de G-3P en DHAP par NadA ?

La quinolinate synthase est capable de convertir le G-3P en DHAP ; par ailleurs, on sait que le centre [Fe-S] est nécessaire à la formation d'acide quinolinique. Nous avons tenté de savoir si cette nouvelle activité de NadA de conversion du Glycéraldéhyde 3-P en DHAP nécessitait également la présence du centre [4Fe-4S] ou pas, soit en d'autres termes si la protéine sous forme d'une apo-protéine, ou bien exposée à l'oxygène (que l'on sait inactive pour la formation d'acide quinolinique) catalyse la formation de DHAP à partir du G-3P. Pour cela, nous avons exposé la protéine (15 μ M) 30 minutes à l'oxygène, conditions dans lesquelles on sait que le centre [4Fe-4S] est dégradé, puis nous avons ajouté du G-3P (1.5 mM), puis laissé le mélange réactionnel incuber pendant 15 minutes à 37 °C. Par la suite, l'activité GPDH a été mesurée comme précédemment décrit (NADH 1.8 mM, GPDH 0.8 μ M). D'après la variation d'absorbance à 340 nm, nous avons déterminé que 900 μ M de DHAP ont été formés en 10 minutes, correspondant à une activité spécifique de 0.16 μ moles/min/mg contre 0.18 μ moles/min/mg pour la protéine NadA avec son centre [4Fe-4S] montrant que la présence du centre [4Fe-4S] n'est pas absolument nécessaire à cette activité de conversion du G-3P en DHAP. Des résultats similaires ont été obtenus avec NadA sous forme d'apoprotéine préparée par l'ajout d'EDTA (15 mM) et dithionite (10 mM) suivie du passage sur NAP-25 (voir le Chapitre M&M).

II-3 Le PGH inhibe-t-il l'activité quinolinate synthase lors de l'utilisation du G-3P comme substrat ?

Comparaison de l'inhibition par le PGH en utilisant le DHAP ou le G-3P comme substrat

Nous venons d'établir que le G-3P est substrat de NadA, et je rappelle que nous avons montré que le PGH était inhibiteur de l'activité quinolinate synthase (Chapitre II des Résultats). Nous avons donc souhaité par la suite savoir si l'enzyme NadA était inhibée par le PGH de la même façon lorsque l'on utilise le DHAP ou le G-3P comme substrat, en présence d'iminoaspartate. Nous avons donc effectué le test enzymatique standard de mesure de l'activité quinolinate synthase dans quatre conditions :

- Un test dans lequel on a ajouté du DHAP (2 mM). Ce test sert de contrôle positif d'activité quinolinate synthase.
- Un test dans lequel on a ajouté du DHAP (2 mM) et du PGH (15 μ M), comme décrit dans le Chapitre II des Résultats. Ce test nous sert de référence d'inhibition.
- Un test dans lequel on a ajouté du G-3P (2 mM) seul. Ce test sert de contrôle d'activité quinolinate synthase avec le G-3P.
- Un autre test dans lequel on a ajouté du G-3P (2 mM) et du PGH (15 μ M).

Dans chacun des cas, le test enzymatique a été effectué en utilisant NadA à 7.1 μ M, NadB à 7.1 μ M, le L-Aspartate à 33 mM, le fumarate à 25 mM avec un temps de réaction enzymatique de 20 minutes à 37 °C. La réaction a été arrêtée par ajout d'acide sulfurique et le contenu en acide quinolinique mesuré par HPLC. Les activités spécifiques obtenues sont rapportées dans le Tableau 42.

	AS (μ moles/min/mg)
DHAP (2 mM)	0.066
DHAP + PGH (15 μ M)	0.019
G-3P (2 mM)	0.046
G-3P + PGH (15 μ M)	0.005

Tableau 42 : Activités spécifiques (AS) de la quinolinate synthase comparant l'effet du PGH lors de l'utilisation du DHAP ou du G-3P comme substrat de l'enzyme.

Comme on peut le voir dans le Tableau 42, on retrouve des activités spécifiques cohérentes en présence de DHAP et de G-3P comme substrat, avec respectivement 0.066 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ et 0.046 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Le pourcentage d'inhibition obtenu avec le PGH en utilisant le DHAP (2 mM) comme substrat est de 72 %, résultat en accord avec celui rapporté dans le Chapitre II des Résultats. Lors de l'utilisation du G-3P comme substrat, on observe une perte de 89 % de l'activité quinolinate synthase par le PGH. La quinolinate synthase est donc inhibée par le PGH lorsqu'elle utilise le G-3P ou le DHAP comme substrat.

Discussion

Rôle du centre [Fe-S] dans l'activité enzymatique

C'est très tôt que la quinolinate synthase au regard de la réaction qu'elle catalyse, est proposée comme appartenant à la famille des déshydratases notamment par Fridovich I., qui propose également au vu de la sensibilité de l'enzyme à l'oxygène, la présence d'un centre [Fe-S] de type [4Fe-4S] (Gardner P.R., 1991a). En 2005, notre laboratoire et celui de Squire Booker mettent en évidence que la quinolinate synthase possède bien un centre [4Fe-4S], qu'il est sensible à l'oxygène, et montrent qu'il est essentiel à l'activité de l'enzyme (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005). Les deux réactions de déshydratation catalysées, le caractère essentiel du centre [4Fe-4S] pour l'activité ainsi que sa sensibilité à l'oxygène amènent à penser que le centre [4Fe-4S] pourrait jouer un rôle dans la catalyse enzymatique en temps qu'acide de Lewis comme dans le cas de l'aconitase et des Déshydratases. Nos résultats, à savoir la coordination du centre fer-soufre par 3 résidus cystéines : les Cys113, Cys200 et Cys297, (Chapitre I des Résultats), et la formation d'un centre $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ lors d'une exposition rapide (10 min) de la protéine à l'oxygène nous confortent dans cette idée. En effet, ces caractéristiques que l'on retrouve chez l'aconitase et les déshydratases suggèrent fortement l'existence d'un centre [4Fe-4S] avec un des 4 atomes de fer du centre « différencié », c'est-à-dire un atome de fer qui n'est pas coordonné par un acide aminé de la chaîne polypeptidique et qui peut lier une molécule d'eau ou de substrat suivant les conditions réactionnelles, et qui dans ce dernier cas, de part son rôle en tant qu'acide de Lewis, favorise l'élimination d'une molécule d'eau conduisant au produit de la réaction (Beinert H., 1996 ; Flint D.H., 1996). Ceci nous a conduits à proposer 3 possibilités d'interventions du rôle du centre [4Fe-4S] dans la catalyse (voir Cas 1, 2 et 3 Figure 102). Les diverses spectroscopies utilisées (RPE, Hyscore et Mössbauer) sur l'enzyme métallée en présence des substrats (DHAP et IA), ajoutés séparément ou conjointement, ne nous ont pas permis de vérifier l'une des hypothèses proposées (Cas 1, Cas 2 ou Cas 3) suggérant qu'il n'existe pas d'interaction, ni entre le centre [4Fe-4S] et le DHAP (Cas 3), ni entre le centre [4Fe-4S] et un(des) intermédiaires réactionnels (Cas 1 et 2). Ces résultats ont été obtenus quel que soit l'état redox du centre [4Fe-4S]. Néanmoins, une telle interaction ne peut pas être exclue car plusieurs explications peuvent être proposées visant à expliquer qu'aucune interaction n'a été observée :

- Lors des expériences mentionnées ci-dessus (RPE, Hyscore, Mossbauer), nous avons utilisé un maximum de 10 excès de substrat par rapport à l'enzyme. Il est possible qu'à cette concentration, l'interaction entre un intermédiaire réactionnel et le centre métallique ne puisse pas être détectée grâce aux techniques spectroscopiques utilisées. Malheureusement, dans notre cas, nous n'avons pas pu essayer des concentrations supérieures en substrat qui entraînent (surtout dans le cas d'IA généré chimiquement) la précipitation de la protéine. L'utilisation d'un autre type de sel d'ammonium pour générer IA (le chlorure d'ammonium par exemple) permettrait peut être d'augmenter les quantités ajoutées en évitant la précipitation de la protéine.

- De plus, il a été montré dans le cas de l'aconitase d'*E. coli* que l'ajout de 100 excès de substrat (citrate) n'a aucun effet sur le signal RPE enregistré (forme et valeur de g) (Bennett B., 1995), mettant ici en évidence qu'une interaction peut avoir lieu, mais ne pas être détectée par la technique spectroscopique utilisée (ici la RPE).

- Enfin, on peut également penser que l'interaction du (des) intermédiaires réactionnels avec le centre métallique soit très transitoire et que les techniques spectroscopiques utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence cette interaction.

Nous arrivons donc à la conclusion que les techniques spectroscopiques utilisées (RPE, Hyscore et Mössbauer), ne nous ont pas permis la mise en évidence d'interaction(s) entre le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase et le substrat DHAP ou un(des) intermédiaire(s) réactionnel(s). On pourrait imaginer utiliser d'autres techniques spectroscopiques pour mettre en évidence de telles interactions : - dans l'idée d'un centre [4Fe-4S] avec un fer différencié on pourrait mettre en évidence ce site « différencié » par spectroscopie ENDOR en utilisant de l'eau marquée, H_2O^{17} . La spectroscopie de résonance Raman pourrait également nous renseigner sur le changement d'environnement du centre métallique lors de l'ajout des substrats ou d'inhibiteurs. En effet, il a été montré sur l'aconitase que l'ajout d'un inhibiteur, le nitroisocitrate, entraîne un changement drastique du spectre de résonance Raman, la bande la plus intense du cluster (à 339 cm^{-1}) n'est plus majoritaire et l'apparition d'une nouvelle bande majoritaire à 356 cm^{-1} est observée. Lors de l'ajout du substrat isocitrate, le changement est moins important, avec un spectre intermédiaire entre celui obtenu avec l'enzyme seule, et celui obtenu avec le nitroisocitrate. Cependant la superposition du spectre de l'enzyme seule à celui observé en présence de nitroisocitrate donne à peu de chose près le spectre obtenu en présence de citrate (Beinert H., 1996). Il serait donc intéressant au vu de ce qui a été constaté pour l'aconitase, d'étudier

l'effet de l'ajout des substrats, ou des inhibiteurs sur le centre [4Fe-4S] de NadA grâce à cette dernière technique.

En conclusion, nous n'avons pas pu démontrer un rôle pour le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase dans la catalyse enzymatique. Cependant, par les techniques spectroscopiques citées ci-dessus (ENDOR et Raman) nous espérons à l'avenir mettre en évidence le rôle du centre [4Fe-4S] dans la catalyse enzymatique.

Dans l'hypothèse où le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase n'aurait pas un rôle dans la catalyse enzymatique, il aurait un rôle dans le maintien de la structure de l'enzyme. Si on regarde dans la littérature des centres [Fe-S], on s'aperçoit qu'au fil des années le nombre de centre [Fe-S] n'ayant qu'un rôle structural n'a cessé de diminuer. En effet, jusqu'à présent, il était admis que certaines protéines [Fe-S] possèdent un cluster n'ayant aucune fonction catalytique, servant simplement à structurer la chaîne polypeptidique. Cette catégorie de protéines [Fe-S] est représentée essentiellement par l'endonucléase III, MutY et la glutamine 5-phosphoribosyle-1-pyrophosphate amidotransférase, les deux premières étant impliquées dans la réparation de l'ADN, la dernière dans la biosynthèse des purines. Cependant de récentes études suggèrent que le cluster [4Fe-4S] de l'endonucléase III et MutY ne serve pas (seulement) à contrôler la structure de la protéine, mais soit impliqué dans un processus rédox permettant la détection et la modification des bases de l'ADN endommagées (Yavin E., 2006). Ainsi le seul exemple de [4Fe-4S] structural est celui de la glutamine 5-phosphoribosyle-1-pyrophosphate amidotransférase, même si aucune étude poussée (tests enzymatiques, spectroscopies avec substrat...) visant à éliminer complètement son rôle dans la catalyse n'a été effectuée depuis sa mise en évidence (Vollmer S.J., 1983). On voit ici que les centres [4Fe-4S] ayant un rôle structural tendent à disparaître au fur et à mesure de l'avancée des recherches, et ceci constitue un élément supplémentaire nous confortant dans l'idée d'un rôle catalytique pour le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase.

Une nouvelle activité triose phosphate isomérase pour la quinolinate synthase.

Lors de notre étude du mécanisme réactionnel de l'enzyme visant à déterminer laquelle des hypothèses émises par Nasu S. ou Begley T.P. était la bonne, nous avons mis en évidence une nouvelle activité pour la quinolinate synthase. En effet, nous avons montré que l'enzyme est capable de catalyser la conversion du G-3P en DHAP. La quinolinate synthase utilise donc le G-3P comme substrat et est capable d'accélérer sa conversion en DHAP d'un facteur 30 par rapport à la conversion naturelle du G-3P en DHAP mesurée à 37°C sur

10 minutes de réaction (Figure 114). Les premiers à observer cette capacité de la quinolinate synthase à utiliser le DHAP et le G-3P comme substrat n'est pas nouvelle. En effet, en 1973 Suzuki N. montre sur des enzymes partiellement purifiées que l'utilisation du DHAP ou du G-3P comme substrat de NadA mène à une formation quasi aussi efficace d'acide quinolinique. Lors de nos expériences, nous avons confirmé la formation d'acide quinolinique à partir de ces deux substrats et nous avons également constaté que l'utilisation du G-3P mène à la formation d'acide quinolinique dans des proportions légèrement inférieures par rapport à celles obtenues avec le DHAP (25 % en moins). Les données de Suzuki N., rapportent une différence de 20 % (Suzuki N., 1973).

Cette capacité de la quinolinate synthase à utiliser ces deux substrats (DHAP et G-3P) mène les auteurs à proposer une contamination par une Triose Phosphate isomérase, qui effectuerait la réaction de conversion du G-3P en DHAP. Afin de vérifier leur hypothèse, ils vont utiliser un inhibiteur de la TIM, le chloroacétol phosphate. Grâce aux différentes conditions résumées dans le Tableau 43 ils vont montrer la perte d'activité quinolinate synthase lors de l'utilisation de glycéraldéhyde 3-P comme substrat en présence de chloroacétol phosphate, les menant à conclure à une contamination par une triose phosphate isomérase qui effectuerait la conversion du G-3P en DHAP, utilisable par NadA comme schématisé Figure 116, le substrat de NadA étant alors le DHAP.

Conditions d'expérience	Activité quinolinate synthase
1- DHAP + NadA + IA	Oui
2- G-3P + NadA + IA	Oui
3- G-3P+NadA+IA+ chloroacétol phosphate	Non
4- DHAP + NadA + IA + chloroacétolphosphate	Oui

Tableau 43 : Résumé des expériences effectuées et de l'activité quinolinate synthase obtenue (Suzuki N. 1972).

Dans nos tests avec NadA, ici une enzyme pure, grâce à des réactions de couplage avec les systèmes enzymatiques GAPD et GPDH nous avons mis en évidence que la quinolinate synthase était capable d'effectuer la conversion du G-3P en DHAP avec un K_m et une V_{max} respectivement de 0.20 mM et 35 nmoles/min.

Ce résultat n'est pas incohérent avec les expériences de Suzuki N. et permet même de les comprendre : lors de l'expérience **3-** (Tableau 43), il est normal de ne pas obtenir

d'activité quinolinate synthase car la conversion du G-3P en DHAP est inhibée par le chloroacétol-Phosphate, alors que dans l'expérience 4- (Tableau 43), l'enzyme NadA est capable d'utiliser directement le DHAP, le chloroacétol phosphate n'ayant aucun effet sur la condensation du DHAP et de l'iminoaspartate comme indiqué dans la Figure 116.

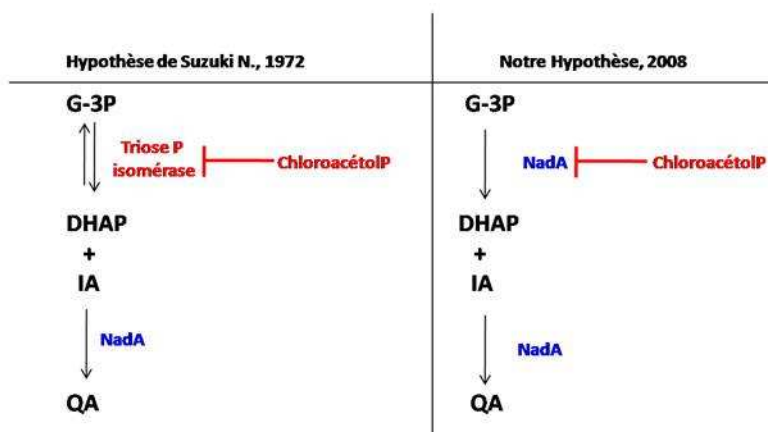


Figure 116 : Mise en parallèle de la proposition de Suzuki N. et de la nôtre sur l'utilisation du G-3P par la quinolinate synthase.

Comment exclure que l'activité TIM observée pour NadA n'est pas due à un contaminant TIM ? Nous ne pouvons pas exclure complètement cette hypothèse mais nous avons collecté plusieurs données nous permettant de l'écarter :

- Premièrement, lorsqu'on regarde un gel SDS-PAGE de la protéine NadA après purification, on observe que celle-ci est obtenue avec une très grande pureté (supérieure à 95 %) comme on peut le voir sur la Figure 48 dans le Chapitre I. De plus, aucune bande autour de 26 000 Da (Masse Moléculaire de la triose phosphate de *E. coli*) n'est observable dans nos conditions de coloration du gel. Néanmoins, ce dernier point n'est pas très convaincant puisque étant donné la très grande activité enzymatique de la triose phosphate isomérase (sens G-3P→DHAP, $k_{cat} = 4.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ et sens DHAP→G-3P, $k_{cat} = 4.3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$), celle-ci peut contaminer notre préparation de NadA en quantité infime, invisible sur gel SDS-PAGE, mais néanmoins suffisante pour permettre d'observer la formation de DHAP à partir de G-3P. Ainsi, la réalisation d'un Western blot avec détection de la triose phosphate par des anticorps, à priori judicieuse, ne semble finalement pas forcément appropriée car ne permettrait peut être pas la détection d'une très faible quantité de TIM contaminante.
- Un second élément de réponse s'opposant à une contamination de la préparation de NadA par la triose phosphate isomérase est apporté par la mesure de l'activité TIM (sens G-3P→DHAP) des quinolinate synthases de *M. tuberculosis* et de *T. maritima*. Dans le 1^{er} cas,

une activité de 0.050 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ a été déterminée et dans le second une activité de 0.090 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$. L'enzyme de *T. maritima* est purifiée par précipitation des protéines à la chaleur (75 °C pendant 20'), et à cette température on considère que toutes les protéines d'*E. coli* précipitent ; ce qui exclut de façon quasi définitive la présence d'une TIM contaminante dans nos préparations et ce qui donne du crédit à notre hypothèse d'activité TIM intrinsèque à NadA.

Afin de conclure de façon définitive sur cette activité TIM portée par NadA une expérience contrôle semble inévitable : exprimer et purifier NadA dans une souche *E. coli* délétée au niveau du gène codant pour la TIM, le gène *tpiA*. Cette souche est disponible au laboratoire depuis peu et les tests de surexpression de NadA sont en cours.

En considérant que nos préparations de NadA ne sont pas contaminées, nous proposons que la quinolinate synthase possède la capacité de convertir un triose phosphate, le G-3P en un second triose phosphate, le DHAP. Les Triose phosphate isomères effectuent comme leur nom l'indique, la réaction d'interconversion de deux trioses phosphates, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP, un cétose) et le Glycéraldéhyde-3-Phosphate (G-3P, un aldose). Lors de nos expériences, nous n'avons pas détecté de formation de G-3P à partir de DHAP, que ce soit en utilisant une mesure indirecte de la quantité de DHAP consommé grâce à la GPDH, ou en utilisant une mesure directe de la quantité de G-3P formée par la GAPD.

L'isomérisation $\text{G-3P} \leftrightarrow \text{DHAP}$ peut se réaliser en l'absence de catalyseur en passant par un intermédiaire cis-ènediol mais la réaction est tellement lente qu'en réalité l'aldose et le cétose sont deux composés stables en l'absence de catalyseur. Les constantes de vitesse mesurées sur les isomères seuls (G-3P et DHAP) en solution aqueuse, à pH 7 et à 30 °C sont égales, dans le sens $\text{DHAP} \rightarrow \text{G-3P}$ à $k = 2.1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ et dans le sens $\text{G-3P} \rightarrow \text{DHAP}$ à $k = 4.3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ avec un K_{eq} égal à 22 (Hall A., 1975 ; Rieder S.V., 1958). Le ΔG° de la réaction ($\text{G-3P} \rightarrow \text{DHAP}$) est égal à -7.5 kJ/mol (soit -1.8 kcal/mol), l'équilibre favorise donc la formation du DHAP. Nous avons pu vérifier la stabilité de chacun des isomères en solution lors des différents contrôles que nous avons effectués. L'incubation du DHAP à 37 °C, conduit à la formation de 0.13 % de G-3P après une incubation de 20 min à 37 °C alors que l'incubation de G-3P à 37°C pendant ce même temps conduit à la formation de 3.3 % de DHAP.

La triose phosphate isomérase accélère la conversion du G-3P en DHAP d'un facteur environ égal à 10^{10} par rapport à la conversion sans enzyme. Une étude complète des différents paramètres cinétiques pour la triose phosphate de poulet (indiquées sur la Figure 117) donne, dans le sens $\text{G-3P} \rightarrow \text{DHAP}$ un $k_{\text{cat}} = 4.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ et un $K_{\text{m}} = 4.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ et dans

le sens DHAP→G-3P un $k_{cat} = 4.3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ et un $K_m = 9.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Straus D., 1985 ; Chu C. H., 2007). La valeur de la constante d'équilibre de la réaction K_{eq} est égale à 21 à 37 °C, pH 7.5, mettant alors en évidence que le DHAP et le G-3P sont maintenus dans un rapport de 21/1 dans la cellule. Ce rapport étant entre autre conservé constant par l'action de la triose phosphate isomérase (Straus D., 1985, Putman S.J., 1972).

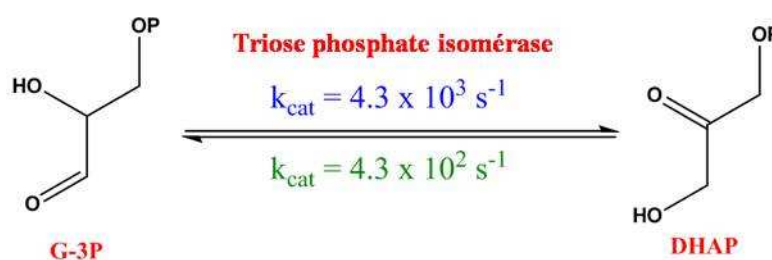


Figure 117 : Réaction de conversion du DHAP en G-3P par la Triose Phosphate Isomérase (TIM). .

Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la quinolinate synthase possède une activité TIM dans le sens DHAP en G-3P (comme la TIM), mais étant donné l'équilibre thermodynamique entre le DHAP et le G-3P ainsi que les données cinétiques rapportées sur les TIM, il est fort probable que nous n'ayons pas pu la détecter dans nos conditions expérimentales.

Importance du glycéraldehyde 3-phosphate dans le métabolisme cellulaire

Dans le métabolisme cellulaire, le G-3P a une place centrale en particulier dans la glycolyse (catabolisme du glucose) ainsi que dans la néoglucogénèse (synthèse du glucose).

Lors de la glycolyse, la Fructose-1,6-BisPhosphate Aldolase (FBPA) libère à partir du Fructose-1,6-bisphosphate du DHAP et du G-3P, et seul le G-3P est utilisé pour l'étape suivante conduisant finalement à la formation de pyruvate (Figure 118). Il est donc nécessaire de maintenir en permanence un pool de G-3P et ceci est réalisé par la triose phosphate isomérase (TIM) comme indiqué Figure 117 (Anderson A., 1969).

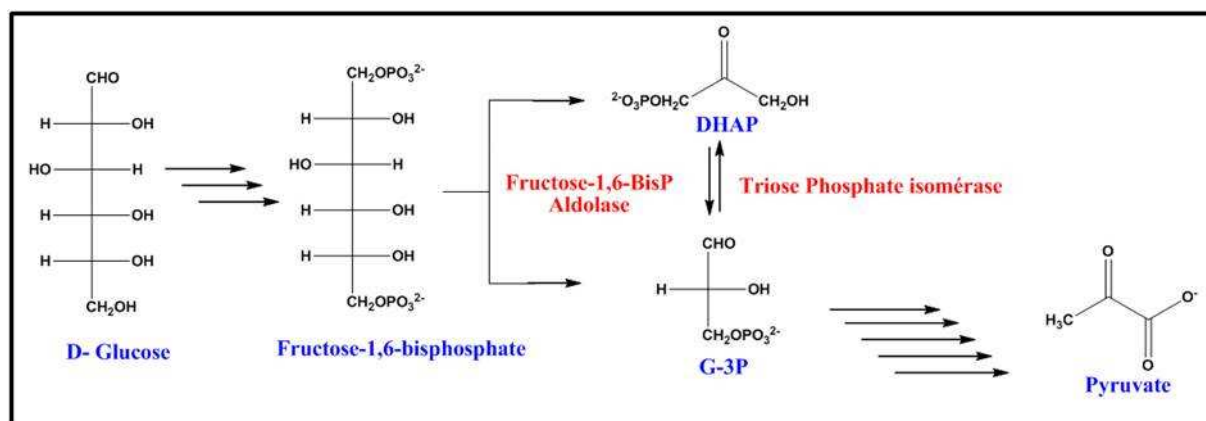


Figure 118 : Vue simplifiée de la glycolyse indiquant la place centrale de la triose phosphate isomérase

In vivo, lorsque le G-3P est utilisé dans la glycolyse, afin de maintenir le pool de G-3P, la TIM convertit le DHAP en G-3P ; et à contrario, lorsque du DHAP est nécessaire pour la néoglucogénèse (synthèse du glucose), le G-3P est converti en DHAP. On voit ici que la cellule possède les outils pour équilibrer ses stocks de DHAP et de G-3P en fonction de ses besoins (Crawford J.M., 1983).

Dans le cas de la quinolinate synthase, l'enzyme est capable d'utiliser le DHAP mais également, comme nous l'avons mis en évidence, le G-3P, grâce à son activité triose phosphate isomérase. On peut imaginer que cette capacité d'utiliser deux substrats puisse être fonction, au niveau cellulaire, des conditions métaboliques. En présence de DHAP, elle l'utilise, en l'absence de DHAP, l'enzyme serait alors capable d'utiliser le G-3P disponible.

Nouvelle proposition de mécanisme avec le nouveau substrat : le G-3P, et proposition pour la participation du centre [4Fe-4S] dans l'activité enzymatique.

Nous avons montré que la quinolinate synthase est capable de convertir le G-3P en DHAP. Begley T.P. propose la conversion inverse celle du DHAP en G-3P, le G-3P se condensant alors avec l'iminoaspartate, lors de l'attaque de l'amine de l'iminoaspartate sur le carbone C-1 de la fonction aldéhyde du G-3P, entraînant une première étape de déshydratation suivie de la cyclisation de la molécule avec le départ du phosphate, puis une seconde déshydratation. Dans la seconde proposition, celle de Nasu S., le DHAP se condense à l'iminoaspartate entraînant la libération du phosphate, suivie de la cyclisation de la molécule avec les deux étapes de déshydratation aboutissant à la formation de l'acide quinolinique.

L'hypothèse de mécanisme que nous proposons présentée Figure 119 correspond à celle proposée par Nasu S., à laquelle nous rajoutons une première étape en l'isomérisation du

G-3P en DHAP, suivie de la condensation du DHAP avec l'iminoaspartate, avec l'attaque du C-3 de l'iminoaspartate sur le C-3 du DHAP, entraînant le départ du phosphate (en effet, l'attaque de la fonction amine de l'iminoaspartate sur le C-1 du DHAP paraît beaucoup moins favorable). Le départ du phosphate est en accord avec les données cristallographiques obtenues sur NadA de *P. horikoshii*, qui excluent la présence du groupement phosphate dans le site actif (contrainte de taille) (Sakuraba H., 2005). Les étapes suivantes consistent en une double déshydratation aboutissant à la cyclisation et la formation d'acide quinolinique comme indiqué sur la Figure 119. Sur cette même Figure 119, j'ai également indiqué les différentes étapes de déshydratation dans lesquelles nous continuons de penser que le centre [4Fe-4S] de l'enzyme puisse jouer un rôle même si nous n'avons aucune preuve aujourd'hui.

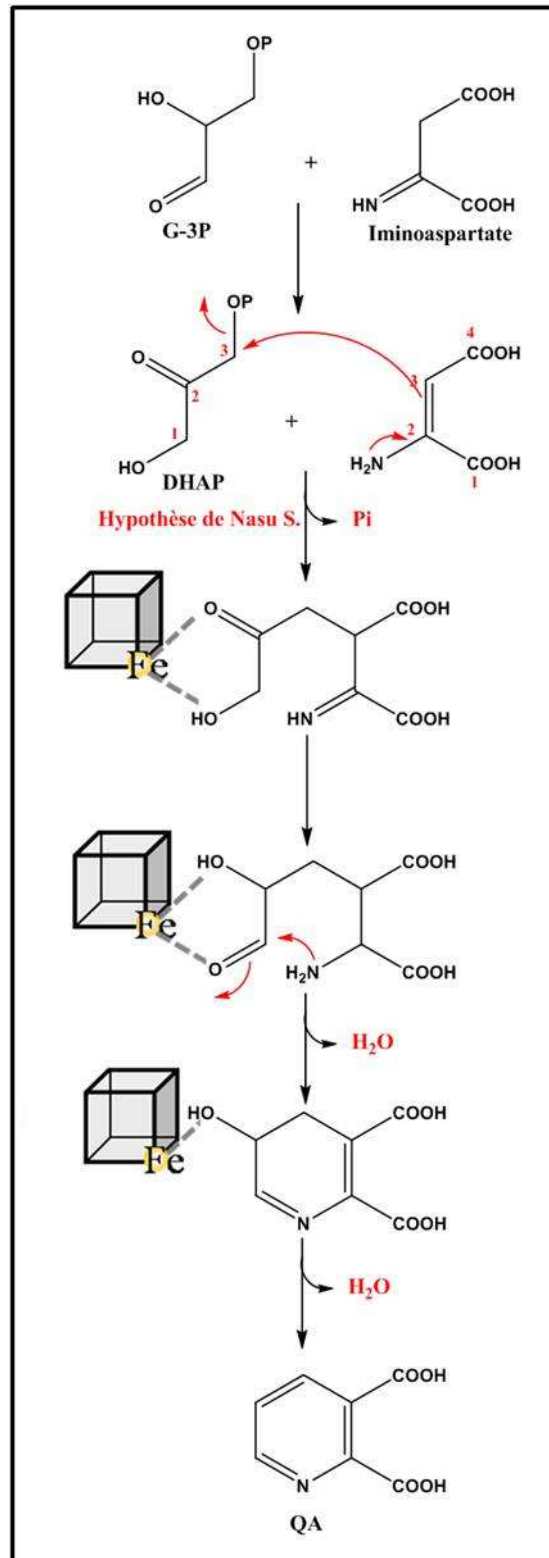


Figure 119 : Hypothèse proposée pour le mécanisme réactionnel de la quinolinate synthase avec le G-3P comme substrat et l'implication du centre [4Fe-4S] au niveau des étapes de déshydratation.

Conclusion Générale

*Conclusion
Générale*

Conclusion Générale

Essentiel à sa stabilité et à son activité, la mise en évidence du centre [Fe-S] de la quinolinate synthase (NadA) a été particulièrement laborieuse. La première indication de la nécessité du centre [Fe-S] a été émise par Fridovich I. en 1991 qui a montré que l'activité quinolinate synthase dans des extraits bactériens était inhibée après exposition des extraits à l'oxygène. La deuxième indication provient de la présence d'un motif CX₂CX₂C dans la séquence en acides aminés de NadA d'*E. coli*, motif souvent retrouvé dans les protéines qui contiennent un centre [4Fe-4S] (Gardner P.R., 1991a).

C'est en 2005 que la quinolinate synthase d'*E. coli* a été caractérisée pour la première fois, par notre laboratoire ainsi que par le laboratoire de Booker S., comme une protéine contenant un centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité et présentant une sensibilité importante à l'oxygène (Ollagnier-de Choudens S., 2005 ; Cicchillo R.M., 2005). Ces deux études se sont alors retrouvées en opposition avec une autre étude parue en 2001 qui rapportait une activité enzymatique pour la quinolinate synthase d'*E. coli* dépourvue de centre [Fe-S] (Cecilian F., 2001). En 2006, une autre étude effectuée sur NadA de *P. horikoshii* en arriva aux mêmes conclusions (Sakuraba H., 2005). Il s'installa alors une controverse quant à l'absolue nécessité du centre [4Fe-4S] dans la réaction catalysée par la quinolinate synthase. Afin de répondre à cette question, nous avons effectué la caractérisation de quinolinate synthases issues de divers microorganismes et avons ainsi pu mettre en évidence que, de la même façon que la quinolinate synthase d'*E. coli*, les quinolinate synthases de *Mycobacterium tuberculosis*, d'*Arabidopsis thaliana* mais également de *Thermotoga maritima* contiennent un centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité enzymatique et sensible à l'oxygène (Chapitre I). Lors d'une exposition à l'oxygène le centre [4Fe-4S]²⁺ se dégrade successivement en centre [3Fe-4S]¹⁺ puis en [2Fe-2S]²⁺ pour ensuite être totalement dégradé et conduire à la formation d'une apoprotéine totalement inactive. Plusieurs études parues au cours de ma thèse corroborent cette observation, et permettent aujourd'hui d'affirmer que toutes les quinolinate synthases possèdent un centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité enzymatique et sensible à l'oxygène.

Dans le souci de mieux caractériser le centre métallique de la quinolinate synthase, et plus particulièrement de déterminer si la proposition de Fridovich I. d'une coordination du

Conclusion générale

centre [4Fe-4S] par les cystéines du motif CX₂CX₂C était juste ; nous avons utilisé deux types d'approches, développées dans le Chapitre I :

- Une approche *in vitro* par mutagenèse dirigée, en mutant différents résidus cystéine en alanine de la quinolinate synthase d'*E. coli* (les cystéines du motif CX₂CX₂C (Cys291, Cys294 et Cys297) ainsi que d'autres cystéines conservées (Cys113, Cys119, Cys200)) ;
- Une approche *in vivo* avec une étude de complémentation de la souche d'*E. coli* MG1655Δ*nadA* par différents plasmides contenant le gène de la quinolinate synthase muté au niveau des cystéines citées ci-dessus. Nous avons ainsi pu montrer que les cystéines Cys113, Cys200 et Cys297 sont nécessaires pour la coordination du centre [4Fe-4S] de l'enzyme. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence que deux autres cystéines, les Cys291 et Cys294, sont essentielles pour l'activité de l'enzyme, sous la forme d'un pont disulfure. I. Fridovich avait donc bien relié la sensibilité à l'oxygène dans les extraits bactériens à l'activité quinolinate synthase, et à l'existence d'un centre métallique, cependant sa proposition des cystéines du motif CX₂CX₂C coordonnant le centre [4Fe-4S] s'avère fautive. Ces trois cystéines sont essentielles mais seule la dernière constitue un des ligands du centre [4Fe-4S] de l'enzyme, les deux premières formant un pont disulfure.

La principale interrogation qui a fait l'objet de mon Chapitre III concerne la détermination du rôle du centre [4Fe-4S] de l'enzyme dans l'activité enzymatique. Deux rôles étaient envisagés : le premier correspond à un rôle de catalyseur dans la réaction enzymatique en tant qu'acide de Lewis ; le second correspondant à un rôle dans le maintien de la structure de l'enzyme autrement dit un rôle structural. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'effet de l'ajout des substrats (IA et DHAP) sur le centre [4Fe-4S] de NadA à l'aide de différentes spectroscopies (UV-visible, RPE, Hyscore et Mössbauer). En effet, dans l'hypothèse où le centre [4Fe-4S] joue un rôle dans la catalyse enzymatique, une interaction du centre métallique avec l'un ou l'autre des substrats ou avec un produit de condensation des deux substrats devrait entraîner une modification des paramètres du centre fer-soufre pour chaque spectroscopie utilisée. Nous n'avons obtenu que des résultats négatifs, c'est-à-dire aucune modification spectrale n'a été observée quelles que soient les conditions testées, et ces études ne nous ont donc malheureusement pas permis de démontrer un rôle catalytique pour le centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase. Cependant, les différents éléments suivants :

- le caractère essentiel du centre métallique pour l'activité enzymatique et sa sensibilité à l'oxygène ;
- une coordination du centre par seulement trois cystéines ;

Conclusion générale

- la formation d'un centre $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ lors d'une exposition du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ à l'oxygène ;
- et enfin la réaction de double déshydratation catalysée par l'enzyme (voir mécanisme page x), nous conduisent à croire que la quinolinate synthase possède un centre $[4\text{Fe-4S}]$ de type catalytique avec un rôle d'acide de Lewis et ce au niveau des étapes de déshydratation.

La quinolinate synthase catalyse une réaction complexe de condensation de deux substrats l'iminoaspartate (IA) et la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) conduisant à la formation d'une molécule cyclique, l'acide quinolinique (QA). Deux hypothèses de mécanismes ont été proposées, par Nasu S. et par Begley T.P (Nasu S., 1982a ; Begley T.P., 2001). En nous appuyant sur l'hypothèse de Begley T.P., qui faisait cas d'un passage par une isomérisation du DHAP en Glycéraldéhyde 3-Phosphate (G-3P), nous avons pu mettre en évidence que la quinolinate synthase est capable d'utiliser à la fois le DHAP et le G-3P comme substrat. De plus, nous avons montré que NadA est capable de convertir le G-3P en DHAP, mettant ainsi en évidence une activité triose phosphate isomérase de l'enzyme. Nos résultats nous ont conduits à proposer une hypothèse de mécanisme (exposée dans la Figure 119 du Chapitre III) largement inspirée de celle de Nasu S. incluant tout simplement dans une première étape la conversion du G-3P en DHAP. Dans ce mécanisme, nous proposons que le centre $[4\text{Fe-4S}]$ soit impliqué au niveau des étapes de déshydratations même si, encore une fois nous n'avons à ce jour aucune preuve.

Enfin un des volets les plus novateurs de mon étude (qui est développé dans le Chapitre II) a consisté en la recherche de molécules inhibitrices de l'activité quinolinate synthase. En effet, la quinolinate synthase constitue une nouvelle cible d'agents antibactériens comme je l'ai largement expliqué dans l'introduction. La présence du centre fer-soufre, sensible à l'oxygène constitue malheureusement un frein à une étude automatisée par criblage haut débit qui aurait pu permettre en un minimum de temps de tester un grande quantité de molécules, et ainsi multiplier les chances de mettre en évidence des familles de molécules inhibant la quinolinate synthase. Nous avons donc choisi une approche *in vitro* en testant différentes molécules sélectionnées par rapport à la réaction catalysée. Ces molécules sont des analogues des substrats de l'enzyme (DHAP et iminoaspartate), et des analogues d'intermédiaires réactionnels potentiels. Nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs molécules exerçant une activité inhibitrice plus ou moins importante sur l'enzyme. Ces molécules sont des analogues du DHAP, la molécule inhibant le plus fortement la quinolinate synthase d'*E. coli* mais également notre cible d'intérêt, l'enzyme de *M. tuberculosis* étant

Conclusion générale

l'acide phosphoglycolohydroxamique (PGH), que nous avons montré comme étant un inhibiteur compétitif du DHAP. Le test de cette molécule *in vivo* sur différentes mycobactéries dont *Mycobacterium tuberculosis* n'a malheureusement montré aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

La quinolinate synthase est une enzyme complexe qui est loin d'avoir révélé tous ses secrets ce qui laisse de nombreuses perspectives d'études :

- Le premier des challenges majeurs de l'étude de cette enzyme, reste la détermination du rôle exact du centre [4Fe-4S] dans l'activité. Il est primordial d'établir avec justesse s'il joue un rôle dans la catalyse enzymatique ou s'il n'a qu'un rôle structural. Cette question est cruciale pour ce qui constitue, à mon avis, la seconde des priorités de ce travail : la recherche de nouvelles molécules inhibitrices.

- En effet, la recherche de nouvelles molécules inhibitrices sera orientée en fonction du rôle du centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase : si le centre [4Fe-4S] joue un rôle dans la catalyse enzymatique alors on pourra envisager de synthétiser des molécules possédant des fonctions connues pour chélater les métaux comme par exemple des composés contenant des fonctions thiols (analogues du DHAP ou de l'acide quinolinique). Si par contre le centre [4Fe-4S] ne joue qu'un rôle structural, la conception de molécules analogues d'intermédiaires réactionnels capables de bloquer la réaction enzymatique comme par exemple des haloacétones phosphate ou le fluoroasparate sera plutôt envisagée. Dans l'un ou l'autre des cas, la difficulté majeure à dépasser sera de trouver une molécule inhibant spécifiquement la quinolinate synthase.

- Enfin, l'obtention d'une structure tridimensionnelle aux RX de la protéine avec son centre [4Fe-4S] est en cours et pourrait permettre de répondre à de nombreuses questions. En effet, on peut imaginer que la cristallisation de l'enzyme en présence d'un des substrats (plutôt le DHAP car IA est instable) puisse donner des informations sur sa place au sein du site actif de l'enzyme. Sa proximité ou pas avec le centre métallique pourrait également apporter des éléments de réponse quand au rôle du centre [4Fe-4S] dans la catalyse. Enfin, ces informations sur le placement et l'environnement du DHAP au niveau du site actif de l'enzyme pourraient également aider à orienter la recherche de nouvelles molécules inhibitrices plus spécifiques de la quinolinate synthase. Si l'on parvient à obtenir une structure tridimensionnelle de l'enzyme (avec ou sans le DHAP) on pourrait alors imaginer mettre les cristaux en présence des deux substrats et pourquoi pas espérer piéger des intermédiaires réactionnels.

Conclusion générale

La quinolinate synthase ou NadA*, une enzyme qui porte finalement assez mal son surnom....

(* RIEN, en Espagnol).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Référence Bibliographiques

-A-

Anderson, A. & R. A. Cooper, (1969) Gluconeogenesis in *Escherichia coli* The role of triose phosphate isomerase. *FEBS Lett* **4**: 19-20.

Andreoli, A. J., M. Ikeda, Y. Nishizuka & O. Hayaishi, (1963) Quinolinic acid: a precursor to nicotinamide adenine dinucleotide in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **12**: 92-97.

-B-

Begley, T. P., C. Kinsland, R. A. Mehl, A. Osterman & P. Dorrestein, (2001) The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitam Horm* **61**: 103-119.

Beinert, H., (1983) Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* **131**: 373-378.

Beinert, H., M. C. Kennedy & C. D. Stout, (1996) Aconitase as Ironminus signSulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem Rev* **96**: 2335-2374.

Belenky, P., K. L. Bogan & C. Brenner, (2007) NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* **32**: 12-19.

Bennett, B., M. J. Gruer, J. R. Guest & A. J. Thomson, (1995) Spectroscopic characterisation of an aconitase (AcnA) of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **233**: 317-326.

Berger, F., M. H. Ramirez-Hernandez & M. Ziegler, (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* **29**: 111-118.

Bhatia, R. & K. C. Calvo, (1996) The sequencing expression, purification, and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **325**: 270-278.

Bieganowski, P. & C. Brenner, (2004) Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* **117**: 495-502.

Blinova, K., R. L. Levine, E. S. Boja, G. L. Griffiths, Z. D. Shi, B. Ruddy & R. S. Balaban, (2008) Mitochondrial NADH fluorescence is enhanced by complex I binding. *Biochemistry* **47**: 9636-9645.

Borody, T. J., P. Cole, S. Noonan, A. Morgan, J. Lenne, L. Hyland, S. Brandl, E. G. Borody & L. L. George, (1989) Recurrence of duodenal ulcer and *Campylobacter pylori* infection after eradication. *Med J Aust* **151**: 431-435.

Références bibliographiques

Boshoff, H. I., X. Xu, K. Tahlan, C. S. Dowd, K. Pethe, L. R. Camacho, T. H. Park, C. S. Yun, D. Schnappinger, S. Ehrt, K. J. Williams & C. E. Barry, 3rd, (2008) Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in mycobacterium tuberculosis. An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *J Biol Chem* **283**: 19329-19341.

Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brock, T.D. (1988) The bacterial nucleus: a history. *Microbiol. Rev.* 52(4): 397-411.

Bruschi, M. & F. Guerlesquin, (1988) Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol Rev* **4**: 155-175.

Burkle, A., (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J* **272**: 4576-4589.

-C-

Calzolari, L., C. M. Gorst, Z. H. Zhao, Q. Teng, M. W. Adams & G. N. La Mar, (1995) ¹H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* **34**: 11373-11384.

Ceciliani, F., T. Caramori, S. Ronchi, G. Tedeschi, M. Mortarino & A. Galizzi, (2000) Cloning, overexpression, and purification of *Escherichia coli* quinolinate synthetase. *Protein Expr Purif* **18**: 64-70.

Chandler, J. L., R. K. Gholson & T. A. Scott, (1970) Studies on the de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. I. Labelling patterns from precursors. *Biochim Biophys Acta* **222**: 523-526.

Chatterjee, A., Y. Li, Y. Zhang, T. L. Grove, M. Lee, C. Krebs, S. J. Booker, T. P. Begley & S. E. Ealick, (2008) Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily. *Nat Chem Biol* **4**: 758-765.

Cheng, W. & J. R. Roth, (1994) Evidence for two NAD kinases in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 4260-4268.

Cicchillo, R. M., L. Tu, J. A. Stromberg, L. M. Hoffart, C. Krebs & S. J. Booker, (2005) *Escherichia coli* quinolinate synthetase does indeed harbor a [4Fe-4S] cluster. *J Am Chem Soc* **127**: 7310-7311.

Colabroy, K. L. & T. P. Begley, (2005) The pyridine ring of NAD is formed by a nonenzymatic pericyclic reaction. *J Am Chem Soc* **127**: 840-841.

Collins, K. D., (1974) An activated intermediate analogue. The use of phosphoglycolhydroxamate as a stable analogue of a transiently occurring dihydroxyacetone phosphate-derived enolate in enzymatic catalysis. *J Biol Chem* **249**: 136-142.

Références bibliographiques

Coves, J., C. Lebrun, G. Gervasi, P. Dalbon & M. Fontecave, (1999) Overexpression of the FAD-binding domain of the sulphite reductase flavoprotein component from *Escherichia coli* and its inhibition by iodonium diphenyl chloride. *Biochem J* **342** (Pt 2): 465-472.

Crawford, J. M. & J. J. Blum, (1983) Quantitative analysis of flux along the gluconeogenic, glycolytic and pentose phosphate pathways under reducing conditions in hepatocytes isolated from fed rats. *Biochem J* **212**: 585-598.

-D-

Diefenbach, J. & A. Burkle, (2005) Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 721-730.

Dobritzsch, D., G. Schneider, K. D. Schnackerz & Y. Lindqvist, (2001) Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO J* **20**: 650-660.

Dobrzanska, M., B. Szurmak, A. Wyslouch-Cieszynska & E. Kraszewska, (2002) Cloning and characterization of the first member of the Nudix family from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **277**: 50482-50486.

Du, X., W. Wang, R. Kim, H. Yakota, H. Nguyen & S. H. Kim, (2001) Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* **40**: 14166-14172.

-E-

Elvehjem, C. A., R. J. Madden, F. M. Strong & D. W. Woolley, (1974) The isolation and identification of the anti-black tongue factor. *Nutr Rev* **32**: 48-50.

-F-

Fish, W. W., (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**: 357-364.

Flachmann, R., N. Kunz, J. Seifert, M. Gutlich, F. J. Wientjes, A. Laufer & H. G. Gassen, (1988) Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. Cloning and characterization of quinolate synthesis genes *nadA* and *nadB*. *Eur J Biochem* **175**: 221-228.

Fleming, A. (1945) Penicilin. *Nobel lecture physiology or medicine, Elsevier Publishing Company* : 83-93.

Flint, D. H. & R. M. Allen, (1996) Ironminus signSulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**: 2315-2334.

Fonvielle, M., H. Therisod, M. Hemery & M. Therisod, (2007) New competitive inhibitors of cytosolic (NADH-dependent) rabbit muscle glycerophosphate dehydrogenase. *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 410-413.

Références bibliographiques

Fonvielle, M., P. Weber, K. Dabkowska & M. Therisod, (2004) New highly selective inhibitors of class II fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 2923-2926.

Forouhar, F., J. L. Anderson, C. G. Mowat, S. M. Vorobiev, A. Hussain, M. Abashidze, C. Bruckmann, S. J. Thackray, J. Seetharaman, T. Tucker, R. Xiao, L. C. Ma, L. Zhao, T. B. Acton, G. T. Montelione, S. K. Chapman & L. Tong, (2007) Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 473-478.

Foster, A. C., W. C. Zinkand & R. Schwarcz, (1985) Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in rat brain. *J Neurochem* **44**: 446-454.

Foster, J. W. & A. G. Moat, (1980) Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev* **44**: 83-105.

Foster, J. W., Y. K. Park, T. Penfound, T. Fenger & M. P. Spector, (1990) Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon. *J Bacteriol* **172**: 4187-4196.

Foster, J. W. & T. Penfound, (1993) The bifunctional *NadR* regulator of *Salmonella typhimurium*: location of regions involved with DNA binding, nucleotide transport and intramolecular communication. *FEMS Microbiol Lett* **112**: 179-183.

-G-

^aGardner, P. R. & I. Fridovich, (1991) Quinolinate synthetase: the oxygen-sensitive site of de novo NAD(P)⁺ biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **284**: 106-111.

^bGardner, P. R. & I. Fridovich, (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* **266**: 19328-19333.

Gardner, P. R. & I. Fridovich, (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem* **266**: 1478-1483.

Gerdes, S. Y., O. V. Kurnasov, K. Shatalin, B. Polanuyer, R. Sloutsky, V. Vonstein, R. Overbeek & A. L. Osterman, (2006) Comparative genomics of NAD biosynthesis in cyanobacteria. *J Bacteriol* **188**: 3012-3023.

Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, M. D'Souza, A. Bernal, M. V. Baev, M. Farrell, O. V. Kurnasov, M. D. Daugherty, F. Mseeh, B. M. Polanuyer, J. W. Campbell, S. Anantha, K. Y. Shatalin, S. A. Chowdhury, M. Y. Fonstein & A. L. Osterman, (2002) From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *J Bacteriol* **184**: 4555-4572.

Griffith, G. R., J. L. Chandler & R. K. Gholson, (1975) Studies on the de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. The separation of the *nadB* gene product from the *nadA* gene product and its purification. *Eur J Biochem* **54**: 239-245.

Références bibliographiques

Grose, J. H., U. Bergthorsson & J. R. Roth, (2005) Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **187**: 2774-2782.

Gross, J., M. Rajavel, E. Segura & C. Grubmeyer, (1996) Energy coupling in *Salmonella typhimurium* nicotinic acid phosphoribosyltransferase: identification of His-219 as site of phosphorylation. *Biochemistry* **35**: 3917-3924.

Guarente, L., (2006) Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* **444**: 868-874.

Guse, A. H., (2004) Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Mol Med* **4**: 239-248.

Guse, A. H., (2004) Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Med Chem* **11**: 847-855.

-H-

Hall, A. & J.R. Knowles, (1975) The uncatalyzed rates of enolization of dihydroxyacetone phosphate and of glyceraldehyde 3-phosphate in neutral aqueous solution. The quantitative assessment of the effectiveness of an enzyme catalyst. *Biochemistry* **14**: 4348-4352.

Hall, D. R., G. A. Leonard, C. D. Reed, C. I. Watt, A. Berry & W. N. Hunter, (1999) The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J Mol Biol* **287**: 383-394.

Han, Q., B. T. Beerntsen & J. Li, (2007) The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J Insect Physiol* **53**: 254-263.

Hartman, F. C., (1971) Haloacetyl phosphates. Characterization of the active site of rabbit muscle triose phosphate isomerase. *Biochemistry* **10**: 146-154.

Higuchi, K. & O. Hayaishi, (1967) Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. *Arch Biochem Biophys* **120**: 397-403.

Howitz, K. T., K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L. L. Zhang, B. Scherer & D. A. Sinclair, (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**: 191-196.

-J-

Janin, Y. L., (2007) Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg Med Chem* **15**: 2479-2513.

Johansson, T., C. Oswald, A. Pedersen, S. Tornroth, M. Okvist, B. G. Karlsson, J. Rydstrom & U. Krengel, (2005) X-ray structure of domain I of the proton-pumping membrane protein transhydrogenase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **352**: 299-312.

-K-

Kadokura, H., F. Katzen & J. Beckwith, (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **72**: 111-135.

Harden, A; Young, WJ (1906). "The Alcoholic Ferment of Yeast-Juice". *Proceedings of the Royal Society of London* **78** (526): pp. 369–375.

Kasarov, L. B. & A. G. Moat, (1972) Metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide in human and bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **110**: 600-603.

Kornberg, A., (1948) The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **176**: 1475.

Kotake, Y. & I. Masayama, (1936) The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan. *Z. Physiol. Chem.* **243**: 237-244.

Koushik, S. V., J. A. Moore, 3rd, B. Sundararaju & R. S. Phillips, (1998) The catalytic mechanism of kynureninase from *Pseudomonas fluorescens*: insights from the effects of pH and isotopic substitution on steady-state and pre-steady-state kinetics. *Biochemistry* **37**: 1376-1382.

^aKurnasov, O., V. Goral, K. Colabroy, S. Gerdes, S. Anantha, A. Osterman & T. P. Begley, (2003) NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* **10**: 1195-1204.

^bKurnasov, O., L. Jablonski, B. Polanuyer, P. Dorrestein, T. Begley & A. Osterman, (2003) Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett* **227**: 219-227.

Kurnasov, O. V., B. M. Polanuyer, S. Ananta, R. Sloutsky, A. Tam, S. Y. Gerdes & A. L. Osterman, (2002) Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis. *J Bacteriol* **184**: 6906-6917.

-L-

Lesk, A. M., (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 775-783.

Liu, H., K. Woznica, G. Catton, A. Crawford, N. Botting & J. H. Naismith, (2007) Structural and kinetic characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (hQPRTase) from homo sapiens. *J Mol Biol* **373**: 755-763.

-M-

M, N. M., S. Ollagnier-de-Choudens, Y. Sanakis, S. E. Abdel-Ghany, C. Rousset, H. Ye, M. Fontecave, E. A. Pilon-Smits & M. Pilon, (2007) Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis. *J Biol Chem* **282**: 18254-18264.

Références bibliographiques

Magni, G., A. Amici, M. Emanuelli, G. Orsomando, N. Raffaelli & S. Ruggieri, (2004) Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr Med Chem* **11**: 873-885.

Magni, G., A. Amici, M. Emanuelli, N. Raffaelli & S. Ruggieri, (1999) Enzymology of NAD⁺ synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **73**: 135-182, xi.

Marinoni, I., S. Nonnis, C. Monteferrante, P. Heathcote, E. Hartig, L. H. Bottger, A. X. Trautwein, A. Negri, A. M. Albertini & G. Tedeschi, (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS J* **275**: 5090-5107.

Martins, B. M., H. Dobbek, I. Cinkaya, W. Buckel & A. Messerschmidt, (2004) Crystal structure of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase: radical catalysis involving a [4Fe-4S] cluster and flavin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15645-15649.

Mattevi, A., (2006) A close look at NAD biosynthesis. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 563-564.

Matthijs, S., C. Baysse, N. Koedam, K. A. Tehrani, L. Verheyden, H. Budzikiewicz, M. Schafer, B. Hoorelbeke, J. M. Meyer, H. De Greve & P. Cornelis, (2004) The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. *Mol Microbiol* **52**: 371-384.

Merdanovic, M., E. Sauer & J. Reidl, (2005) Coupling of NAD⁺ biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **187**: 4410-4420.

Miller, E. S., J. F. Heidelberg, J. A. Eisen, W. C. Nelson, A. S. Durkin, A. Ciecko, T. V. Feldblyum, O. White, I. T. Paulsen, W. C. Nierman, J. Lee, B. Szczypinski & C. M. Fraser, (2003) Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *J Bacteriol* **185**: 5220-5233.

Moore, S., D. H. Spackman & W. H. Stein, (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc* **17**: 1107-1115.

Mortarino, M., A. Negri, G. Tedeschi, T. Simoncic, S. Duga, H. G. Gassen & S. Ronchi, (1996) L-aspartate oxidase from *Escherichia coli*. I. Characterization of coenzyme binding and product inhibition. *Eur J Biochem* **239**: 418-426.

Mulliez, E., S. Ollagnier-de Choudens, C. Meier, M. Cremonini, C. Luchinat, A. X. Trautwein & M. Fontecave, (1999) Iron-sulfur interconversions in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* **4**: 614-620.

Mustacich, D. & G. Powis, (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346 Pt 1**: 1-8.

-N-

Nasu, S. & R. K. Gholson, (1981) Replacement of the B protein requirement of the *E. coli* quinolinate synthetase system by chemically-generated iminoaspartate. *Biochem Biophys Res Commun* **101**: 533-539.

^aNasu, S., F. D. Wicks & R. K. Gholson, (1982) L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme of *Escherichia coli*, is the B protein of quinolinate synthetase. *J Biol Chem* **257**: 626-632.

^bNasu, S., F. D. Wicks & R. K. Gholson, (1982) The mammalian enzyme which replaces B protein of *E. coli* quinolinate synthetase is D-aspartate oxidase. *Biochim Biophys Acta* **704**: 240-252.

Nicolet, Y. & C. L. Drennan, (2004) AdoMet radical proteins--from structure to evolution--alignment of divergent protein sequences reveals strong secondary structure element conservation. *Nucleic Acids Res* **32**: 4015-4025.

North, B. J. & E. Verdin, (2004) Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* **5**: 224.

Norton, I. L. & F. C. Hartman, (1972) Haloacetol phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triose phosphate isomerase. *Biochemistry* **11**: 4435-4441.

-O-

Ogasawara, N., J. L. Chandler, R. K. Gholson, R. J. Rosser & A. J. Andreoli, (1967) Biosynthesis of quinolinic acid in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta* **141**: 199-201.

Ollagnier-de Choudens, S., L. Loiseau, Y. Sanakis, F. Barras & M. Fontecave, (2005) Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 3737-3743.

Ollagnier-De Choudens, S., Y. Sanakis, K. S. Hewitson, P. Roach, J. E. Baldwin, E. Munck & M. Fontecave, (2000) Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase. *Biochemistry* **39**: 4165-4173.

Osterman, A. L. & T. P. Begley, (2007) A subsystems-based approach to the identification of drug targets in bacterial pathogens. *Prog Drug Res* **64**: 131, 133-170.

Ozment, C., J. Barchue, L. J. DeLucas & D. Chattopadhyay, (1999) Structural study of *Escherichia coli* NAD synthetase: overexpression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis. *J Struct Biol* **127**: 279-282.

-P-

Palomino, J. C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings & F. Portaels, (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2720-2722.

Penfound, T. & J. W. Foster, (1999) NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 648-655.

Pollak, N., C. Dolle & M. Ziegler, (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem J* **402**: 205-218.

^aPreiss, J. & P. Handler, (1958) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem* **233**: 493-500.

^bPreiss, J. & P. Handler, (1958) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J Biol Chem* **233**: 488-492.

Putman, S. J., A. F. Coulson, I. R. Farley, B. Riddleston & J. R. Knowles, (1972) Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem J* **129**: 301-310.

-R-

Raffaelli, N., T. Lorenzi, P. L. Mariani, M. Emanuelli, A. Amici, S. Ruggieri & G. Magni, (1999) The Escherichia coli NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *J Bacteriol* **181**: 5509-5511.

Raffaelli, N., L. Sorci, A. Amici, M. Emanuelli, F. Mazzola & G. Magni, (2002) Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 835-840.

Rich, P. R., (2003) The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* **31**: 1095-1105.

Rieder, S. V. & J. M. Buchanan, (1958) Studies on the biological formation of glucosamine in vivo. I. Origin of the carbon chain. *J Biol Chem* **232**: 951-957.

Rizzi, M. & H. Schindelin, (2002) Structural biology of enzymes involved in NAD and molybdenum cofactor biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 709-720.

^aRodionov, D. A., J. De Ingeniis, C. Mancini, F. Cimadamore, H. Zhang, A. L. Osterman & N. Raffaelli, (2008) Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria: NrtR family of Nudix-related regulators. *Nucleic Acids Res* **36**: 2047-2059.

^bRodionov, D. A., X. Li, I. A. Rodionova, C. Yang, L. Sorci, E. Dervyn, D. Martynowski, H. Zhang, M. S. Gelfand & A. L. Osterman, (2008) Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria: genomic reconstruction of NiaR (YrxA) regulon. *Nucleic Acids Res* **36**: 2032-2046.

Rossolillo, P., I. Marinoni, E. Galli, A. Colosimo & A. M. Albertini, (2005) YrxA is the transcriptional regulator that represses de novo NAD biosynthesis in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **187**: 7155-7160.

Rousset, C., M. Fontecave & S. Ollagnier de Choudens, (2008) The [4Fe-4S] cluster of quinolinate synthase from Escherichia coli: investigation of cluster ligands. *FEBS Lett* **582**: 2937-2944.

Rowe, J. J., R. D. Lemmon & G. J. Tritz, (1985) Nicotinic acid transport in Escherichia coli. *Microbios* **44**: 169-184.

Références bibliographiques

Rozwarski, D. A., G. A. Grant, D. H. Barton, W. R. Jacobs, Jr. & J. C. Sacchettini, (1998) Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**: 98-102.

-S-

Sakuraba, H., H. Tsuge, K. Yoneda, N. Katunuma & T. Ohshima, (2005) Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *J Biol Chem* **280**: 26645-26648.

Sakuraba, H., K. Yoneda, I. Asai, H. Tsuge, N. Katunuma & T. Ohshima, (2008) Structure of l-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 563-571.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sasseti, C. M., D. H. Boyd & E. J. Rubin, (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**: 77-84.

^aSaunders, A. H. & S. J. Booker, (2008) Regulation of the activity of *Escherichia coli* quinolinate synthase by reversible disulfide-bond formation. *Biochemistry* **47**: 8467-8469.

^bSaunders, A. H., A. E. Griffiths, K. H. Lee, R. M. Cicchillo, L. Tu, J. A. Stromberg, C. Krebs & S. J. Booker, (2008) 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* **47**: 10999-11012.

Sauve, A. A., (2008) NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 883-893.

Scarpellini, M., A. Neves, R. Horner, A. J. Bortoluzzi, B. Szpoganics, C. Zucco, R. A. Nome Silva, V. Drago, A. S. Mangrich, W. A. Ortiz, W. A. Passos, M. C. de Oliveira & H. Terenzi, (2003) Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxy copper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. *Inorg Chem* **42**: 8353-8365.

Schafer, F. Q. & G. R. Buettner, (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**: 1191-1212.

Schar, P., G. Herrmann, G. Daly & T. Lindahl, (1997) A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* **11**: 1912-1924.

Schray, K. J., E. L. O'Connell & I. A. Rose, (1973) Inactivation of muscle triose phosphate isomerase by D- and L-glycidol phosphate. *J Biol Chem* **248**: 2214-2218.

Sharma, V., C. Grubmeyer & J. C. Sacchettini, (1998) Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure* **6**: 1587-1599.

Références bibliographiques

Solomon, E. I., T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang & J. Zhou, (2000) Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem Rev* **100**: 235-350.

Straus, D., R. Raines, E. Kawashima, J. R. Knowles & W. Gilbert, (1985) Active site of triosephosphate isomerase: in vitro mutagenesis and characterization of an altered enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2272-2276.

Suzuki, N., J. Carlson, G. Griffith & R. K. Gholson, (1973) Studies on the de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. V. Properties of the quinolinic acid synthetase system. *Biochim Biophys Acta* **304**: 309-315.

-T-

Tabor, S. & C. C. Richardson, (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1074-1078.

Tempel, W., W. M. Rabeh, K. L. Bogan, P. Belenky, M. Wojcik, H. F. Seidle, L. Nedyalkova, T. Yang, A. A. Sauve, H. W. Park & C. Brenner, (2007) Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD⁺. *PLoS Biol* **5**: e263.

Timmins, G. S. & V. Deretic, (2006) Mechanisms of action of isoniazid. *Mol Microbiol* **62**: 1220-1227.

Trapp, J. & M. Jung, (2006) The role of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Curr Drug Targets* **7**: 1553-1560.

Tritz, G. J. & J. L. Chandler, (1973) Recognition of a gene involved in the regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis. *J Bacteriol* **114**: 128-136.

^aTritz, G. J., T. S. Matney, J. L. Chandler & R. K. Gholson, (1970) Chromosomal location of the C gene involved in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **104**: 45-49.

^bTritz, G. J., T. S. Matney & R. K. Gholson, (1970) Mapping of the nadB locus adjacent to a previously undescribed purine locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **102**: 377-381.

-V-

Vinet, B. & P. Morissette, (2001) L'acide mycophénolique en transplantation : mécanisme d'action, métabolisme et « monitoring » sérique. *Ann. Biol. Chim. Qué.* **39** (1): 11-14.

Volbeda, A. Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC., (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**: 580-7.

Vollmer, S. J., R. L. Switzer & P. G. Debrunner, (1983) Oxidation-reduction properties of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem* **258**: 14284-14293.

-W-

Warburg O, Christian W. (1936). "Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide)". *Biochemische Zeitschrift* **287**: 291.

Warren JR, Marshall B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **321**: 1273-1275.

Wicks, F. D., S. Sakakibara & R. K. Gholson, (1978) Evidence for an intermediate in quinolinate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **136**: 136-141.

Wicks, F. D., S. Sakakibara, R. K. Gholson & T. A. Scott, (1977) The mode of condensation of aspartic acid and dihydroxyacetone phosphate in quinolinate synthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **500**: 213-216.

Wilkinson, A., J. Day & R. Bowater, (2001) Bacterial DNA ligases. *Mol Microbiol* **40**: 1241-1248.

Wimpenny, J. W. & A. Firth, (1972) Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J Bacteriol* **111**: 24-32.

Wogulis, M., E. R. Chew, P. D. Donohue & D. K. Wilson, (2008) Identification of formyl kynurenine formamidase and kynurenine aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae* using crystallographic, bioinformatic and biochemical evidence. *Biochemistry* **47**: 1608-1621.

Wolfenden, R., (1969) Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature* **223**: 704-705.

-Y-

Yamada, K., N. Hara, T. Shibata, H. Osago & M. Tsuchiya, (2006) The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **352**: 282-285.

Yang, H., T. Yang, J. A. Baur, E. Perez, T. Matsui, J. J. Carmona, D. W. Lamming, N. C. Souza-Pinto, V. A. Bohr, A. Rosenzweig, R. de Cabo, A. A. Sauve & D. A. Sinclair, (2007) Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* **130**: 1095-1107.

Yanofsky, C., (1954) The absence of a tryptophan-niacin relationship in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **68**: 577-584.

-Z-

Zerez, C. R., D. E. Moul, E. G. Gomez, V. M. Lopez & A. J. Andreoli, (1987) Negative modulation of *Escherichia coli* NAD kinase by NADPH and NADH. *J Bacteriol* **169**: 184-188.

Ziegler, M., (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* **267**: 1550-1564.

Livres

Dawson MC (ed) *Data for biochemical research* third edition, (Oxford scientific publications, 1987) ISBN 0-19-855358-7 p 122.

Metzler D.E., *Biochemistry the chemical reactions of living cells*, (Volume 1, copyright c2001, 1977 by HARCOURT/ ACADEMIC PRESS.

Publications