AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Université Henri Poincaré
Faculté des Sciences
U.F.R Sciences et Techniques biologiques
Ecole doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Enzymologie Moléculaire

par **Claire Stines-Chaumeil**

Caractérisation enzymatique de la Méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de *Bacillus subtilis*

Soutenance publique prévue le 10 Novembre 2005 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :	M Jean-Marie Frère	Professeur, Université de Liège
	M Michel Desmadril	Directeur de recherches CNRS, Université de Paris-Sud
Examinateurs :	M Jacques Magdalou	Directeur de recherches CNRS, Université Henri Poincaré Nancy-I
	M François Talfournier	Maître de Conférences, Université Henri Poincaré, Nancy-I (Codirecteur de thèse)
	M Guy Branlant	Professeur, Université Henri Poincaré Nancy-I (Directeur de thèse)

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire
UMR CNRS-UHP 7567 – Faculté des Sciences - BP239 - 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

REMERCIEMENTS

Cette thèse est la concrétisation d'un travail de recherche passionnant, enrichissant et motivant. Plusieurs personnes ont joué un rôle essentiel dans son aboutissement.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Madame Christiane BRANLANT**, directeur de recherches CNRS, directeur de l'UMR CNRS-UHP 7567, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'exprime ma profonde gratitude à **Monsieur le Professeur Guy BRANLANT**, mon directeur de thèse, responsable de l'équipe Enzymologie Moléculaire qui, en m'ayant proposé ce travail de recherche et la préparation à ce diplôme a mis à ma disposition, une part de son temps personnel, le matériel nécessaire au développement de ce projet et le personnel qualifié pour réaliser cette étude. Je le remercie particulièrement pour ses remarques, sa constante motivation et la confiance qu'il a su me témoigner.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à **Monsieur Michel DESMADRIL**, directeur de recherches CNRS, et à **Monsieur le Professeur Jean-Marie FRERE**, qui m'ont fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Monsieur Jacques MAGDALOU**, directeur de recherches CNRS, qui m'a fait l'honneur de faire partie de ce jury.

J'exprime ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à **Monsieur François TALFOURNIER**, Maître de conférences, qui a guidé mes recherches. Je le remercie pour sa disponibilité, sa rigueur et ses conseils, les nombreuses et riches discussions que nous avons eues ainsi que l'enthousiasme scientifique qu'il m'a transmis. Son aide scientifique précieuse m'a permis de mener à bien ce travail et je lui exprime toute ma gratitude et ma très amicale sympathie.

J'adresse un remerciement particulier aux chimistes **Monsieur Nicolas BROSSE** et **Monsieur Jacques BODIGUEL,** qui m'ont permis de réaliser les synthèses chimiques essentielles à ce travail de recherche. Je leur exprime ma gratitude pour leur dynamisme, leurs conseils et leurs soutiens.

Mes remerciements s'adressent également à **Madame Hélène DUBOURG** du groupe de biocristallographie du LCM3B ESA 7036 UHP-Nancy-I, pour le travail de collaboration que nous avons débuté.

Je souhaite remercier chaleureusement, **Madame Séverine BOUTSERIN** pour son aide technique, sa sympathie et sa bonne humeur.

Merci à **Madame Jacqueline UGOLINI** pour sa gentillesse, sa disponibilité et les bons moments passés au laboratoire.

Merci à tous les membres de l'équipe biologie moléculaire pour leur sympathie.

Merci enfin à tous les membres de l'équipe enzymologie du laboratoire MAEM pour leur entrain, leur gaieté et leur sympathie : Monsieur Christophe GAUTHIER, Monsieur Alexandre KRISNIK, Madame Sophie RAHUEL-CLERMONT, Madame Sandrine BOSCHI-MULLER, Monsieur François SCHNEIDER, Monsieur Christophe JACOB, Monsieur Lionel HUMBERT, ainsi que tous les thésards ou anciens thésards présents dans le groupe : Alexandre, Arnaud, Adeline, Mathias, Fabrice et Xavier.

A tous mes amis,

A ma sœur Sophie, Olivier et Sacha,
Avec toute mon affection.

A mes parents, Danielle et Gérard,
Avec toute ma tendresse.

A mon mari Jean-René,
En témoignage de tout mon amour.

A mon fils Jean-Philippe, né le 28 juillet 2005.

NANCY 1
SCIENCES
Rue du Jardin botanique

Table des matières

INTRODUCTION

1. Les aldéhydes : des composés aux effets biologiques antagonistes 1

1.1. Importance des aldéhydes *in vivo* 1

1.1.1. Rôle central du rétinaldéhyde dans le mécanisme de la vision, dans les phénomènes d'embryogenèse et de différenciation cellulaire 1

1.1.2. Le succinate semialdéhyde : un intermédiaire clé dans le métabolisme de l'acide γ-aminobutyrique et du neurotransmetteur dopamine 4

1.1.3. La bétaïne aldéhyde : un intermédiaire dans la biosynthèse de la glycine bétaïne 5

1.2. Effets toxiques 7

1.2.1. Aldéhydes provenant de la biotransformation de substances endogènes ou exogènes 7

1.2.2. Aldéhydes générés par la peroxydation des lipides 9

1.2.3. Aldéhydes impliqués dans les mécanismes de glycation 11

1.2.4. Aldéhyde généré par le métabolisme de l'éthanol : lien entre l'alcoolisme et toxicité cellulaire 13

1.3. Enzymes impliquées dans le métabolisme des aldéhydes 14

1.3.1. Les aldéhydes oxydases 14

1.3.2. Les aldo-cétoreductases 16

1.3.3. Les alcool déshydrogénases 17

1.3.4. Les aldéhyde déshydrogénases 18

2. Les aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes à cofacteur $NAD(P)^+$ 19

2.1. Rôles *in vivo* 19

2.1.1. Implication dans les processus de détoxication 19

2.1.2. Implication dans le développement embryonnaire et la vision 20

2.1.3. Implication dans le métabolisme cellulaire 20

2.1.4. Implication dans la production d'équivalents réducteurs NADPH nécessaires aux réactions biosynthétiques 21

2.1.5. Implication en tant que protéines de structures 22

2.2. Structure des aldéhyde déshydrogénases à cofacteur NAD(P) non phosphorylantes 23

2.2.1. Structure globale 23

...NCY 1
...SCIENCES
...botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

2.2.2. Structure du monomère 24
2.2.2.1. Domaine du cofacteur 24
2.2.2.2. Domaine catalytique 24
2.2.2.3. Domaine d'oligomérisation 25
2.2.3. Organisation quaternaire 26
2.3. Mécanisme enzymatique des ALDH non phosphorylantes 27
2.3.1. Mécanisme catalytique détaillé : cas de la GAPN de *S. mutans* 28
2.3.2. Spécificité de substrat, reconnaissance du phosphate du glycéraldéhyde 3-phosphate 30
2.4. Propriétés cinétiques particulières de certaines ALDH 30
2.4.1. Réactivité de demi-site 30
2.4.1.1. Effet de l'ajout de cations divalents 30
2.4.1.2. Bases moléculaires et structurales 31
2.4.2. Phénomènes d'activation par préincubation avec le cofacteur et / ou l'ajout de cations 32
2.4.2.1. Influence sur le phénomène de latence 32
2.4.2.2. Influence sur l'activité estérasique 33
3. La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase 33
3.1. Métabolisme des acides aminés branchés 35
3.2. Rôle de la MSDH 36
3.2.1. Chez les bactéries et les archae 37
3.2.2. Chez les mammifères 38
3.3. Maladies associées au métabolisme des acides aminés branchés chez l'homme 40
3.4. Le coenzyme A 40
3.4.1. Structure du Coenzyme A 40
3.4.2. Différents modes de fixation du Coenzyme A dans les enzymes 41
Objectifs de travail 44

RESULTATS

PARTIE I : Caractérisation du mécanisme enzymatique de la MSDH de *B. subtilis*

1. Clonage de l'ORF du gène codant la MSDH de *B. subtilis* 45

1.1. Stratégie de clonage 45

1.2. Construction du vecteur d'expression pSKmsdbsub contenant l'ORF du gène codant la MSDH de *B. subtilis* 45

2. Production, purification et caractérisation de la MSDH de *B. subtilis* 47

2.1. Production et purification 47

2.2. Détermination de l'état oligomérique de la MSDH de *B. subtilis* 49

2.3. Cristallogenèse et résultats préliminaires obtenus par radiocristallographie 49

Article 1 50

3. Mécanisme catalytique de la MSDH de *B. subtilis*. 55

Article 2 58

4. Questions qui restent posées suite à ce travail 69

PARTIE II : Etude des sites de spécificité structurale

1. Spécificité de substrat 71

1.1. Stratégie 71

1.2. Etude des propriétés enzymatiques des mutants R124L, R301L et R124L/R301L 71

1.3. Etude de l'étape d'acylation pour les mutants R124L, R301L et R124L/R301L 72

1.4. Détermination d'une constante de vitesse apparente de relargage du NADH à partir du complexe thioacylenzyme-NADH 75

1.5. Identification des produits de la réaction en présence de CoA 76

1.6. Etudes cinétiques du type sauvage et des mutants avec le propionaldéhyde comme substrat 76

1.6.1. Stratégie 76

1.6.2. Les constantes cinétiques à l'état stationnaire 77

1.6.3. Etude de l'étape d'acylation 78

2. Evolution de site actif de la MSDH : introduction d'une activité hydrolytique 80

2.1. Stratégie 80

2.2. Résultats préliminaires 82

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 85

MATERIELS ET METHODES 95

1. Matériel biologique 95

1.1. Plasmide et phage 95

1.2. Souche bactérienne 95

1.3. Milieux de culture 95

2. Techniques de génie génétique 96

2.1. Transformation des bactéries supercompétentes 96

2.2. Préparation de l'ADN 96

2.3. Analyse de l'ADN 97

2.3.1. Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne 97

2.3.2. Digestion par les enzymes de restriction 97

2.3.3. Séquençage de l'ADN double brin 98

2.4. Mutagenèse dirigée selon la réaction de PCR 99

2.4.1. Principe de la méthode 99

2.4.2. Mutagenèse 100

2.5. Techniques de clonage 100

3. Production, purification et caractérisation de l'enzyme MSDH 102

3.1. Production des enzymes MSDH de type sauvage et mutés 102

3.2. Purification 102

3.2.1. Eclatement des cellules et précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium 102

3.2.2. Filtration sur gel 103

3.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions 103

3.2.4. Caractérisation des enzymes MSDH de type sauvage et mutées 103

3.2.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant 103

3.2.4.2. Détermination de la masse moléculaire 104

3.2.4.3. Détermination de l'état oligomérique : filtration sur gel Superose 12 couplée au système FPLC 104

3.2.4.4. Mesure de la concentration 104

3.2.4.5. Synthèse chimique du méthylmalonate semialdéhyde et du malonate semialdéhyde 105

3.2.4.5.1. Synthèse (Kupiecki et Coon, 1960) 105

3.2.4.5.2. Dosage 105

3.2.4.6. Dosage de la concentration en NAD^+ contenu dans l'enzyme en sortie de purification par fluorimétrie 106
3.2.4.7. Suivi de l'extinction de fluorescence des tryptophanes 106
3.2.4.8. Test enzymatique 106
3.2.4.9. Identification des produits de la réaction 106
3.2.4.9.1. En conditions d'hydrolyse 106
3.2.4.9.2. En présence de CoA 107

4. Techniques d'étude des propriétés enzymatiques des enzymes MSDH de type sauvage et mutées 107
4.1. Détermination des constantes cinétiques (k_{cat}) et de Michaelis (K_M) à l'état stationnaire 107
4.2. Etudes de l'étape d'acylation 107
4.2.1. Titration de site 107
4.2.2. Etude de l'étape d'acylation en cinétique rapide 108
4.3. Détermination de la constante de vitesse apparente de relargage (k_{off}) du NADH 108
4.4. Détermination de la constante de vitesse de l'étape de β-décarboxylation 108

5. Techniques d'étude de la réactivité de la C302 dans les enzymes sauvages et mutées 108
5.1. Utilisation de la sonde 2,2'-dipyridyl disulfide (2PDS) 108
5.2. Utilisation de la sonde iodoacétamide (IAM) 109
5.2.1. Principe 109
5.2.2. Protocole 110

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 111

Abréviations

ACA34	acrylamide 3 %, agarose 4 %
ADH	alcool déshydrogénase
AKRs	aldo-céto réductases
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
Amp	ampicilline
AOX	aldéhyde oxydase
AR	aldose réductase
ARE	«antioxidant response element»
BALDH	bétaïne aldéhyde déshydrogénase
BHMT	bétaïne homocystéine méthyltransferase
CMO	choline monooxygénase
CoA	coenzyme A
CRALBP	«cellular retinaldehyde binding protein»
CY	cyclophosphamide
DMSO	diméthylsulfoxide
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
GABA	acide γ-aminobutyrique
GAPN	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante
G3P	glycéraldéhyde 3-phosphate
HIBDH	hydroxybutyrate déshydrogénase
IAM	iodoacétamide
K_{av}	coefficient de partition
k_{cat}	constante catalytique
K_D	constante de dissociation
K_M	constante de Michaelis
k_{obs}	constante de vitesse observée
k_{off}	constante de relargage
LB	Luria Bertani
LDH	lactate déshydrogénase
MDH	malate déshydrogénase
MMSA	méthylmalonate semialdéhyde
MSA	malonate semialdéhyde
MSDH	méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase
nd	non déterminé
2PDS	2-2', dipyridyl disulfide
PEP	phosphoénolpyruvate
PEPC	phosphoénolpyruvate carboxylase
1,3-PGA	1,3-diphosphoglycérate
3-PGA	3-phosphoglycérate
PPA	propionaldéhyde
PPCoA	propionyl-CoA
qsp	quantité suffisante pour
RA	acide rétinoïque
SDS	dodécylsulfate de sodium
SID	succinate imidazole diéthanolamine

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

AVANT-PROPOS

Les ALDH non-phosphorylantes à cofacteur NAD(P), coenzyme A (CoA) ou non dépendantes, appartiennent à la même famille structurale. Elles interviennent à divers niveaux du métabolisme et dans des processus de détoxication. Elles reconnaissent des substrats aldéhydiques de nature variée. Ces enzymes présentent un mécanisme de catalyse à deux étapes, une étape d'oxydoréduction conduisant à la formation d'un intermédiaire thioacylenzyme et de NAD(P)H suivie d'une étape de désacylation par une molécule d'eau ou de transthioestérification par le CoA. La bonne efficacité enzymatique des ALDH non-phosphorylantes CoA ou non dépendante à pH 7 implique un environnement protéique adapté pour 1) diminuer le pK_a de la cystéine catalytique, 2) rendre le transfert d'hydrure efficace, 3) stabiliser la formation des intermédiaires formés et, 4) activer la molécule d'eau impliquée dans la désacylation ou le CoA lors de la transthioestérification. Le mécanisme catalytique détaillé pour une ALDH non-phosphorylante non CoA dépendante a déjà été mis en évidence au laboratoire par Stéphane Marchal sur une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'une ALDH non-phosphorylante CoA dépendante d'origine bactérienne, la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH) de *Bacillus subtilis*. Cette enzyme est décrite être impliquée dans les voies du métabolisme de la valine et des pyrimidines.

Mon projet de recherche avait pour objectif de déterminer les propriétés enzymatiques de la MSDH de *B. subtilis* en vue de caractériser dans un premier temps 1) le mode d'activation de la cystéine essentielle, 2) la nature de l'étape limitante de la réaction. Le second aspect du projet concernait la caractérisation des facteurs structuraux et moléculaires responsables de la reconnaissance du substrat au niveau de son carboxylate et impliqués dans sa β–décarboxylation et de l'évolution du site de transthioestérification.

Mon mémoire commencera par une introduction décrivant les propriétés générales des ALDH tant au niveau biochimique que structural. La partie résultat est présentée en deux grands chapitres. Le premier est consacré à l'étude des propriétés cinétiques de l'enzyme sauvage. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la spécificité structurale de la MSDH en vue de caractériser les facteurs structuraux et moléculaires responsables de la spécificité de substrat et de l'évolution du site de transthioestérification. Ce chapitre Résultats est suivi d'une partie Discussion et Perspectives et d'une partie Matériels et Méthodes.

INTRODUCTION

Les aldéhydes sont des composés ubiquitaires impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Les sources d'aldéhydes peuvent être endogènes ou exogènes. De part le caractère très électrophile de la fonction carbonyle, les aldéhydes sont très réactifs. Ils peuvent ainsi former des adduits covalents intra ou inter-moléculaires avec des biomolécules telles que les protéines, l'ADN ou les phospholipides ou former des intermédiaires réactionnels essentiels au métabolisme cellulaire.

1. Les aldéhydes : des composés aux effets biologiques antagonistes

1.1. Importance des aldéhydes *in vivo*

Les aldéhydes jouent souvent un rôle d'intermédiaires essentiels tant dans des processus anaboliques que cataboliques. L'aspartate β-semialdéhyde, impliqué dans la biosynthèse d'acides aminés, le rétinal, métabolite de la vitamine A et source d'acide rétinoïque, le γ-aminobutyraldéhyde, un précurseur du neurotransmetteur acide γ-aminobutyrique (GABA), sont autant d'exemples d'aldéhydes intervenant dans l'anabolisme. Le glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P), métabolite de la glycolyse, le succinate semialdéhyde, produit de la dégradation du GABA, la bétaine aldéhyde issue du catabolisme de la choline appartiennent aux voies de dégradation du métabolisme. Par la suite, quelques exemples représentatifs sont développés sans que la liste en soit exhaustive.

1.1.1. Rôle central du rétinaldéhyde dans le mécanisme de la vision, dans les phénomènes d'embryogenèse et de différenciation cellulaire

Les rétinoïdes (le rétinol ou vitamine A et ses métabolites) sont des molécules indispensables dans le règne animal car elles interviennent dans de nombreux processus biologiques comme la vision, l'embryogenèse, la reproduction, la croissance et la différenciation cellulaire. Parmi ces rétinoïdes, le rétinaldéhyde ou rétinal occupe une position centrale dans le métabolisme de la vitamine A. Il peut être obtenu d'une part, par oxydation enzymatique du rétinol au niveau des entérocytes ou des kératinocytes (Kurlandsky *et al.*, 1996) et d'autre part, par le clivage du β-carotène par la β-β carotène 15,15' monooxygénase (EC 1.14.99.36) (Leuenberger *et al.*, 2001) qui se produit principalement dans les cellules de la muqueuse intestinale et conduit à la formation de 2 molécules de rétinal. Le rétinal pourra ensuite être réduit de façon réversible en rétinol (vitamine A) par une alcool déshydrogénase,

...NCY 1
...IENCES
...que
...S-LES-NANCY

ou oxydé irréversiblement en acide rétinoïque (RA) par une rétinal déshydrogénase (Figure 1).

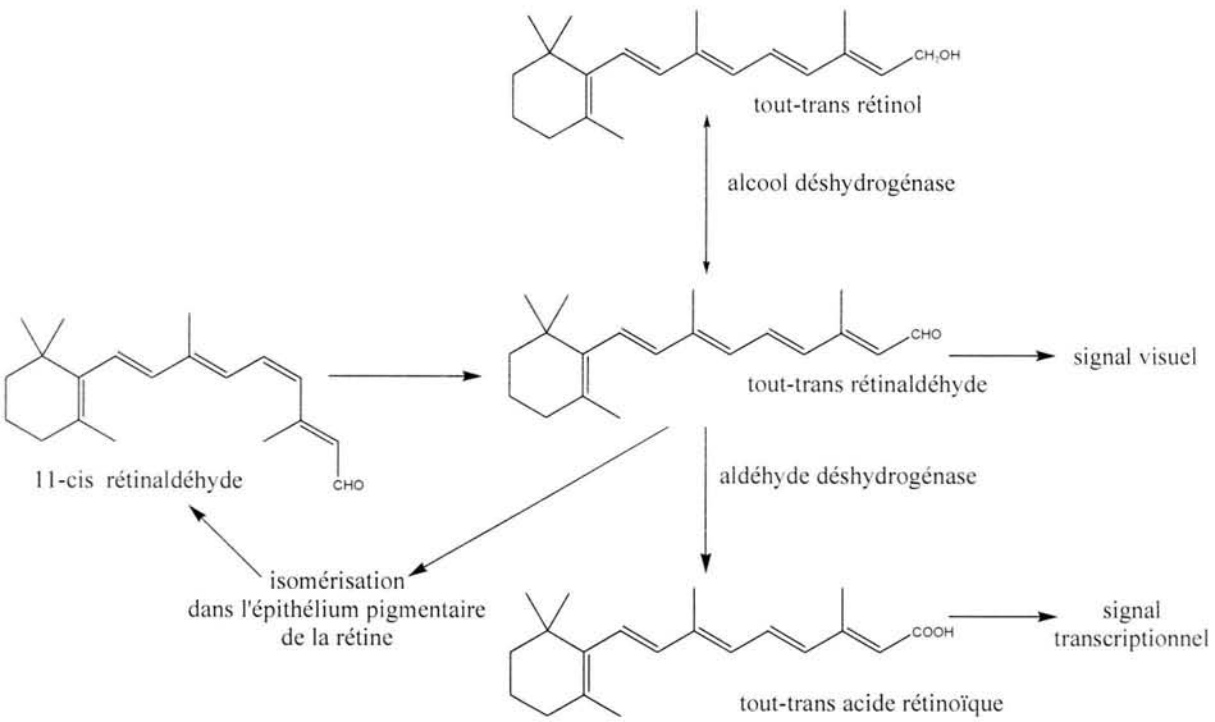


Figure 1 : Métabolisme de la vitamine A au niveau de l'œil : implication dans la vision et le contrôle transcriptionnel (d'après Dräger *et al.*, 1998).
La conversion du rétinol en rétinaldéhyde est réversible, mais la conversion du rétinaldéhyde en RA est irréversible. L'isomérisation du 11-cis rétinaldéhyde en forme tout-trans initie la cascade de transduction du signal visuel. Pendant que le 11-cis rétinaldéhyde est régénéré dans l'épithélium pigmentaire de la rétine, une partie du tout-trans rétinaldéhyde, relargué par la rhodopsine, est converti en RA qui est un activateur transcriptionnel.

Le rétinal et ses isomères sont directement impliqués dans le mécanisme de la vision. Au niveau de la rétine, les segments externes des photorécepteurs (cônes et bâtonnets) entourés par les villosités de l'épithélium pigmentaire renferment des disques contenant le pigment visuel : la rhodopsine, composée d'une protéine, l'opsine, liée par une base de Schiff au chromophore le 11-cis-rétinal. Lorsque les molécules de rhodopsine sont exposées à une excitation lumineuse, le 11-cis-rétinal s'isomérise en tout-trans-rétinal qui induit des changements conformationnels de l'opsine pour générer le photoproduit actif appelé métarhodopsin II (Saari *et al.*, 2001). Ce dernier aboutit à la libération d'un messager qui modifie la polarisation de la membrane plasmatique donnant ainsi naissance à l'influx nerveux qui va cheminer le long des voies optiques jusqu'au cortex occipital (Filipek *et al.*, 2003). La liaison opsine – tout-trans-rétinal est ensuite hydrolysée pour permettre la régénération du 11-cis-rétinal selon un processus complexe appelé cycle visuel (Figure 2).

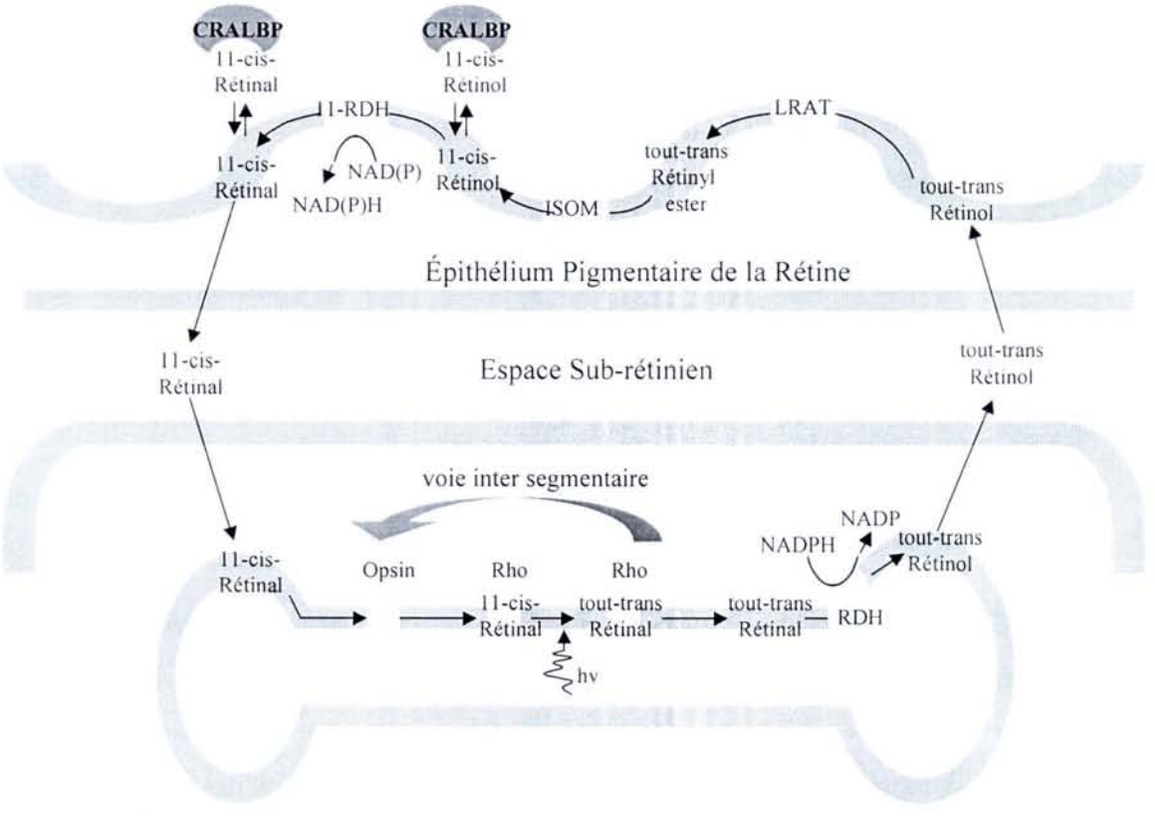


Figure 2 : Représentation schématique du cycle visuel (d'après Nawrot *et al.*, 2004).
Dans un premier temps, le tout-trans-rétinal est réduit en tout-trans-rétinol par une rétinol déshydrogénase localisée au niveau du segment externe du photorécepteur. Ce dernier diffuse ensuite vers l'épithélium pigmentaire sous forme complexée avec une protéine spécifique IRBP (« interphotoreceptor retinoid-binding protein »). Il est ensuite séquentiellement estérifié par la « lecithin-retinal acyl transferase » (LRAT) puis converti en 11-cis-rétinol par une isomérohydrolase. Enfin, l'oxydation en 11-cis-rétinal implique une ou plusieurs « short chain dehydrogenase-reductases » (RDH 4/5, RDH 11). Le 11-cis-rétinal diffuse alors vers le photorécepteur sous une forme complexée avec une protéine spécifique la CRALBP (« cellular retinaldehyde-binding protein ») où sa réassociation avec l'opsine permet de reformer la rhodopsine.

Le RA en particulier les isomères tout-trans-RA et 9-cis-RA, sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes essentiels au développement des organismes vertébrés (Napoli, 1999). Au cours de l'embryogenèse, il agit en tant que signal hormonal contrôlant de nombreux aspects de la morphogenèse et de l'organogenèse. Dans l'organisme mature, le RA contrôle la différenciation des cellules épithéliales au cours du processus de remplacement des cellules mortes. Il permet ainsi de prévenir le phénomène de carcinogenèse (Duester *et al.*, 2003). Les effets du RA sont transduits par sa liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques, appartenant à deux sous-familles distinctes de la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdiennes : les RAR (« retinoic acid receptor ») et les RXR (« retinoid X receptor »). Ces récepteurs, activés par la liaison du RA, interagissent sous forme d'homodimères (RAR/RAR)

ou d'hétérodimères (RAR/RXR) avec des éléments régulateurs spécifiques des gènes cibles, les RARE (« RA response elements »). De plus, le potentiel thérapeutique des rétinoïdes semble être important car ils sont utilisés dans le traitement de maladies cutanées comme l'acné (Peck et DiGiovanna, 1994), dans le traitement du diabète (Napoli, 1999) ainsi que dans le traitement et la prévention de nombreux types de cancers (Altucci et Gronemeyer, 2001). Cependant, le développement de ces traitements est limité notamment par le fait que le RA présente une toxicité élevée de par ses effets tératogènes et peut conduire à un syndrome de toxicité aigüe (Larson et Tallman, 2003).

1.1.2. Le succinate semialdéhyde : un intermédiaire clé dans le métabolisme de l'acide γ-aminobutyrique et du neurotransmetteur dopamine

Le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central, est produit principalement à partir du glutamate par la glutamate décarboxylase. Il est ensuite métabolisé au niveau des mitochondries par la GABA transaminase pour former le succinate semialdéhyde qui constitue un carrefour métabolique important. En effet, ce dernier peut être métabolisé en succinate par la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) pour intégrer le cycle de Krebs ou être converti en γ-hydroxybutyrate (GHB) par une succinate semialdéhyde réductase spécifique (Fait *et al.*, 2005 ; Figure 3).

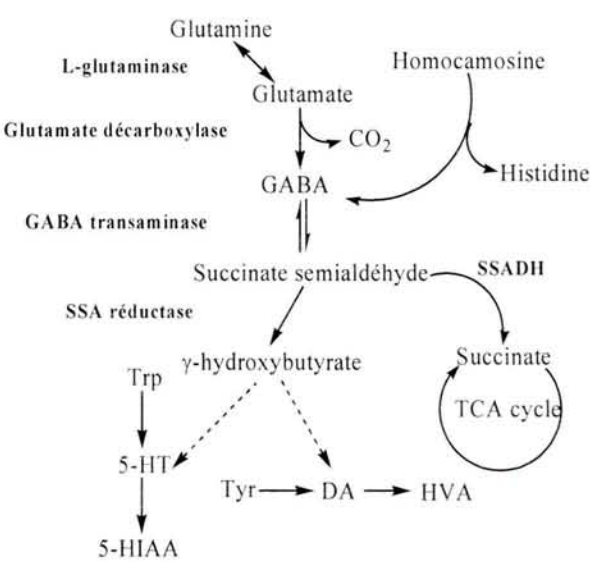


Figure 3 : Métabolisme de l'acide γ-aminobutyrique (d'après Gibson *et al.*, 2003)
L'accumulation de GHB augmente le taux de renouvellement de la dopamine et de la sérotonine (5-HT ou 5-hydroxytryptamine), qui sont transformés en acides homovanillique (5-HVA) et 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) respectivement. Abréviations : TCA, acide tricarboxylique ; DA, dopamine.

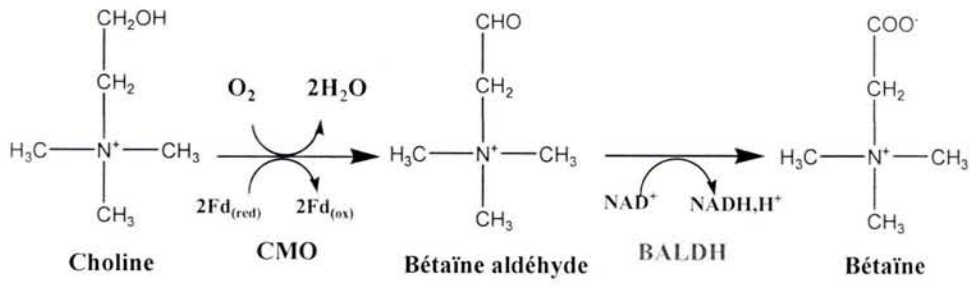
Le GHB est un acide gras monocarboxylique capable de traverser la barrière céphalorachidienne. A faible dose, sa capacité à induire des effets sédatifs ou euphorisants probablement *via* une inhibition du relargage de GABA ou de dopamine au niveau présynaptique, (Gibson *et al.*, 2003) l'a rendu célèbre ces dernières années en tant que drogue de l'abus sexuel (Schneir *et al.*, 2001). Parallèlement, les propriétés neuropharmacologiques inhabituelles du GHB qui ont été mises à profit au niveau clinique dans le cadre d'anesthésie, de traitements des troubles du sommeil ou encore des syndromes de cataplexie et d'états de manque relatifs à la dépendance à l'alcool ou l'opium (Bekri *et al.*, 2004). Par contre, son accumulation due à une déficience de l'activité SSADH est une maladie génétique autosomale récessive rare qui se traduit par des troubles cliniques sévères comme des retards de développement, des états d'hypotonie et d'ataxie ou encore des troubles du langage ou du comportement (Gibson *et al.*, 2003).

1.1.3. La bétaïne aldéhyde : un intermédiaire dans la biosynthèse de la glycine bétaïne

Les bétaïnes sont un ensemble de petites molécules présentes dans une grande variété d'organismes allant des bactéries et *archaea*, aux animaux et à plusieurs familles de plantes (Weretilnyk et Hanson, 1990 ; Huang *et al.*, 2000). Au niveau physiologique, elles assurent un rôle d'osmoprotectant ou de donneurs de groupement méthyle *via* des réactions de transméthylation (Craig, 2004).

La glycine bétaïne est un des plus important osmoprotectant. Dans la plupart des organismes, la production de glycine bétaïne est réalisée à partir de la choline par un processus d'oxydation à deux étapes impliquant la glycine bétaïne aldéhyde comme intermédiaire (Figure 4). Chez les plantes, la voie de synthèse fait intervenir une choline monooxygénase (CMO) et la bétaïne aldéhyde déshydrogénase (BALDH). Dans les cellules de mammifères et dans des bactéries telle que *Escherichia coli*, la glycine bétaïne est synthétisée par la choline déshydrogénase et la BALDH (Sakamoto et Murata, 1999).

1. Plantes



2. *Escherichia coli*

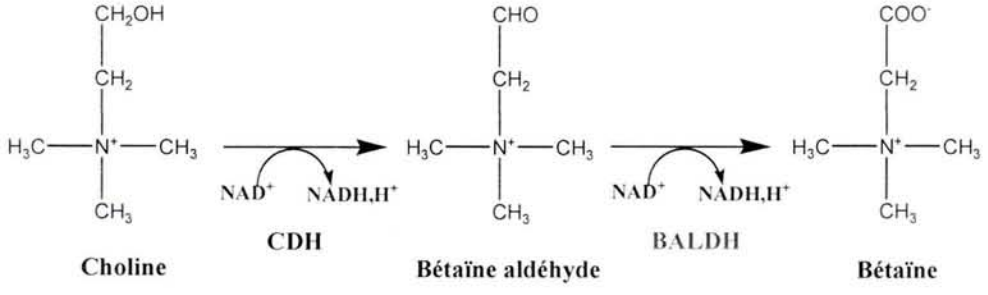


Figure 4: Exemple de voies de biosynthèse de la bétaïne utilisant la bétaïne aldéhyde déshydrogénase (BALDH) (d'après Sakamoto et Murata, 1999).
Abréviations : CDH, choline déshydrogénase ; Fd (red) et Fd (ox), forme réduite et oxydée de la ferredoxine.

En tant qu'osmolyte, la bétaïne peut s'accumuler jusqu'à de fortes concentrations sans danger de toxicité et protège les cellules, les protéines et les enzymes de stress environnementaux tels que le froid, la chaleur, les sels et le gel (Huang *et al.*, 2000). Chez l'homme, cette fonction s'avère d'importance car la régulation de l'état d'hydratation des cellules est essentielle pour le maintien de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple le métabolisme des hydrates de carbone ou des acides gras, ou l'expression de gènes (Haussinger, 1996 ; Craig, 2004). En tant que donneur de méthyle, la glycine bétaïne participe principalement au niveau du foie et des reins, au cycle de la méthionine (Figure 5) indispensable à de nombreux processus cellulaires vitaux. A titre d'exemple, une hypométhylation aura notamment comme conséquences une perturbation du métabolisme hépatique de la méthionine, entraînant une augmentation de la concentration de l'homocystéine (toxique) et une diminution de celle de la S-adénosylméthionine, et des lipides conduisant au phénomène de stéatose (ou foie gras). Ces désordres métaboliques pourraient être impliqués dans diverses pathologies au niveau artériel, cérébral, hépatique et vasculaire (Cravo et Camilo, 2000).

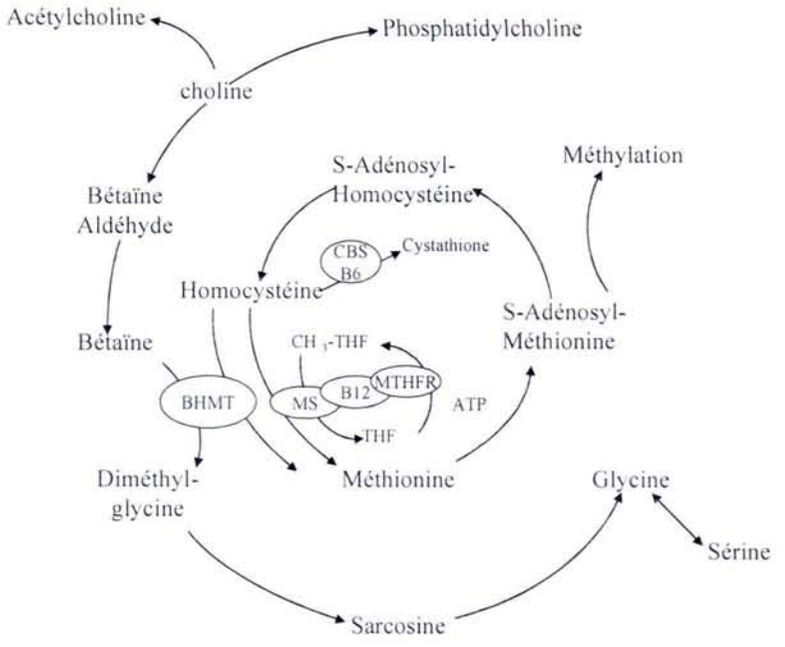


Figure 5 : La bétaïne et la transméthylation dans le cycle de la méthionine (d'après Craig, 2004).
Abréviations : B6, vitamine B6 ; B12, vitamine B12 (cobalamine) ; BHMT, bétaïne homocystéine méthyltransferase ; CBS, cystathionine β-synthase ; MS, méthionine synthase ; MTHFR, méthylènetétrahydrofolate réductase ; THF, tétrahydrofolate ; CH3-THF, 5-méthyltétrahydrofolate.

1.2. Effets toxiques

La réactivité chimique des aldéhydes sur les groupements nucléophiles de biomolécules leur confère un caractère potentiellement toxique. Ceci est non seulement vrai pour des aldéhydes d'origine exogène, produit par la biotransformation de xénobiotiques tels que l'alcool éthylique, la nicotine ou de médicaments, mais aussi d'aldéhydes d'origine endogène issus de la peroxydation des lipides membranaires ou de l'oxydation d'acides aminés.

1.2.1. Aldéhydes provenant de la biotransformation de substances endogènes ou exogènes

L'acroléine est un aldéhyde α-β-insaturé hautement toxique ubiquitaire dans notre environnement. Bien qu'il soit utilisé dans l'industrie comme herbicide et dans la production d'acide acrylique, il constitue surtout un polluant atmosphérique majeur (combustion de matière organique, fumée de cigarette, gaz d'échappement, rejets industriels, etc...) (Burcham *et al.*, 2004). D'ailleurs, l'acroléine est l'aldéhyde qui est retrouvé en grande concentration dans l'atmosphère. De ce fait, il est impliqué dans des pathologies respiratoires plus ou moins

sévères liées à l'inhalation de la fumée de cigarette par exemple (Hales *et al.*, 1988). *In vivo*, cet aldéhyde est également généré par la désamination oxydative d'amines biogéniques telles que la spermine et la spermidine par l'amine oxydase, ou encore par la biotransformation hépatique de médicaments anticancéreux comme le cyclophosphamide et l'ifosfamide (Ludeman, 1999). Enfin, la péroxydation des lipides représente une source majeure d'acroléine endogène. Il semble d'ailleurs bien établi que l'acroléine formé *via* ce processus joue un rôle de médiateur dans les dommages cellulaires observés dans différentes maladies liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer (Uchida, 1999 ; Lovell *et al.*, 2001). Parmi les aldéhydes α-β-insaturés, l'acroléine est de loin le plus puissant électrophile et par conséquent celui qui présente la plus forte réactivité vis-à-vis des centres nucléophiles présents dans les protéines ou l'ADN. Ceci a comme conséquences la formation d'adduits *via* la réaction de Michael (Figure 6), ces adduits pouvant ensuite réagir avec d'autres nucléophiles pour former des ponts covalents inter- ou intramoléculaires (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Permana et Snapka, 1994 ; Kurtz et Lloyd, 2003). Cette réactivité est à l'origine de la cytotoxicité de l'acroléine incluant l'altération de l'activité de facteurs de transcription tels que AP-1, NF-κB (« Nuclear factor kappa B ») et Nrf2 (« NF-E2-related factor 2 ») (Horton *et al.*, 1999 ; Biswal *et al.*, 2002 ; Tirumalai *et al.*, 2002), l'inhibition de la production de cytokines (Li *et al.*, 1997), et la mort cellulaire (Li *et al.*, 1997 ; Kern et Kehrer, 2002).

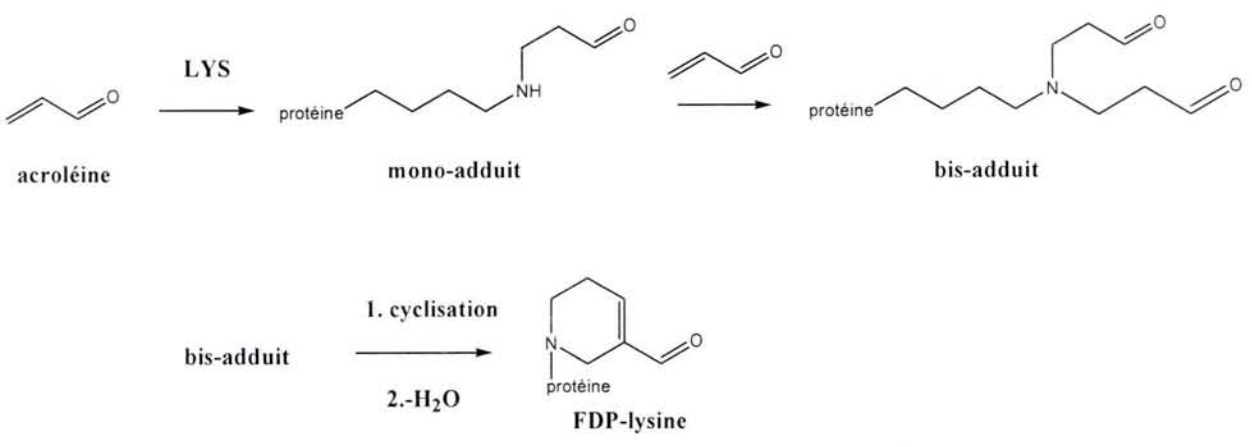


Figure 6 : Addition de Michael : addition d'acroléine sur une protéine *via* une lysine (d'après Burcham *et al.*, 2004).
Abréviation : FDP-lysine, N^{ε}-(3-formyl-3,4-déhydropiperidino) lysine.

1.2.2. Aldéhydes générés par la peroxydation des lipides

Il est maintenant bien établi que la plupart des disfonctionnements cellulaires induits lors d'un stress oxydant sont médiés par des composés issus de réactions non enzymatiques parmi lesquelles la peroxydation des acides gras polyinsaturés. La réaction de ces composés avec des radicaux libres initie un processus en chaîne autocatalytique, qui conduit principalement à la formation d'hydroperoxydes lipidiques dont l'accumulation peut être directement cytotoxique. Ces derniers vont ensuite se décomposer en un grand nombre de produits de dégradation dont les lipides dérivés en aldéhydes (LDA). Les LDA sont plus stables que leurs précurseurs, les radicaux libres, et peuvent diffuser au sein ou à l'extérieur de la cellule pour modifier d'autres cibles éloignées du site initial de la réaction de peroxydation. De part leur nature électrophile, ils peuvent former des adduits covalents intra- ou intermoléculaires avec les protéines, l'ADN ou les phospholipides et sont par conséquent considérés comme les médiateurs ultimes des dommages générés lors d'un stress oxydant (Uchida, 2003). L'accumulation de ces adduits semble être corrélée au développement de plusieurs maladies telles que le diabète, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de certains cancers et plus généralement impliquée dans le vieillissement (Halliwell, 1991 ; Esterbauer *et al.*, 1991 ; Oranje et Wolffenbuttel, 1999).

Selon leur structure, les LDA ont été classés en trois familles : les 2-alcénals, les 4-hydroxy-2-alcénals et les cétoaldéhydes (Figure 7A ; Uchida, 2003). Les LDA les plus abondants sont l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonénal (HNE), et le 4-hydroxyhexanal (HHE). Ces aldéhydes sont connus pour modifier les résidus cystéine, histidine ou lysine des protéines par un mécanisme d'addition de Michael (Figure 6). Parmi ces LDA, le HNE et le HHE, respectivement issus de la peroxydation de l'acide arachidonique et de l'acide docosahexanoïque, présentent la cytotoxicité la plus élevée et sont générés à de fortes concentrations (Benedetti *et al.*, 1980 ; Esterbauer *et al.*, 1991). D'ailleurs, les adduits dérivés de HNE représentent un des biomarqueurs les plus utiles pour l'évaluation de l'existence et/ou de l'étendue d'un stress oxydant comme dans le cas de patients atteints de maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, et la sclérose en plaque (Yoritaka *et al.*, 1996 ; Ando *et al.*, 1998 ; Calingasan *et al.*, 1999 ; Shibata *et al.*, 2001) ou d'athérosclérose (Uchida *et al.*, 1994). Dans ce dernier cas, la formation d'adduits «HNE–LDL » («Low density lipoprotein ») empêche l'élimination des LDL par l'intermédiaire des récepteurs B/E qui reconnaissent leur partie protéique appelée Apo B. Les LDL sont alors reconnus par les récepteurs « scavenger » des macrophages ce qui déclenche

le processus d'athérogenèse et l'accumulation de cellules spumeuses (Uchida, 2000). De plus, la propension du HNE à former des adduits avec le glutathion conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de ce composé, induisant une modification du potentiel rédox cellulaire (Tjalkens *et al.*, 1999 ; Reichard *et al.*, 2000) et potentiellement un stress oxydant intracellulaire (Uchida, 2003).

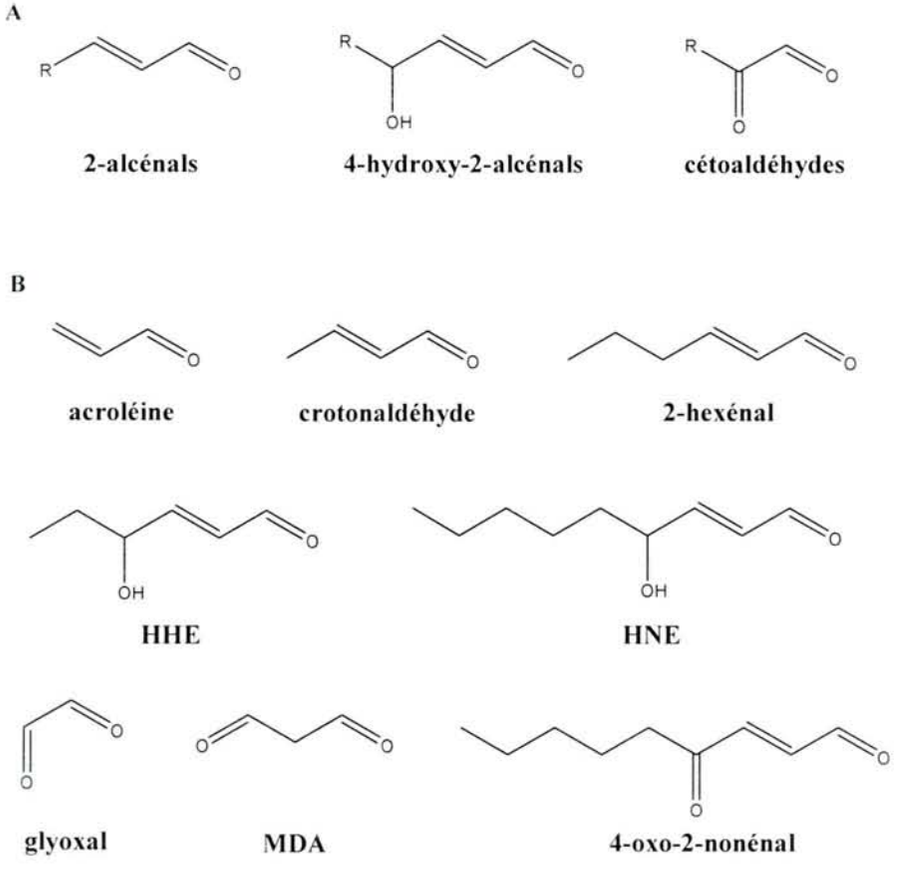


Figure 7 : Structures générales d'aldéhydes réactifs (A) et d'aldéhydes issus de la peroxydation des lipides (B) (d'après Uchida, 2003).

Par contre, à de très faibles concentrations, ces LDA pourraient moduler un certain nombre de fonctions cellulaires incluant la transduction du signal, l'expression génique, la prolifération cellulaire (Uchida, 2003). Il a notamment été montré que le HNE activait une variété de voies de signalisation qui pourraient être associées à des mécanismes de survie en réponse à un stress cytotoxique (Figure 8).

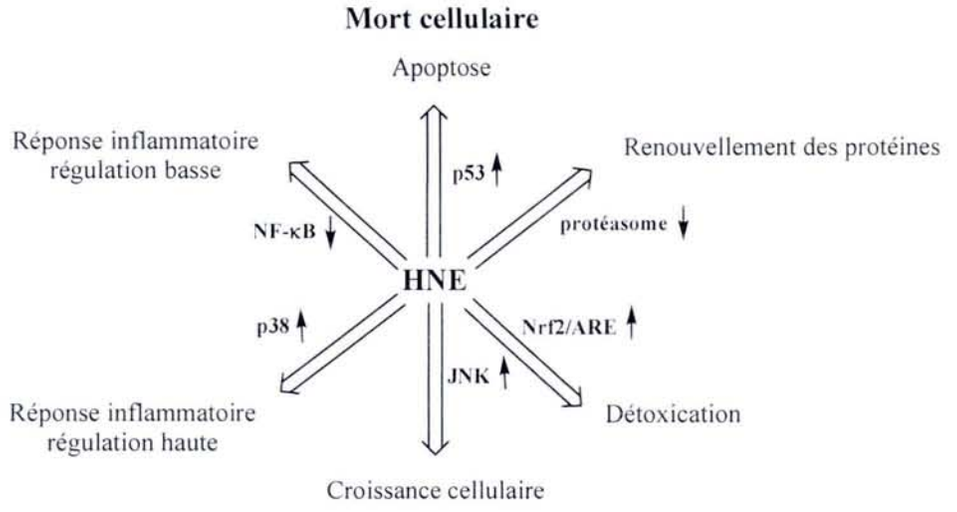


Figure 8 : Fonctions biologiques de HNE (d'après Uchida, 2003).
HNE active une variété de mécanismes de signalisation, dans la voie des MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), dans les mécanismes de détoxication ou de réponse inflammatoire, lesquels peuvent être associés à des mécanismes de survie de la cellule contre un stress cytotoxique. HNE entraîne une phosphorylation des tyrosines, ce qui entraîne l'activation de JNK et de p38, membres de la famille des MAPK, jouant un rôle important dans la transduction de signaux extracellulaires et dans la réponse intracellulaire à travers une série de cascades de phosphorylation. La liaison covalente de HNE à des facteurs de transcription comme Nrf2 peut activer les ARE et induire l'expression de protéines de détoxication. HNE est également un inducteur potentiel de l'apoptose, il peut activer la voie de signalisation Fas/FasL médiée par p53. HNE induit des dysfonctionnements cellulaires par l'inhibition de mécanismes de protection cellulaire, tels que l'expression de gènes dépendant de NF-κB, et le renouvellement de protéines dépendant du protéasome, menant à la mort cellulaire. Abréviations : JNK, c-Jun N-terminal kinases ; ARE, « antioxidant response element ».

1.2.3. Aldéhydes impliqués dans les mécanismes de glycation

La glycation, également appelée réaction de Maillard, est une réaction non enzymatique à deux étapes au cours de laquelle les oses se lient dans un premier temps par leur fonction aldéhyde ou cétone aux NH_2 libres des protéines (lysine, arginine, NH_2 en N-terminal ...). La réaction est initiée par la formation d'une base de Schiff qui après réarrangement aboutit à un composé d'Amadori relativement stable. Au cours de la seconde étape, lente et irréversible, les AGE (« advanced glycation end products ») sont formés après une cascade complexe de réactions : déshydratation répétée, condensation, fragmentation, oxydation et cyclisation par le biais d'intermédiaires très réactifs comme le 3-désoxyglucosone ou le méthylglyoxal, un composé issu de la glycolyse (Uchida, 2000 ; Kikuchi *et al.*, 2003 ; Figure 9). La cytotoxicité des réactions de glycation est la conséquence de trois mécanismes à savoir 1) l'altération des fonctions spécifiques d'une protéine, 2) le pontage covalent, l'agrégation et la précipitation

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

des protéines et, 3) la production d'espèces réactives de l'oxygène. Jusqu'à récemment, les études s'étaient essentiellement focalisées sur la relation entre d'une part ce mécanisme de glycation et les AGE et d'autre part, le diabète et les complications associées (Wolff *et al.*, 1991 ; Myint *et al.*, 1995 ; Ryle *et al.*, 1997). Cependant les dommages induits par le glucose ne se limitent pas aux patients diabétiques. En effet, le processus de glycation ne cause pas des dommages immédiats au niveau cellulaire mais il progresse lentement, accompagnant chaque étape fondamentale du métabolisme. D'ailleurs, il a été montré que la glycation et les AGE étaient impliqués dans des processus liés au vieillissement (cataracte, athérosclérose, etc...), (Vlassara *et al.*, 1994) et dans les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Castellani *et al.*, 1996) ou la sclérose en plaque (Shibata *et al.*, 1997).

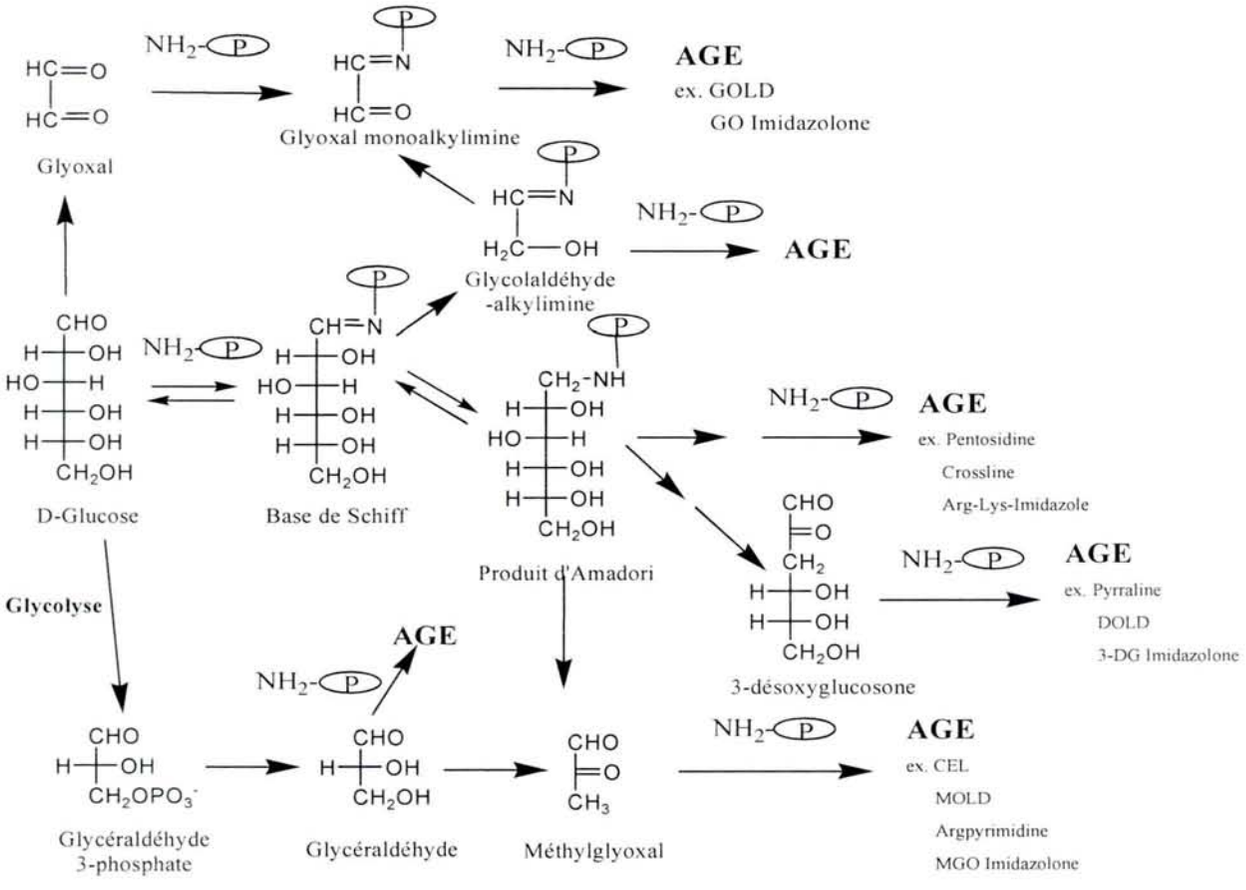


Figure 9 : Voies possibles pour la formation des AGE (d'après Kikuchi *et al.*, 2003).
Les AGE proviennent de la décomposition des produits d'Amadori, d'intermédiaires de la glycolyse (G3P), de produits de fragmentation de bases de Schiff (glycolaldéhyde), et de fragmentation de produits d'Amadori (méthylglyoxal et 3-désoxyglucosone), et de l'autooxidation du glucose en glyoxal. Abréviations : P, protéine ; GO, glyoxal ; GOLD, glyoxal Lys dimère ; DOLD, 3-DG Lys dimère ; DG, désoxyglucosone ; CEL, N^{ε}-(carboxyéthyl)lysine ; MOLD, méthylglyoxal Lys dimère ; MGO, méthylglyoxal.

1.2.4. Aldéhyde généré par le métabolisme de l'éthanol : lien entre alcoolisme et toxicité cellulaire

L'acétaldéhyde, métabolite très toxique car très réactif, est un intermédiaire obligatoire dans le métabolisme oxydatif de l'éthanol. La majeure partie de l'éthanol est oxydée au niveau de l'hépatocyte. Le métabolisme fait intervenir deux oxydations, la première transformant l'alcool en acétaldéhyde, la seconde l'acétaldéhyde en acétate (Figure 10). Trois voies enzymatiques, chacune localisée dans un compartiment cellulaire différent, participent à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde. Les voies les mieux établies sont celles de l'alcool déshydrogénase (ADH), qui est cytosolique, et du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS), qui fait intervenir le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et qui est localisée dans le réticulum endoplasmique. La voie de l'ADH est prépondérante. La voie de la catalase, localisée dans les peroxysomes, semble peu importante car la présence d'H_2O_2, nécessaire à la réaction, est limitée dans l'organisme. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) NAD^+ dépendante, dont la localisation peut être cytosolique ou mitochondriale. Une consommation chronique d'alcool va conduire à une augmentation du rapport $NADH/NAD^+$. Cette modification du potentiel rédox de la cellule est ainsi responsable de disfonctionnements métaboliques comme l'inhibition du cycle de Krebs et de l'oxydation des acides gras qui favorise l'hyperlactacidémie ou encore la stéatose et l'hyperlipidémie (Lieber, 1997). De plus, l'alcoolisme chronique va diminuer l'activité enzymatique de l'ALDH et conduire à l'accumulation de l'acétaldéhyde (Agarwal *et al.*, 1987).

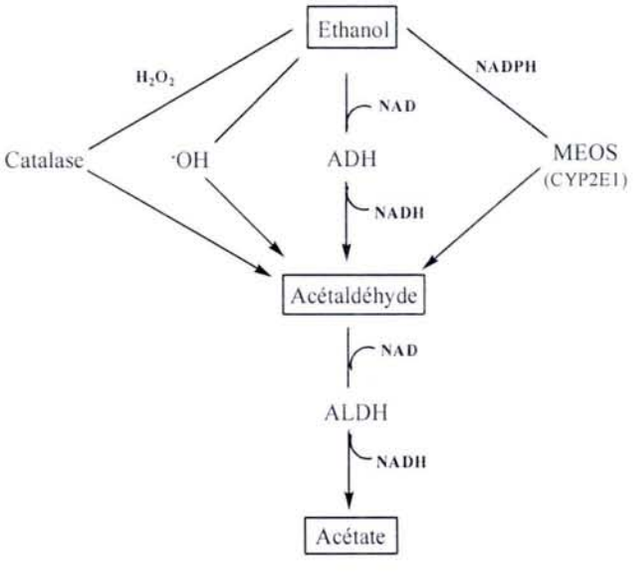


Figure 10 : Métabolisme hépatique de l'éthanol.

La cytotoxicité de l'acétaldéhyde est associée à sa capacité à former des adduits covalents avec des molécules environnantes (protéines, enzymes, glutathion ...). Ces adduits sont aussi bien retrouvés au niveau du foie que du cerveau (Rintala *et al.*, 2000) et modifient les propriétés de certaines protéines (diminution de l'activité enzymatique, transformation en protéines antigéniques à l'origine de réactions immunologiques). Les adduits acétaldéhyde-protéine stimulent en outre la production de collagène. L'acétaldéhyde est par ailleurs associé à la mort cellulaire en épuisant le glutathion réduit, et en augmentant la peroxydation lipidique et les effets toxiques des radicaux libres. Il traverse le placenta, diminue la méthylation de l'ADN foetal, et peut contribuer au syndrome d'alcoolisation fœtale (Lieber, 1997 ; Lieber, 2004).

1.3. Enzymes impliquées dans le métabolisme des aldéhydes

Les aldéhydes d'origine endogène ou exogène peuvent être oxydés en leur acide correspondant par une aldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.3), une aldéhyde oxydase (EC 1.2.3.1) et/ou une xanthine oxydase (EC 1.2.3.2), ou bien réduits par une aldo-cétoréductase (EC 1.1.1.2) et/ou une alcool déshydrogénase en leur alcool correspondant. Cependant, la voie principale reste la conversion en acide.

1.3.1. Les aldéhydes oxydases

Les aldéhyde oxydases (AOX) et la xanthine oxydase (XOR) constituent un sous-groupe de la famille des molybdo-flavoenzymes. Elles se caractérisent par le fait qu'elles nécessitent deux cofacteurs de type molybdoptérine (Mo) et flavine pour être actives. Ces enzymes ubiquitaires sont structuralement et phylogénétiquement apparentées et catalysent l'oxydation d'aldéhydes aliphatiques ou aromatiques et de composés hétérocycliques azotés (Garattini *et al.*, 2003). Chez les mammifères, cinq membres de cette famille ont été identifiés à savoir la XOR, l'aldéhyde oxydase 1 (AOX1), mais également les homologues 1, 2 et 3 de l'AOX (AOH1, AOH2, AOH3) isolés et caractérisés uniquement chez la souris et le rat (Kurosaki *et al.*, 2004). Bien qu'elle puisse oxyder une variété de substrats comme les purines, les ptéridines et les aldéhydes, la XOR est principalement une enzyme clé du métabolisme des purines en catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Par contre, peu d'informations relatives aux fonctions physiologiques et biochimiques des autres membres de cette famille sont actuellement disponibles, notamment pour AOH1,

AOH2 et AOH3. Cependant, l'AOX1 et l'AOH1 oxydent le rétinal en acide rétinoïque et pourraient donc être impliquées dans le développement des vertébrés (Kurosaki *et al.*, 2004). De plus, l'AOX1 est capable d'oxyder des hétérocycles azotés aromatiques ou non, ainsi que des aldéhydes tels que le benzaldéhyde et la vanilline. Plusieurs substrats de cette enzyme sont d'ailleurs d'intérêt toxicologique ou pharmaceutique, comme l'acétaldéhyde, et des agents anti-viraux ou anti-néoplastiques tels que le méthotrexate, le 6-mercaptopurine et le famcyclovir (Garattini *et al.*, 2003).

Les molybdo-flavoenzymes de mammifères sont cytosoliques, homodimériques avec un monomère de 150 kDa. L'inspection des structures tridimensionnelles disponibles révèle une topologie de repliement identique avec un domaine N-terminal d'environ 20 kDa qui contient 2 centres Fe/S distincts, suivi d'un domaine de 40 kDa contenant la flavine et un domaine C-terminal de 85 kDa contenant les sites de liaison du cofacteur Mo et du substrat (Hille, 2005). Le centre Mo présente une coordination géométrique de type pyramide à base carrée, avec en position apicale le ligand Mo=O et quatre ligands en position équatoriale qui sont le Mo=S, les deux soufres du cofacteur ptérine et l'hydroxyde. Bien qu'il n'ait pas été clairement établi pour l'AOX, un mécanisme catalytique a cependant été proposé sur la base des travaux menés sur la XOR bovine avec un substrat aldéhydique (Xia *et al.*, 1999). L'oxydation de l'aldéhyde en son acide correspondant est initiée par une attaque nucléophile assistée par une base, le résidu invariant E1261, du groupement Mo=OH sur la fonction carbonyle du substrat avec un transfert d'hydrure concomitant sur le groupement Mo(VI)==S pour donner Mo(IV)-SH (Figure 11). Dans une seconde phase, les électrons générés sont transférés vers un accepteur par le biais d'un transfert intramoléculaire du molybdène vers les centres Fe/S puis vers le FAD (Hille, 2005).

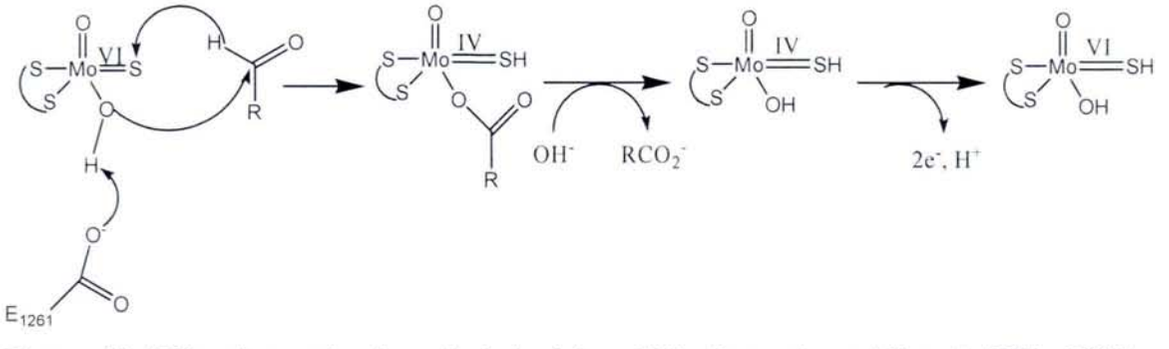


Figure 11: Mécanisme réactionnel général des aldéhyde oxydases (d'après Hille, 2005)
Le processus de conversion d'aldéhydes en acide carboxylique correspondant a été proposé *via* une attaque nucléophile, assistée par une base, du Mo-OH sur le substrat carbonylé, avec un transfert d'hydrure concomitant sur le Mo=S.

1.3.2. Les aldo-cétoreductases

Les aldo-cétoréductases (AKRs) sont une superfamille d'oxydo-réductases NADPH dépendantes catalysant la réduction d'un large spectre d'aldéhydes et de cétones en leur alcool correspondant. Elles regroupent 14 familles (AKR1-AKR14) dont la famille AKR1 qui est la plus vaste. Cette dernière rassemble les aldose réductases, les aldéhyde réductases, les hydroxystéroïde déshydrogénases et les stéroïde 5β-réductases (Hyndman *et al.*, 2003).

Les hydroxystéroïde déshydrogénases de mammifères jouent un rôle central dans la biosynthèse et l'inactivation des hormones thyroïdiennes (Schlegel *et al.*, 1998). Les aldéhyde réductases sont impliquées plus spécifiquement dans le métabolisme du glucuronate, des neurotransmetteurs et dans le métabolisme des stéroïdes (Barski *et al.*, 2004). Un intérêt particulier a été porté à l'aldose réductase (AR) du fait de sa possible implication dans les complications liées au diabète par la conversion du glucose en excès en sorbitol dans la première étape de la voie des polyols (Frank, 1994 ; Bohren *et al.*, 2005). De plus, des études récentes indiquent que l'AR pourrait réduire de façon efficace des aldéhydes phospholipidiques issus de la peroxydation des lipides (Srivastava *et al.*, 2004).

Les AKRs possèdent un motif en tonneau $(\alpha/\beta)_8$ caractéristique de la triose phosphate isomérase et sont en général des enzymes monomériques d'environ 32 kDa (Hyndman *et al.*, 2003). Leur site actif, localisé à l'extrémité C-terminale du tonneau, est composé d'une tétrade catalytique hautement conservée : Y51, K80, D46 et H113, ce qui suggère un mécanisme catalytique de base commun (Figure 12). Y51 jouerait le rôle de catalyseur général acide-base de la réaction. Le groupement εNH_2 de K80, protoné au pH physiologique, est positionné par le biais d'un pont salin établi avec le carboxylate de la chaîne latérale de D46. Ceci permet l'établissement d'une liaison hydrogène entre K80 et l'hydroxyle du groupement phénol de la chaîne latérale de Y51 et conduit à l'abaissement du pK_a de Y51 de 10,5 en solution à une valeur située entre 7 et 9 dans le complexe enzyme-NADPH et le complexe ternaire. Le rôle exact du résidu H113 dans la catalyse a été sujet à controverses, mais des études récentes montrent que ce résidu facilite la réaction en permettant un positionnement adéquat du groupement carbonyle du substrat dans le site actif (Kratzer *et al.*, 2004).

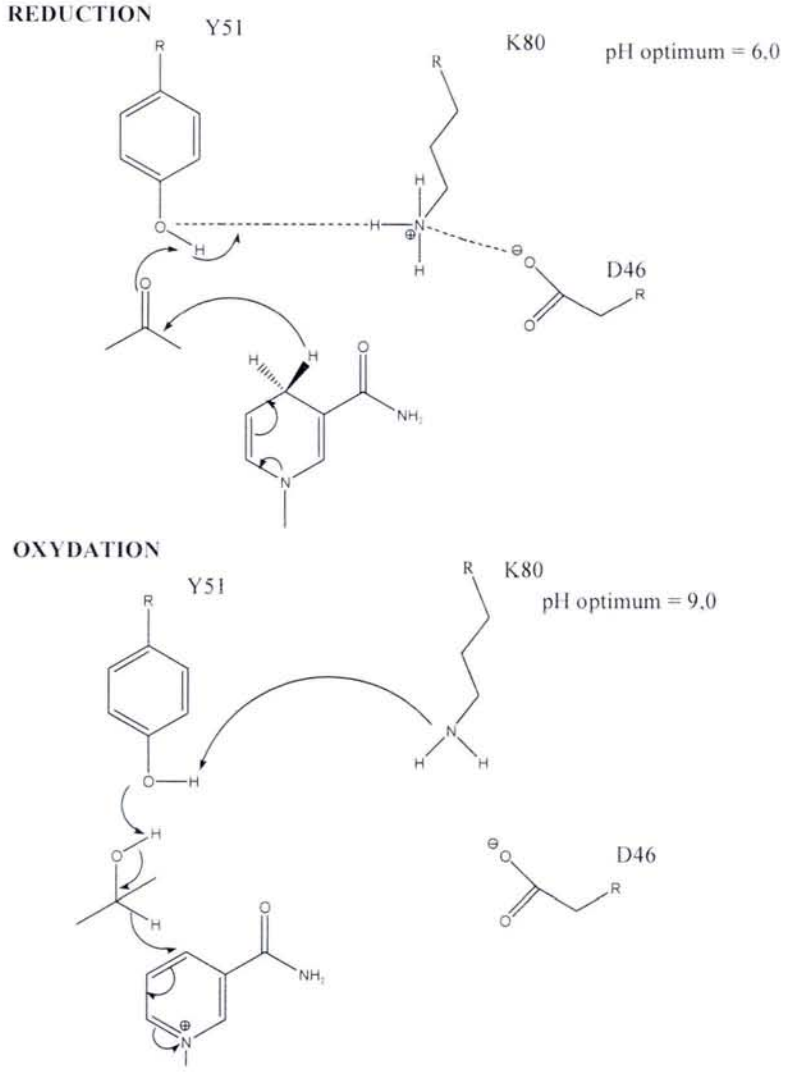


Figure 12 : Mécanisme catalytique proposé pour les hydroxystéroïde déshydrogénases (d'après Schlegel *et al.*, 1998)

1.3.3. Les alcool déshydrogénases

Chez les vertébrés, la famille des ADH constitue un vaste ensemble d'enzymes distinctes de part leurs propriétés enzymatiques et structurales (Peralba *et al.*, 1999). Elle catalyse la transformation d'alcools en aldéhydes *via* une réaction d'oxydo-réduction par transfert d'hydrure (Branden et Reinhammar, 1975). Parmi toutes les ADH caractérisées à ce jour, l'ADH de foie humain a la propriété supplémentaire d'oxyder un substrat aldéhydique en acide carboxylique correspondant (Shearer *et al.*, 1993). Sur la base des coordonnées de la structure tridimensionnelle d'un complexe inactif enzyme-cofacteur NAD^+-inhibiteur de l'ADH de foie de cheval, une approche théorique par des méthodes de dynamique moléculaire

a permis de proposer un mécanisme général d'oxydation d'un composé aldéhydique (Olson *et al.*, 1996). La forme gem-diol de l'aldéhyde est le substrat de la réaction (Figure 13). Cependant cette activité aldéhyde oxydase semble très faible car l'enzyme est moins affine pour le substrat aldéhydique que pour l'alcool correspondant (Shearer *et al.*, 1993).

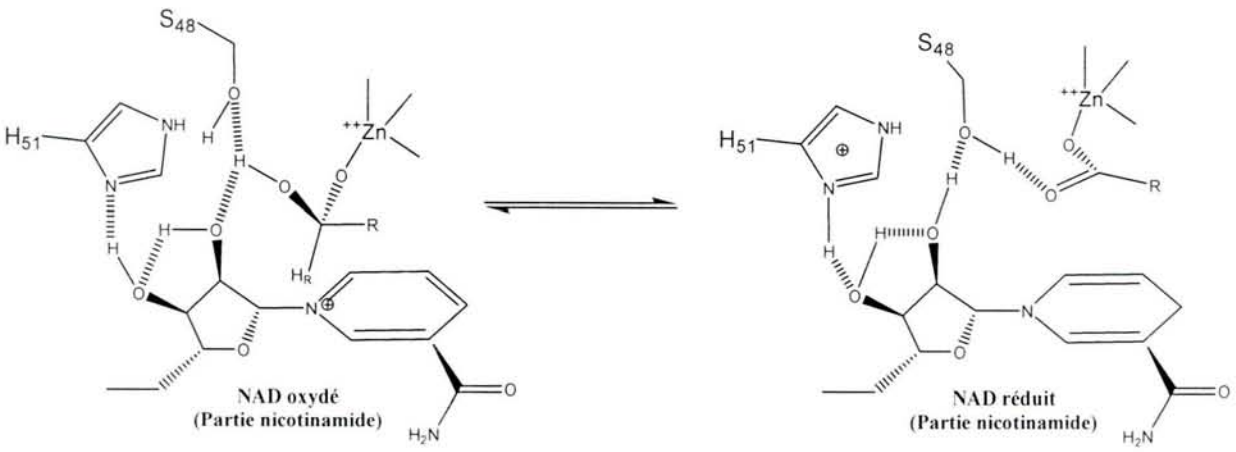


Figure 13 : Oxydation du substrat aldéhydique sous forme gem-diol dans le site actif de l'alcool déshydrogénase de foie humain.
Le résidu H51 joue le rôle de base *via* un réseau de liaisons hydrogènes, favorisant le transfert d'un hydrogène sous forme d'hydrure sur le noyau nicotinamidium du cofacteur NAD^+.

1.3.4. Les aldéhyde déshydrogénases

Les ALDH à cofacteur $NAD(P)^+$ sont des enzymes essentielles impliquées dans le métabolisme cellulaire et/ou la détoxication de composés aldéhydiques. Elles sont subdivisées en deux familles structuralement et phylogénétiquement distinctes à savoir les ALDH phosphorylantes et les ALDH non-phosphorylantes coenzyme A (CoA) ou non-CoA dépendantes. Elles ont en commun de catalyser l'oxydation d'un large spectre d'aldéhydes en acides correspondants, activés ou non, par un mécanisme à deux étapes. La première étape d'acylation, commune aux deux familles, conduit à la formation d'un intermédiaire thioacylenzyme, alors que la seconde étape de désacylation diffère par la nature de l'accepteur d'acyle (Figure 14). Dans la famille des ALDH phosphorylantes, l'accepteur d'acyle est une molécule de phosphate inorganique, alors que dans les ALDH non phosphorylantes l'intermédiaire thioacylenzyme subit l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau ou de CoA. La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH) étant une ALDH appartenant à la famille des ALDH non-phosphorylantes, la suite de cette présentation sera limitée à cette famille d'ALDH.

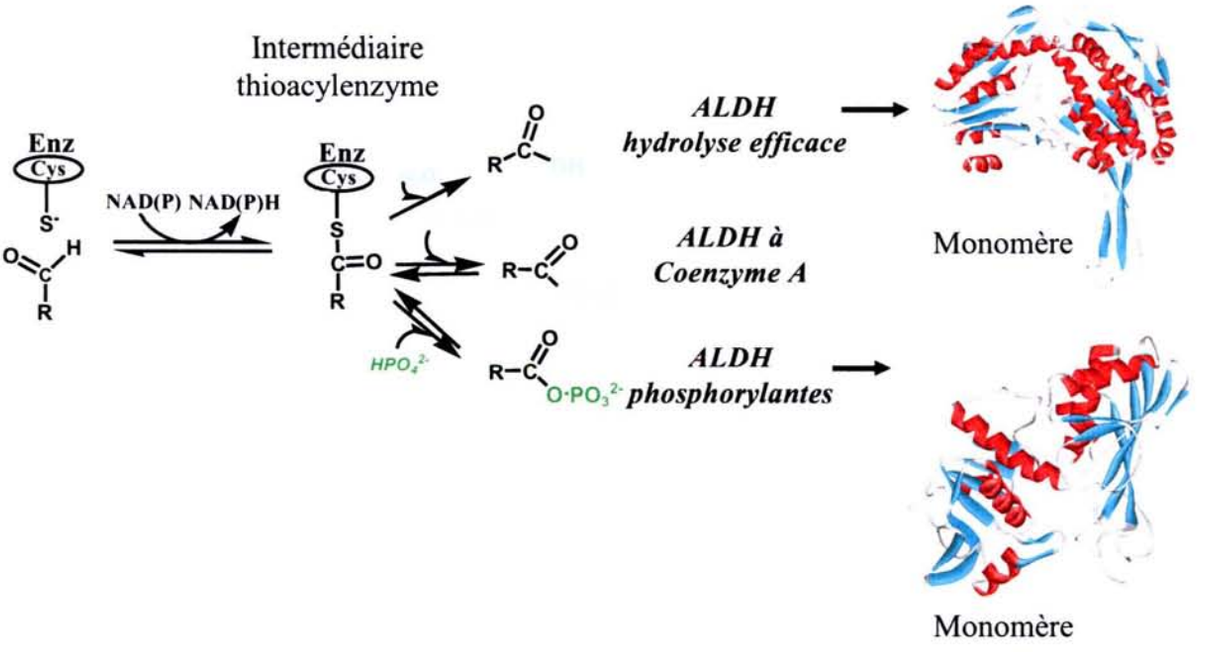


Figure 14: Représentation schématique du mécanisme général des ALDH.

2. Les aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes à cofacteur $NAD(P)^+$

2.1. Rôles *in vivo*

Les ALDH assurent une grande variété de fonctions, et de ce fait présentent des spécificités de substrat très variables.

2.1.1. Implication dans les processus de détoxication

L'importance des ALDH dans les processus de détoxication cellulaire apparaît évidente car le polymorphisme des ALDH humaines est dans la plupart des cas associé à des altérations du métabolisme de drogues et à des pathologies plus ou moins sévères (Vasiliou *et al.*, 2000). Ces processus de détoxication impliquent différents types d'ALDH, comme par exemple les ALDH cytosoliques qui sont exprimées constitutivement (ALDH1) ou induites par l'agent cytotoxique phénobarbital (ALDH-PB), l'ALDH mitochondriale (ALDH2) et le groupe d'ALDH dont l'expression est induite spécifiquement par des agents cytotoxiques ou localisées dans les microsomes, la cornée, l'estomac, les poumons (ALDH3) (Lindahl, 1992). L'ALDH1 reconnaît plus spécifiquement les aldéhydes à longue chaîne carbonée ou aromatique (Klyosov, 1996 ; Dockham *et al.*, 1997) alors que le type de substrat préférentiel

pour l'ALDH-PB n'a pas été caractérisé (Kathmann *et al.*, 2000). L'ALDH2 est plutôt impliquée dans l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate durant le métabolisme de l'éthanol (Svanas et Weiner, 1985). Bien que le substrat physiologique des ALDH3 ne soit pas caractérisé, ce groupe d'enzymes est impliqué dans le métabolisme de médicaments tel que le cyclophosphamide (Sreerama et Sladek, 1997) ou dans l'oxydation des aldéhydes (LDA) générés par la peroxydation des lipides (Martini et Murray, 1996). C'est par exemple le cas de l'ALDH1A1, une isozyme clef qui permet de maintenir la clarté du cristallin chez l'homme, le rat et la souris, en catalysant l'oxydation du HNE qui contribue au développement de la cataracte (Choudhary *et al.*, 2005).

2.1.2. Implication dans le développement embryonnaire et la vision

Des études chez la souris sont en faveur d'une synthèse de RA impliquant deux étapes. La vitamine A ou rétinol est d'abord oxydée réversiblement en rétinaldéhyde par une ADH. Dans une deuxième étape, le rétinaldéhyde est oxydé de façon irréversible en RA par une aldéhyde déshydrogénase. Cette réaction est tissu spécifique chez l'embryon. Les ALDH contrôlent le taux de RA et jouent par conséquent un rôle clé dans le développement embryonnaire. Plusieurs ALDH sont impliquées dans le métabolisme du rétinal : la rétinal déshydrogénase 1 (RALDH1), la RALDH2 et la RALDH3. Chez la souris, l'inactivation du gène *raldh*1 stoppe la synthèse de RA seulement dans la rétine dorsale de l'embryon et n'a pas d'effets sur le développement. L'inactivation du gène *raldh*2 conduit à l'absence de synthèse de RA dans le mésoderme et est létale pour l'embryon (Duester *et al.*, 2003). Enfin, une troisième RALDH, l'ALDH6 cytosolique est décrite être essentielle au développement de l'épithélium neuro-sensoriel (Grun *et al.*, 2000).

2.1.3. Implication dans le métabolisme cellulaire

La bétaïne ALDH est impliquée dans la voie de biosynthèse alternative du GABA, lequel est un neurotransmetteur important dans le système nerveux central, impliqué dans le contrôle des systèmes GABAergique, dopaminergique et opioïde. Le principal chemin de la synthèse du GABA est la décarboxylation oxydative du L-glutamate par la L-glutamate décarboxylase (voir paragraphe 1.1.2.). Cependant, il peut être formé à partir de la putrescine par une déamination oxydative catalysée par la diamine oxydase pour donner le γ-aminobutyraldéhyde, qui est alors converti en GABA par l'ALDH. Un autre chemin impliqué

dans l'acétylation de la putrescine en N-acétylputrescine, est la conversion en N-acétyl-γ-aminobutyraldéhyde par la monoamine oxydase, converti ensuite en N-acétyl GABA par l'ALDH suivi d'une déacétylation pour former le GABA. La bétaïne ALDH transforme également la bétaïne aldéhyde en bétaïne. La bétaïne peut servir de donneur de méthyle dans la biosynthèse de la méthionine et peut également avoir une fonction de défense contre le stress osmotique (Pietruszko *et al.*, 1997 ; voir chapitre 1.1.3.).

La « fatty » ALDH (FALDH) est une ALDH impliquée dans la voie de dégradation des alcools gras lors de la lipolyse (Ichihara *et al.*, 1986). Son rôle physiologique est décrit comme étant essentiel car l'absence d'activité de cette enzyme due à des mutations ponctuelles au niveau du gène la codant, est liée à l'apparition de divers symptômes neurocutanés regroupés sous le nom de Syndrome de Sjörgren-Larsson (De Laurenzi *et al.*, 1996)

La MSDH est une enzyme qui catalyse la décarboxylation oxydative du malonate et du méthylmalonate-semialdéhyde en acétyl-CoA et en propionyl-CoA (PPCoA), respectivement. Cette activité est retrouvée dans les voies métaboliques de la valine et des pyrimidines. Une déficience en l'activité MSDH est associée à des retards de développement (Roe *et al.*, 1998). L'accumulation de β-alanine et d'acide 3-hydroxyisobutyrique a été observée chez un patient portant la déficience en la MSDH (Chambliss *et al.*, 2000).

2.1.4. Implication dans la production d'équivalents réducteurs NADPH nécessaires aux réactions biosynthétiques

La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (GAPN) appartient à la famille des ALDH non phosphorylantes. Elle catalyse l'oxydation irréversible du G3P en 3-phosphoglycérate. Toutes les GAPN caractérisées sont des oxydoréductases $NADP^+$-dépendantes à l'exception de celle de *Thermoproteus tenax* décrite NAD^+-dépendante (Habenicht *et al.*, 1997).

Chez les organismes photosynthétiques, GAPN intervient dans le mécanisme de transfert des équivalents réducteurs synthétisés dans le chloroplaste qui sont transférés dans le cytoplasme lors de la photosynthèse (Figure 15). Le cofacteur ainsi produit par l'oxydation du G3P est utilisé lors de réactions biosynthétiques (Kelly et Gibbs, 1973 ; Bamberger *et al.*, 1975 ; Casati *et al.*, 2000).

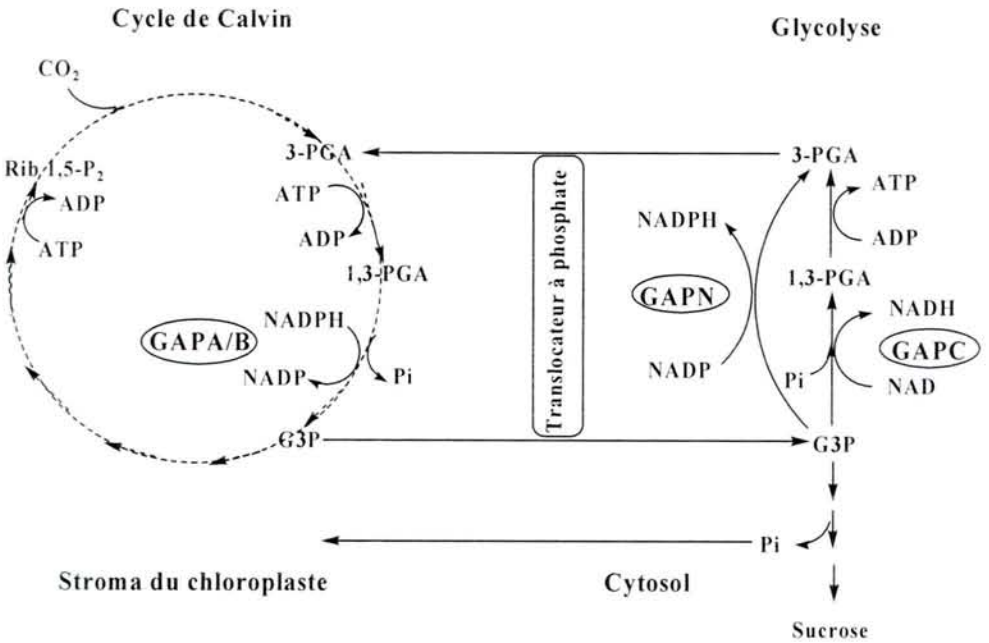


Figure 15: Compartimentation et fonction biologique de GAPN chez les plantes. (d'après Habenicht *et al.*, 1994).
La réaction catalysée par GAPN est irréversible. Pour les phosphorylantes GAPA/B et GAPC, la réaction catalysée est réversible mais seule la direction majoritaire *in vivo* est indiquée.
Abréviations : GAPA/B et GAPC, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase phosphorylante ; 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; 1,3-PGA, 1,3-diphosphoglycérate ; Rib-1,5-P_2, ribulose 1,5-bisphosphate.

Chez les organismes non photosynthétiques, elle est aussi présente pour produire le NADPH nécessaire au métabolisme cellulaire. Chez *Hevea brasiliensis*, elle produit le NADPH nécessaire à la synthèse du caoutchouc (Jacob et D'Auzac, 1972). Chez certaines souches de Streptocoques telles que *Streptococcus salivarius* ou *Streptococcus mutans*, en l'absence des enzymes impliquées dans la synthèse du NADPH au niveau de la partie oxydative de la voie d'Embden-Meyerhof, GAPN est impliquée dans la génération de NADPH nécessaire au métabolisme cellulaire (Boyd *et al.*, 1995).

2.1.5. Implication en tant que protéines de structures

Les ALDH ont un rôle structural et enzymatique dans le cristallin chez l'ensemble des vertébrés et des invertébrés. Elles représentent le constituant majeur des protéines solubles de la cornée. La quantité abondante de cristalline dans le cristallin modifie l'index de réfraction et permet d'être dans la gamme requise pour la transparence des tissus de l'œil (Piatigorsky *et al.*, 2000). L'η-cristalline, qui appartient à la classe des ALDH1, représente plus du quart de la quantité totale des protéines du cristallin chez les « elephant shrews », qui appartiennent à

un groupe d'insectivores diurnes ou partiellement diurnes (Bateman *et al.*, 2003). C'est une RALDH qui a acquis un rôle de protéine structurale dans la cornée pour agir comme filtre UV/bleu. L'Ω-cristalline est la protéine prédominante dans la cornée des céphalopodes. C'est une ALDH inactive, la C302 essentielle étant substituée par une arginine (Tomarev et Piatigorsky, 1996). C'est également le composant majeur des cellules de la cornée dans les coquilles Saint-Jacques. L'ALDH3 est la principale protéine soluble dans la cornée de mammifères (>40%). Les ALDH participent également au maintien de la balance rédox, et elles protègent les yeux contre les UVB grâce à l'oxydation d'aldéhydes générés par la peroxydation des lipides induits par la lumière (Uma *et al.*, 1996). Les ALDH doivent également jouer un rôle dans la prévention contre les dommages oxydatifs des autres protéines du cytoplasme.

Chez certaines bactéries sont trouvés des « clusters » de gènes incluant des gènes codant une ALDH appartenant à la famille des β- et γ-cristalline, ce qui au niveau de l'évolution a peut-être un lien au niveau de la réponse au stress (Clout *et al.*, 2001 ; Karaolis *et al.*, 1998).

2.2. Structure des aldéhyde déshydrogénases à cofacteur $NAD(P)^+$ non phosphorylantes

2.2.1. Structure globale

Plusieurs ALDH, non phosphorylantes et non CoA dépendantes, ont été cristallisées (Liu *et al.*, 1997 ; Steinmetz *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1998 ; Moore *et al.*, 1998 ; Cobessi *et al.*, 1999 ; Lamb et Newcomer, 1999 ; Ni *et al.*, 1999 ; Ahvazi *et al.*, 2000 ; Cobessi *et al.*, 2000 ; Pohl *et al.*, 2002 ; Bateman *et al.*, 2003 ; Gruez *et al.*, 2004). L'analyse des structures tridimensionnelles a révélé d'une part, un mode de repliement similaire des sous-unités, avec des chaînes principales quasiment superposables, et d'autre part, des différences significatives avec les ALDH phosphorylantes au niveau du mode de fixation du cofacteur, de la topologie du domaine catalytique et de l'association des sous-unités. Les ALDH sont isolées soit sous forme homodimérique, soit sous forme homotétramérique structurée en dimère de dimères (Rodriguez-Zavala et Weiner, 2002). Récemment, la structure tridimensionnelle d'une enzyme bifonctionnelle de *Pseudomonas sp.* CF600, la 4-hydroxy-2-cétovalérate aldolase/acétaldéhyde déshydrogénase, a été décrite (Manjasetty *et al.*, 2003). Cependant, d'un point de vue structural, le domaine portant l'activité déshydrogénase CoA-dépendante n'appartient pas à la famille des ALDH non-phosphorylantes mais présente plutôt une

topologie de repliement similaire à celle des GAPDH phosphorylantes. A ce jour, aucune structure d'ALDH, non-phosphorylante et CoA-dépendante, n'est disponible.

2.2.2. Structure du monomère

Chaque monomère est constitué de trois domaines, le domaine du cofacteur, le domaine catalytique et le domaine d'oligomérisation.

2.2.2.1. Domaine du cofacteur

Le domaine du cofacteur adopte une forme non canonique du repliement de Rossmann, qui présente un motif caractéristique des sites de fixation de cofacteur des déshydrogénases (Rossmann *et al.*, 1974). En effet, le motif β/α/β n'est constitué que de 5 brins β parallèles connectés par 4 hélices α au lieu des 6 brins retrouvés dans les structures des ALDH phosphorylantes, et la signature caractéristique GXGXXG n'est pas retrouvée. De plus, l'inspection de la première structure cristalline d'une ALDH non-phosphorylante avait mis en évidence un nouveau mode de fixation du cofacteur à ce domaine (Liu *et al.*, 1997). Les structures cristallines de plusieurs ALDH non-phosphorylantes ont montré que ce mode de liaison particulier, et le faible nombre d'interactions établies entre le cofacteur $NAD(P)^+$ et le repliement de Rossmann par rapport aux autres déshydrogénases, avaient pour conséquence une grande flexibilité conformationnelle de la partie nicotinamide du cofacteur avec la mise en évidence de deux conformations distinctes qualifiées de « transfert d'hydrure » et d'« hydrolyse ». Cette flexibilité est d'ailleurs supposée être indispensable à l'acte catalytique car la conformation requise pour l'étape d'acylation est incompatible avec une désacylation efficace (Perez-Miller et Hurley, 2003).

2.2.2.2. Domaine catalytique

Le domaine catalytique est lié par une boucle au domaine du cofacteur et présente un repliement de type αβ avec 6 brins β parallèles. La C302 invariante, essentielle au mécanisme catalytique, est localisée dans une boucle. La spécificité de substrat des ALDH résulte principalement de la taille et de la forme du site actif (Moore *et al.*, 1998) et de la présence ou non de résidus polaires ou hydrophobes (Cobessi *et al.*, 2000). Par exemple, l'ALDH cytosolique de foie de mouton (E.C.1.2.1.3) possède un site de spécificité pour le

rétinaldéhyde ayant la forme d'un tunnel dont le volume accessible au solvant est 7 fois plus important que celui de l'ALDH mitochondriale de bœuf (E.C.1.2.1.3) qui a un site de spécificité pour l'acétaldéhyde (Moore *et al.*, 1998). Quant au site de reconnaissance de GAPN, il possède trois arginines impliquées dans la fixation du substrat G3P (Marchal et Branlant, 2002).

2.2.2.3. Domaine d'oligomérisation

Le domaine d'oligomérisation est un feuillet β constitué de trois brins antiparallèles qui permet la formation d'un dimère par interaction du domaine d'oligomérisation d'une sous-unité avec le domaine catalytique d'une deuxième sous-unité, puis la formation d'un dimère de dimères par l'interaction des domaines d'oligomérisation des quatre sous-unités (Figure 16).

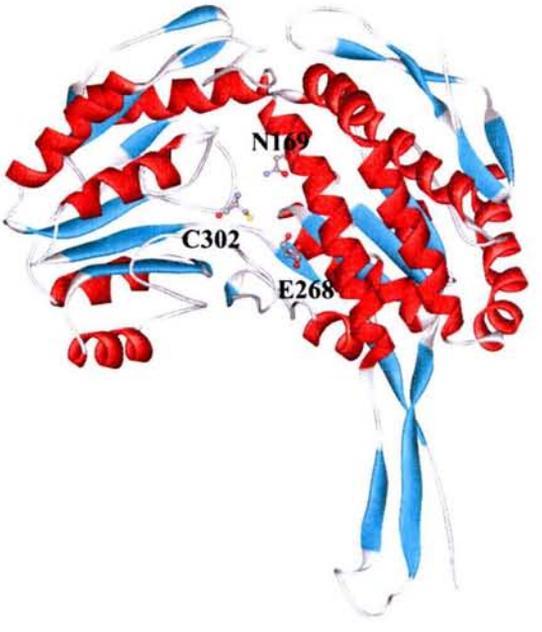


Figure 16 : Structure du monomère de GAPN (d'après Cobessi *et al.*, 1999).
Les acides aminés C302, E268, N169, essentiels à la catalyse, sont indiqués.

2.2.3. Organisation quaternaire

L'organisation des sous-unités au sein des ALDH dimériques et tétramériques diffère très peu. L'association en dimères est assurée par l'établissement de liaisons hydrogènes entre le dernier brin β du domaine d'oligomérisation d'une sous-unité et le dernier brin β du domaine catalytique de la sous-unité adjacente conduisant à la formation d'un feuillet constitué de 10 brins β. La cohésion du tétramère est assurée par les interactions dimère-dimère *via* l'établissement de liaisons hydrogènes entre les domaines d'oligomérisation des quatre sous-unités et a pour conséquence la formation de deux feuillets β de 20 brins chacun (Figure 17).

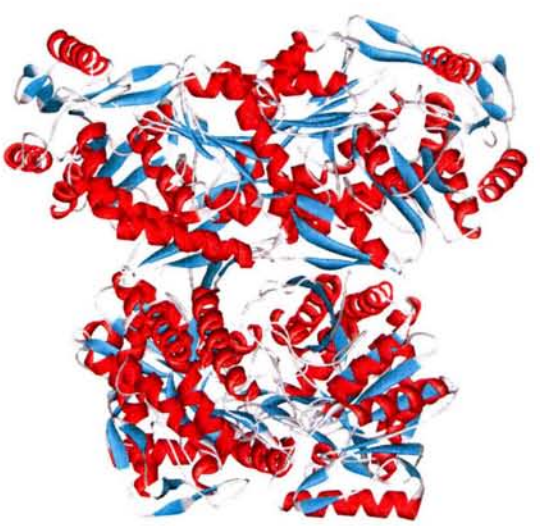


Figure 17: Structure du tétramère de la GAPN de *S. mutans* sous forme apoenzyme (d'après Cobessi *et al.*, 1999).
Seule la chaîne principale est représentée sur cette figure.

Plusieurs facteurs structuraux peuvent être impliqués pour expliquer l'existence chez les ALDH de deux états oligomériques fonctionnels. Ainsi, il a été décrit qu'une orientation différente du domaine d'oligomérisation ainsi que la présence d'une boucle supplémentaire du côté N-terminal, seraient responsables de l'absence d'état tétramérique pour l'ALDH dimérique de rat (Liu *et al.*, 1997), alors que chez *Vibrio Harveyi*, la présence d'une grande boucle au niveau de la partie C-terminale empêcherait la formation du tétramère (Ahvazi *et al.*, 2000). Il a également été proposé que l'interaction entre le résidu Arg84 et le résidu Ser500 d'une sous-unité n'appartenant pas au même dimère serait importante pour le maintien de la structure tétramérique (Steinmetz *et al.*, 1997). Une étude récente suggère plutôt que

l'assemblage des sous-unités en tétramère est favorisé par le caractère hydrophobe plus marqué des surfaces présentes au niveau de l'interface dimère-dimère dans les ALDH tétramériques, par rapport aux régions équivalentes dans les ALDH dimériques (Rodriguez-Zavala et Weiner, 2002).

2.3. Mécanisme enzymatique des ALDH non phosphorylantes

Les ALDH non-phosphorylantes opèrent par catalyse nucléophile covalente impliquant l'attaque d'une cystéine essentielle du site actif sur l'aldéhyde. Un mécanisme cinétique de type séquentiel ordonné a été mis en évidence et semble être commun à toutes les ALDH de mammifères ainsi qu'aux GAPN de plantes et de *S. mutans* (Marchal, 2001 ; Marchal *et al.*, 2001). Le cofacteur oxydé se fixe dans le site actif suivi du substrat aldéhydique. Après les différentes étapes de la catalyse chimique, le premier produit libéré est l'acide carboxylique, suivi du cofacteur réduit. L'acide formé se dissociant sous forme carboxylate, la réaction peut être considérée comme irréversible. Ce mécanisme procède en deux étapes : l'acylation et la désacylation.

L'acylation consiste en l'attaque de la C302 sur la fonction aldéhyde du substrat, suivie d'une étape d'oxydoréduction permettant le transfert d'hydrure du C_1 de l'intermédiaire covalent sp_3 thiohémiacétal formé vers le C_4 du nicotinamide du cofacteur oxydé. Les ALDH étant des déshydrogénases de classe A (Michels *et al.*, 1994), ce transfert s'effectue vers la face ré du cycle pyridinium. Ce processus d'oxydo-réduction conduit à la formation de l'intermédiaire thioacylenzyme et du cofacteur réduit.

La désacylation consiste en l'attaque d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire thioacylenzyme, au relargage de l'acide carboxylique correspondant et du cofacteur réduit ainsi que d'éventuelles étapes d'isomérisation.

L'étape limitante de la catalyse serait associée à la désacylation pour les ALDH cytosoliques (MacGibbon *et al.*, 1977), mitochondriales (Feldman et Weiner, 1972 ; Weiner *et al.*, 1976) et pour la GAPN de *S. mutans* (Marchal *et al.*, 2000). Par contre, elle semblerait être associée au transfert de l'hydrure pour l'ALDH dimérique de rat (Mann et Weiner, 1999).

En ce qui concerne les ALDH CoA dépendantes, un mécanisme cinétique déterminé à l'état stationnaire a été décrit pour l'acétaldéhyde déshydrogénase (tétramérique) et la SSADH (dimérique) comme étant un mécanisme bi uni uni uni ping pong (Shone et Fromm,

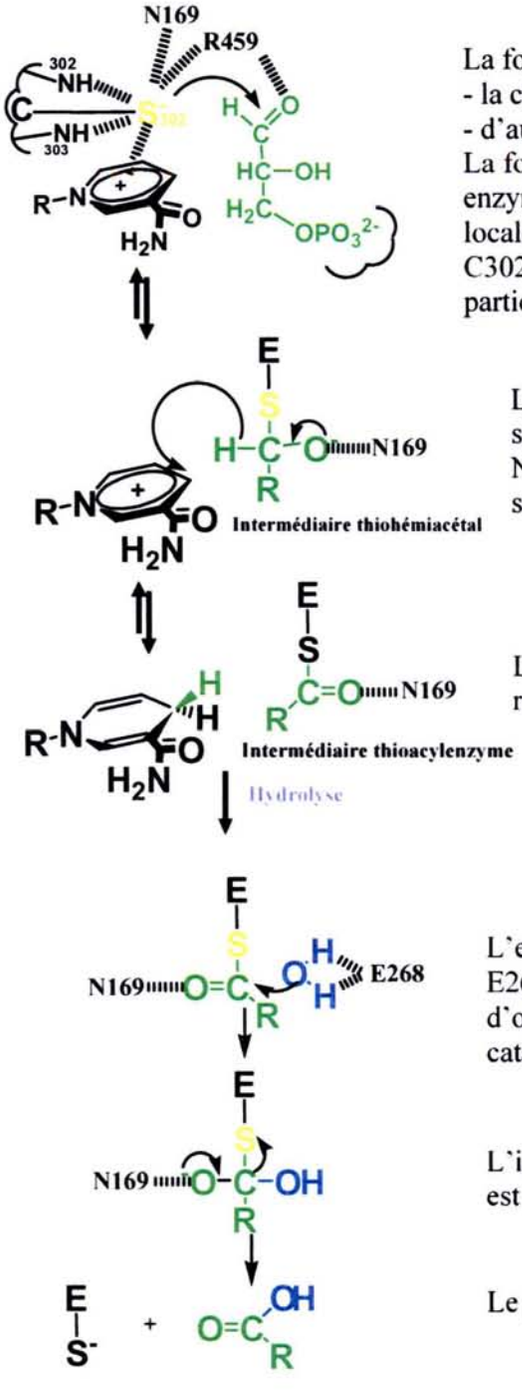
1981 ; Söhling et Gottschalk, 1993). Ce mécanisme implique tout d'abord la fixation du cofacteur $NAD(P)^+$ (avec une préincubation préalable avec le cofacteur notamment pour l'acétaldéhyde déshydrogénase qui possède un temps de latence levé par cette préincubation), suivie de la fixation du substrat aldéhydique, du relargage du cofacteur réduit puis de l'attaque du CoA et du relargage du produit de la réaction.

2.3.1. Mécanisme catalytique détaillé : cas de la GAPN de *S. mutans*

Des études menées au laboratoire (Marchal et Branlant, 1999 ; Marchal *et al.*, 2000) et confortées par la détermination des structures tridimensionnelles de GAPN en absence de cofacteur (forme « Apo1 » avec 1 sulfate SO_4^{2-}(a)), en présence de cofacteur (forme Holo), d'une GAPN inactive avec cofacteur et substrat ainsi que d'une forme mimant vraisemblablement l'état de transition tétraédrique (forme « Apo2 » avec une seconde molécule de sulfate SO_4^{2-}(b)) (Cobessi *et al.*, 1999 ; Cobessi *et al.*, 2000), ont permis la caractérisation de facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans le mécanisme catalytique de la GAPN de *S. mutans*. Ceci a conduit à la proposition d'un scénario original pour le mécanisme catalytique, qui est illustré dans la figure suivante (Figure 18).

L'activation de la C302 résulte d'un réarrangement conformationnel du site actif consécutif à la fixation du cofacteur $NADP^+$ avec une réorientation des chaînes latérales des résidus C302, E268 et R459 (par rupture du pont ionique entre les résidus E268 et R459). La vitesse de cette réorganisation est fortement augmentée d'un facteur de 10^6 par la fixation du G3P sur le complexe binaire enzyme-cofacteur. Ceci permet l'augmentation de l'accessibilité de la C302 et une diminution de son pK_{app} ce qui assure une réactivité optimale à pH 7. La diminution du pK_{app} de la C302 de 8,5 dans la forme apoenzyme à 6,2 dans la forme holoenzyme résulte de la combinaison de plusieurs effets additifs locaux, dont la charge positive du cycle pyridinium du $NADP^+$, la chaîne latérale des résidus N169 et R459, ainsi que les groupements NH peptidiques des résidus C302 et T303. L'attaque nucléophile du thiolate sur l'atome C_1 du G3P conduit à la formation de l'intermédiaire thiohémiacétal qui est stabilisé par la présence d'un site de reconnaissance oxyanion, composé de la chaîne latérale du N169 et des groupements NH peptidiques des résidus 302 et 303 (Cobessi *et al.*, 2000). Ainsi le transfert d'hydrure sur le C_4 du pyridinium se fait sans l'assistance d'une catalyse basique. L'intermédiaire thioacylenzyme est vraisemblablement stabilisé par le site de reconnaissance de l'oxyanion. L'efficacité de l'étape de désacylation est assurée par le résidu E268 dont le rôle est d'activer et d'orienter la molécule d'eau (Marchal *et al.*, 2000)

avec un rôle de catalyseur basique à des valeurs de pH où il est déprotoné (pH > 7,6). Il a également été montré le rôle discriminant du résidu E268 vis-à-vis d'autres nucléophiles efficaces comme l'hydrazine (NH_2NH_2) ou l'hydroxylamine (NH_2OH) (Marchal *et al.*, 2001).



La forme thiolate de la cystéine est stabilisée par :
- la charge positive du cycle pyridinium du NADP
- d'autres éléments structuraux (N169 et R459)

La formation de complexes efficaces enzyme-NADP et enzyme-NADP-G3P est assurée par une réorganisation locale du site actif incluant une réorientation de la C302 et du E268 et un positionnement adéquat de la partie NMN du cofacteur pour le transfert d'hydrure.

L'intermédiaire hémithioacétal est stabilisé par le site oxyanion composé notamment du résidu N169, permettant ainsi le transfert d'hydrure sans l'assistance d'un catalyseur basique.

L'intermédiaire thioacylenzyme est stabilisé par le résidu N169.

L'efficacité de l'hydrolyse est assurée par le résidu E268 dont le rôle principal est de stabiliser et d'orienter la molécule d'eau avec en plus un rôle catalyseur basique à des pH supérieurs à 7,5.

L'intermédiaire réactionnel ou l'état de transition est stabilisé par le résidu N169.

Le produit oxydé est relargué puis le cofacteur réduit.

Figure 18: Représentation schématique du mécanisme catalytique de la GAPN de *S. mutans* (d'après Marchal, 2001).

2.3.2. Spécificité de substrat, reconnaissance du phosphate du glycéraldéhyde 3-phosphate

L'efficacité de la catalyse dépend de la reconnaissance et du positionnement du substrat dans le site actif. Pour GAPN de *S. mutans*, les résidus arginines 124, 301 et 459, retrouvés invariants dans toutes les séquences de GAPN, interviennent dans la reconnaissance du substrat G3P. La R124 est impliquée essentiellement dans la fixation du substrat G3P par interaction avec le phosphate en C_3. Par contre, les résidus R301 et R459 stabilisent la fixation du G3P et favorisent son positionnement adéquat au sein du complexe ternaire pour permettre une attaque efficace du thiolate de la C302 sur la fonction aldéhyde en C_1 (Marchal et Branlant, 2002).

2.4. Propriétés cinétiques particulières de certaines ALDH

2.4.1. Réactivité de demi-site

2.4.1.1. Effet de l'ajout de cations divalents

Différentes études ont permis de montrer que des cations divalents comme le Mg^{2+}, le Ca^{2+} ou le Mn^{2+} sont capables de modifier les propriétés catalytiques des ALDH tétramériques isolées de mammifères, en augmentant l'activité spécifique de l'enzyme mitochondriale (classe 2) et en inhibant celle de la forme cytosolique (classe 1) (Takahashi et Weiner, 1980 ; Dickinson et Hart, 1982). De plus, il a été montré à l'état pré-stationnaire que seules deux moles de NADH sont produites par mole d'enzyme, ce qui suggérait une réactivité de demi-site. L'activité spécifique de l'ALDH mitochondriale de foie de cheval étant augmentée d'un facteur 2 par l'addition de 0,5 mM de Mg^{2+}, Takahashi et Weiner (1980) ont entrepris de mieux caractériser ce mode d'activation en combinant des approches cinétiques (états stationnaire et pré-stationnaire) et des expériences de sédimentation à l'équilibre. Les résultats obtenus montrent que le saut de production de NADH dans l'étape d'acylation double en présence de Mg^{2+}. En parallèle, la détermination du poids moléculaire de l'ALDH par détermination de la constante d'équilibre de sédimentation montre qu'il diminue de 260 kDa en absence de Mg^{2+} à 130 kDa en présence de Mg^{2+}. Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de cations divalents l'enzyme est sous forme tétramérique et présente une réactivité de demi-site, alors que l'ajout de Mg^{2+} entraîne une dissociation de l'enzyme en une paire de dimères et l'obtention d'une réactivité totale des sites.

2.4.1.2. Bases moléculaires et structurales

A l'origine, il avait été proposé que les propriétés de réactivité de demi-site des ALDH de classe 2 étaient la conséquence de la non-saturation des sites de fixation du cofacteur, avec seulement deux sites occupés par tétramère. De plus, leur description en tant qu'exemple extrême de coopérativité négative impliquait l'existence de mécanismes de communication inter-sous-unités (Ambroziak *et al.*, 1989). Cependant, aucune interprétation moléculaire et/ou structurale n'avait pu être avancée sur la base de l'inspection des structures cristallines d'ALDH2 sous forme holoenzyme disponibles. En effet, une occupation totale des sites de fixation du cofacteur était observée et aucune modification significative du positionnement des chaînes principales et latérales n'était observée entre les formes apo et holo. Par contre, des études récentes menées sur un variant protéique oriental quasiment inactif de cette ALDH, l'ALDH2*2, ont permis de mieux appréhender ce phénomène de réactivité de demi-site. La substitution E487K identifiée dans ce variant conduit à une diminution du k_{cat} d'un facteur 10 par rapport à l'ALDH2 de type sauvage et à une augmentation du K_M pour le NAD^+ d'un facteur 200 ainsi qu'à une modification de l'étape limitante de la réaction qui devient associée à l'acylation (Farres *et al.*, 1994). De plus, la même équipe avait montré que dans des formes hétérotétramériques ALDH2/ALDH2*2, les sous-unités de type oriental étaient dominantes par rapport à celles de type sauvage, la conséquence étant une inactivation des sous-unités issues de l'ALDH2 (Wang *et al.*, 1996). La caractérisation des propriétés enzymatiques des variants chimériques générés à partir de toutes les combinaisons possibles entre sous-unités actives et inactives a permis de proposer un modèle de réactivité de demi-site pour l'ALDH2 de type sauvage dans lequel seule une sous-unité est active par dimère (Zhou et Weiner, 2000). Très récemment, la comparaison des structures cristallines de l'ALDH2 et de l'ALDH2*2 a permis d'identifier un certain nombre de facteurs structuraux potentiellement impliqués dans la communication inter-sous-unités au sein d'un même dimère et par conséquent dans le mécanisme de « dominance ». Il a été montré que la substitution E487K conduit à la perte des ponts salins intra-monomère E487/R264 et inter-monomère E497/R475 et donc à une déstabilisation de l'interface entre les monomères d'un même dimère. Ceci a pour principales conséquences 1) un basculement du résidu R264 qui s'éloigne de l'interface du dimère et n'est plus capable d'établir de liaisons hydrogènes avec le groupement carbonyle du résidu 469 localisé dans la boucle 463-478 du monomère adjacent, 2) la perte de toute interaction inter-monomère favorable impliquant la position 487, 3) l'absence de stabilisation de l'hélice αG impliquée dans le sous-site de reconnaissance de l'adénosine ainsi qu'une

SCD - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY

modification du positionnement du brin β11 sous-tendant le résidu catalytique E268 et, 4) la désorganisation de la boucle 463-478 du monomère adjacent (Larson *et al.*, 2005). Bien que cette boucle n'interagisse pas directement avec le cofacteur, sa flexibilité va conduire à une série de mouvements de chaînes principales et latérales qui vont se propager jusqu'au site de fixation du cofacteur. Les modifications vont affecter le positionnement du résidu E399, dont le rôle dans la stabilisation du ribose adjacent au nicotinamide a été montré (Ni *et al.*, 1999), et du résidu F401 impliqué dans la stabilisation du nicotinamide (Perez-Miller et Hurley, 2003). Ces différentes observations ont conduit les auteurs à proposer que le positionnement désordonné de l'hélice αG sous-tendant le résidu R264, serait majoritairement responsable de l'augmentation de 200 fois du K_M du NAD^+ dans le variant ALDH2*2 alors que la réorientation de la chaîne latérale du résidu E399 pourrait contribuer à la diminution du k_{cat} d'un facteur 10. Cependant, l'aspect le plus novateur de cette étude est sans doute la mise en évidence du rôle central de la boucle 463-478 dans les phénomènes de communication inter-sous-unités.

2.4.2. Phénomènes d'activation par préincubation avec le cofacteur et/ou l'ajout de cations

2.4.2.1. Influence sur le phénomène de latence

L'ALDH cytosolique de *Saccharomyces cerevisiae* a été isolée et purifiée sous forme homotétramérique. Les tests enzymatiques réalisés à l'état stationnaire révèlent l'existence d'une phase de latence de l'ordre d'une minute (Dickinson, 1996). Un tel phénomène avait déjà été décrit pour l'ALDH mitochondriale de mouton (Hart et Dickinson, 1978) et l'ALDH mitochondriale de levure (Dickinson et Haywood, 1987). Pour l'ALDH de mouton la durée de cette phase de latence est corrélée à la concentration en enzyme ce qui suggérait une dissociation du tétramère en une forme dimérique plus active (Allanson et Dickinson, 1984). Par contre, cela n'est pas le cas pour les deux formes de l'ALDH de levure qui présentent un mode d'activation similaire mais pas identique. En effet, cette phase de latence peut être levée par une préincubation de l'enzyme mitochondriale avec du KCl, l'ion K^+ étant responsable de cette activation (Dickinson et Haywood, 1987). Des études plus détaillées sur la forme cytosolique de cette ALDH ont permis de montrer que la préincubation de l'enzyme avec du $NADP^+$, en présence ou en absence de Mg^{2+}, permettait de lever la phase de latence. De plus, la liaison du cofacteur à la forme apoenzyme provoque un changement conformationnel lent pouvant être suivi par l'extinction de l'émission de fluorescence des Trp, et qui semble

expliquer la phase de latence observée durant le test enzymatique réalisé à l'état stationnaire. Ce processus est fortement accéléré par l'ajout de Mg^{2+}, qui augmente l'affinité de l'enzyme pour le $NADP^+$ d'un facteur 100 (Dickinson, 1996). Des études complémentaires ont permis de montrer que ce processus d'activation incluait deux étapes et qu'il n'impliquait pas de phénomènes de dissociation/association de l'enzyme. Par contre, l'enzyme serait sous une forme plus compacte après activation (Dickinson, 2003).

2.4.2.2. Influence sur l'activité estérasique

Parallèlement à leur activité déshydrogénase et de part la présence d'une cystéine très réactive, les ALDH peuvent jouer le rôle d'estérase. Elles sont ainsi capables d'hydrolyser un ester comme le p-nitrophénylacétate (Feldman et Weiner, 1972). L'influence de divers effecteurs (NAD^+, NADH, Mg^{2+}) sur l'activité estérasique des ALDH a été examinée. L'étude la plus complète a été réalisée sur l'ALDH de foie de cheval. Les résultats obtenus ont mis en évidence un effet activateur du NAD^+(H) et l'absence de tout effet du Mg^{2+} contrairement à ce qui avait été montré pour l'activité déshydrogénase (Takahashi et Weiner, 1980 ; Takahashi et Weiner, 1981). A l'état stationnaire, l'activité estérase est augmentée d'un facteur 2 après une préincubation avec le NAD^+ ou le NADH. A l'état préstationnaire, des expériences de cinétiques rapides montrent que le saut de production passe de deux à quatre moles de p-nitrophénol par tétramère d'enzyme après une préincubation d'une minute avec le NAD^+. L'augmentation de la vitesse globale de la réaction d'un facteur 2 en présence de NAD^+ serait donc la conséquence d'une augmentation de la vitesse associée à l'étape d'acylation. Par contre, le cofacteur n'aurait aucune influence sur l'étape de désacylation. Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer que la présence du cofacteur favoriserait l'attaque de la C302 essentielle sur le groupement carbonyle du substrat en augmentant son caractère nucléophile (Takahashi et Weiner, 1981).

3. La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase

La MSDH est une enzyme qui catalyse la décarboxylation oxydative du malonate (MSA) et du méthylmalonate-semialdéhyde (MMSA) en acétyl-CoA et en propionyl-CoA (PPCoA), respectivement (Figure 19).

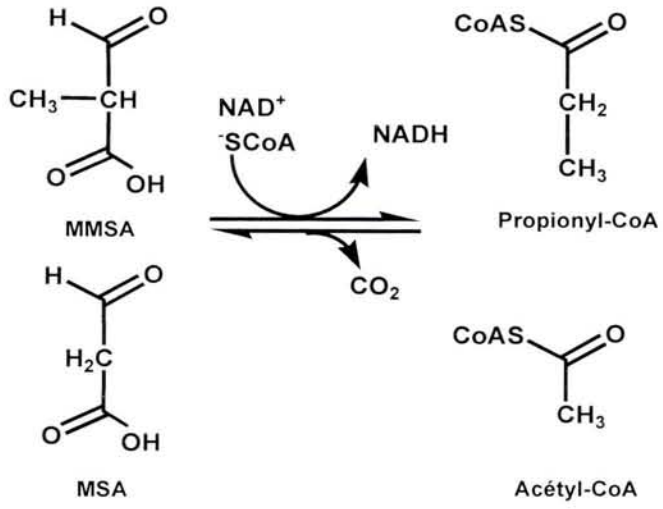


Figure 19: Représentation schématique des réactions catalysées par la MSDH.

De part les alignements de séquence et le pourcentage d'identité de 30 % avec les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes, elle appartient à la famille structurale des ALDH non phosphorylantes. Les alignements de séquence montrent que la MSDH possède les acides aminés essentiels pour la catalyse tels que la C302 et la N169 (Figure 20). Il faut noter que le E268 essentiel au positionnement et à l'activation de la molécule d'eau chez les ALDH non phosphorylantes non CoA dépendantes est absent chez les MSDH. La particularité de cette enzyme est d'utiliser le CoA comme nucléophile et d'effectuer une transthioestérification de l'intermédiaire thioacylenzyme plutôt que d'utiliser une molécule d'eau et d'effectuer une hydrolyse pour l'étape de désacylation. Sa deuxième spécificité est d'être la seule ALDH non-phosphorylante connue à ce jour capable d'effectuer une décarboxylation enzyme-dépendante du substrat. Dans la suite de cet exposé, est présentée l'implication de la MSDH dans le métabolisme.



Figure 20 : Alignement partiel des séquences de MSDH pour les régions contenant les résidus importants pour la catalyse ainsi que les résidus arginines et comparaison avec d'autres ALDH.

Les séquences utilisées pour effectuer cet alignement sont issues des banques de données suivantes : EMBL, GenBank, SwissProt, Pir. L'alignement a été réalisé par le logiciel "ClustalW Multiple Alignment" (Thompson *et al.*, 1994) de BioEdit version 5.0.9. La numérotation indiquée pour l'alignement est celle proposée par Wang et Weiner (1995). Les résidus catalytiques C302 et N169 sont indiqués par une boîte noire. Les résidus R124 et R301 impliqués dans la fixation du substrat chez les GAPN sont également dans une boîte noire. Le triangle indique l'absence du résidu E268 chez les MSDH. Les séquences des MSDH correspondent aux enzymes où une activité catalytique a été décrite. La séquence consensus des GAPN non-phophorylantes a été déterminée à partir de l'alignement des séquences de 19 GAPN ; alors que celle des ALDH non-phosphorylantes possédant un résidu glutamate en position 268 a été déterminée à partir de l'alignement des séquences de 40 enzymes.

3.1. Métabolisme des acides aminés branchés

Les acides aminés branchés tels que la valine, l'isoleucine et la leucine sont trois des neuf acides aminés essentiels chez les mammifères. Chez les bactéries comme chez les eucaryotes, le catabolisme de ces acides aminés branchés se décompose en une partie proximale commune à ces trois acides aminés et en une partie distale spécifique de chaque acide aminé (Massey *et al.*, 1976 ; Harper *et al.*, 1984 ; Figure 21). Le tronc commun est composé d'une transaminase spécifique de chaque acide aminé qui catalyse une première réaction de transamination réversible conduisant au 2-cétoacide correspondant et d'un complexe enzymatique cétoacide déshydrogénase qui réalise une décarboxylation oxydative irréversible des intermédiaires 2-céto-isovalérate, 2-céto-3-méthylvalérate et 2-céto-isocaproate.

La partie distale du métabolisme de la valine, dans laquelle intervient la MSDH, passe entre autre par les intermédiaires 3-hydroxyisobutyrate et MMSA pour aboutir à la formation de succinyl-CoA qui est un intermédiaire du cycle de Krebs (Figure 21).

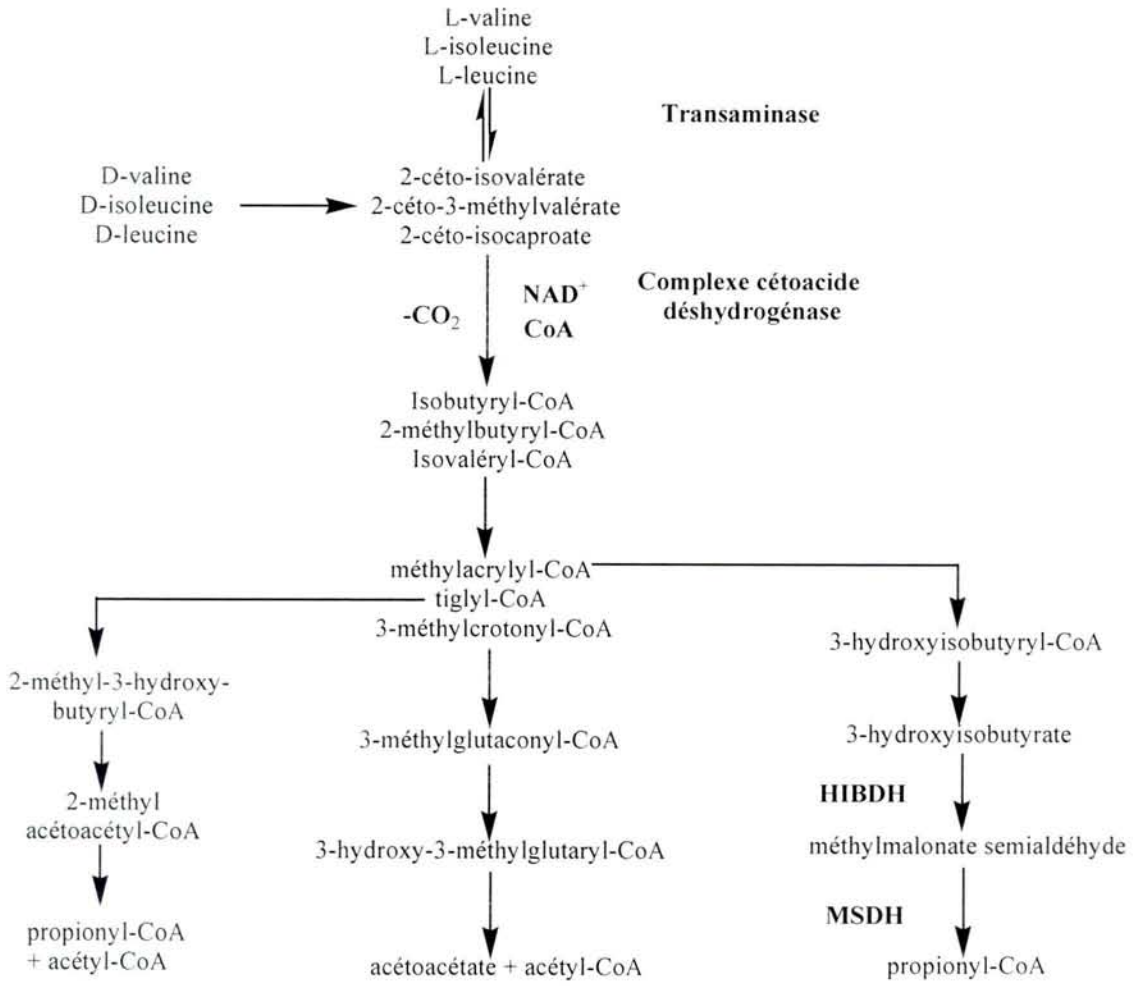


Figure 21: Chemin du catabolisme des acides aminés branchés chez les bactéries (d'après Massey *et al.*, 1976)
Abréviations : HIBDH, hydroxyisobutyrate déshydrogénase ; MSDH, méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase.

3.2. Rôle de la MSDH

Le métabolisme du MMSA a longtemps été controversé. La synthèse du succinyl-CoA dépend de la méthylmalonyl-CoA mutase. Plusieurs voies possibles ont été suggérées pour la biosynthèse du méthylmalonyl-CoA à partir du MMSA (Wolf et Akers, 1986). Une première hypothèse était la décarboxylation, enzymatique ou non, du MMSA en propionate suivie de son estérification par le CoA puis de la carboxylation du PPCoA par la propionyl-CoA carboxylase. Une deuxième hypothèse était la transformation directe du MMSA en PPCoA, puis la carboxylation du PPCoA en MMSA-CoA. Une troisième hypothèse suggérait l'oxydation directe du MMSA en MMSA-CoA.

La mise en évidence de la MSDH CoA-dépendante chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sokatch *et al.*, 1968), est en faveur de la seconde hypothèse. En effet, l'analyse des produits de la réaction catalysée par la MSDH a mis en évidence la production de PPCoA à partir du MMSA. D'une part, le marquage au ^{14}C sur la fonction carboxylique du MMSA a permis de suivre l'apparition de $^{14}CO_2$ concomitant à la réaction enzymatique par la MSDH de *P. aeruginosa* (Bannerjee *et al.*, 1970). D'autre part, le fait qu'aucune trace de MMSA-CoA n'ait été détectée par les techniques de chromatographie utilisées, suggère que le PPCoA serait le seul produit de la réaction catalysée par la MSDH de rat (Goodwin *et al.*, 1989). Ceci est en faveur d'une β-décarboxylation du MMSA lors de la réaction catalysée par la MSDH.

La participation de la MSDH dans le catabolisme des acides aminés branchés a aussi été mise en évidence chez plusieurs organismes.

3.2.1. Chez les bactéries et les *archaea*

Le gène codant une MSDH, caractérisée biochimiquement ou non, a été identifié chez un certain nombre de bactéries, dont le génome a été totalement séquencé, et chez un *archaeon Sulfolobus solfataricus* (She *et al.*, 2001). Seuls *P. aeruginosa* et *Streptomyces coelicolor* ont fait l'objet d'études sur le rôle de la MSDH au niveau métabolique.

Chez *Pseudomonas putida*, la synthèse de quatre des six enzymes dégradant la valine en PPCoA, dont la MSDH, est activée par la présence de valine dans le milieu de culture (Marshall et Sokatch, 1972), ce qui suggère la participation de cette enzyme dans le catabolisme de la valine. Cette hypothèse a été confirmée chez *P. aeruginosa* où l'inactivation de chacun des gènes de l'opéron *mmsAB*, incluant celui de la 3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase et celui de la MSDH (*msdA*), entraîne une croissance lente de la bactérie sur un milieu minimum contenant de la valine (Steele *et al.*, 1992). Chez *S. coelicolor*, le rôle de la MSDH dans le catabolisme de la valine a été également mis en évidence (Zhang *et al.*, 1996). En effet, l'inactivation du gène *msdA* codant la MSDH chez *S. coelicolor* par l'introduction d'un gène de résistance à l'hygromycine inhibe la croissance des bactéries sur un milieu contenant de la valine comme seule source carbonée. La transformation de ces bactéries par un plasmide d'expression contenant l'ORF du gène *msdA* suffit à rétablir une croissance bactérienne sur un milieu minimum contenant de la valine. Le même phénomène est observé lorsque des métabolites tels que le propionate, intervenant en aval de la réaction catalysée par la MSDH dans la voie du catabolisme de la valine, sont ajoutés dans le milieu de culture.

Chez *Bacillus subtilis*, le gène codant la MSDH a été retrouvé dans l'opéron qui code les différentes enzymes intervenant dans la voie du catabolisme du myo-inositol (Yoshida *et al.*, 1997). La MSDH pourrait catalyser la transformation du MSA en acétyl-CoA dans cette bactérie.

Chez *Bulkholderia cepacia* R34, le gène *dntE* situé dans un opéron code un homologue de la MSDH. Ici, la MSDH interviendrait dans la voie de dégradation du 2,4,5-trihydroxytoluène dans le métabolisme du 2,4-dinitrotoluène (2,4-DNT) (Johnson *et al.*, 2002) au niveau de la transformation du méthylmalonate semialdéhyde en propionyl-CoA. La souche R34 se développe en utilisant comme seule source de carbone et d'azote le 2,4-DNT.

3.2.2. Chez les mammifères

L'étude de la partie distale du catabolisme de la valine a permis la caractérisation et la purification de la MSDH puis le clonage du gène *msdA* de rat (Goodwin *et al.*, 1989 ; Kedishvili *et al.*, 1992). Cette enzyme serait relativement abondante dans le foie, et localisée dans la fraction mitochondriale des cellules hépatiques. Chez le rat, le MSA est également substrat de la MSDH et est transformé en acétyl-CoA, ce qui suggère que cette enzyme pourrait également intervenir dans le catabolisme de la cytidine (Goodwin *et al.*, 1989).

La stéréospécificité de la MSDH pour le MMSA n'est pas connue. Or, les voies de dégradation de la valine et de la thymine conduisent respectivement à un stéréoisomère S et R du MMSA. Chez l'homme, le fait que des métabolites produits par le catabolisme de la thymine et de la valine soient accumulés chez des patients atteints de déficience en MSDH suggère l'implication de la MSDH dans la voie de dégradation de la thymine (Roe *et al.*, 1998). En conséquence, les voies du catabolisme de la valine et de la thymine pourraient se croiser au niveau du MMSA. Chez les mammifères, la MSDH participerait à la fois au catabolisme de la valine et des pyrimidines (Figure 22).

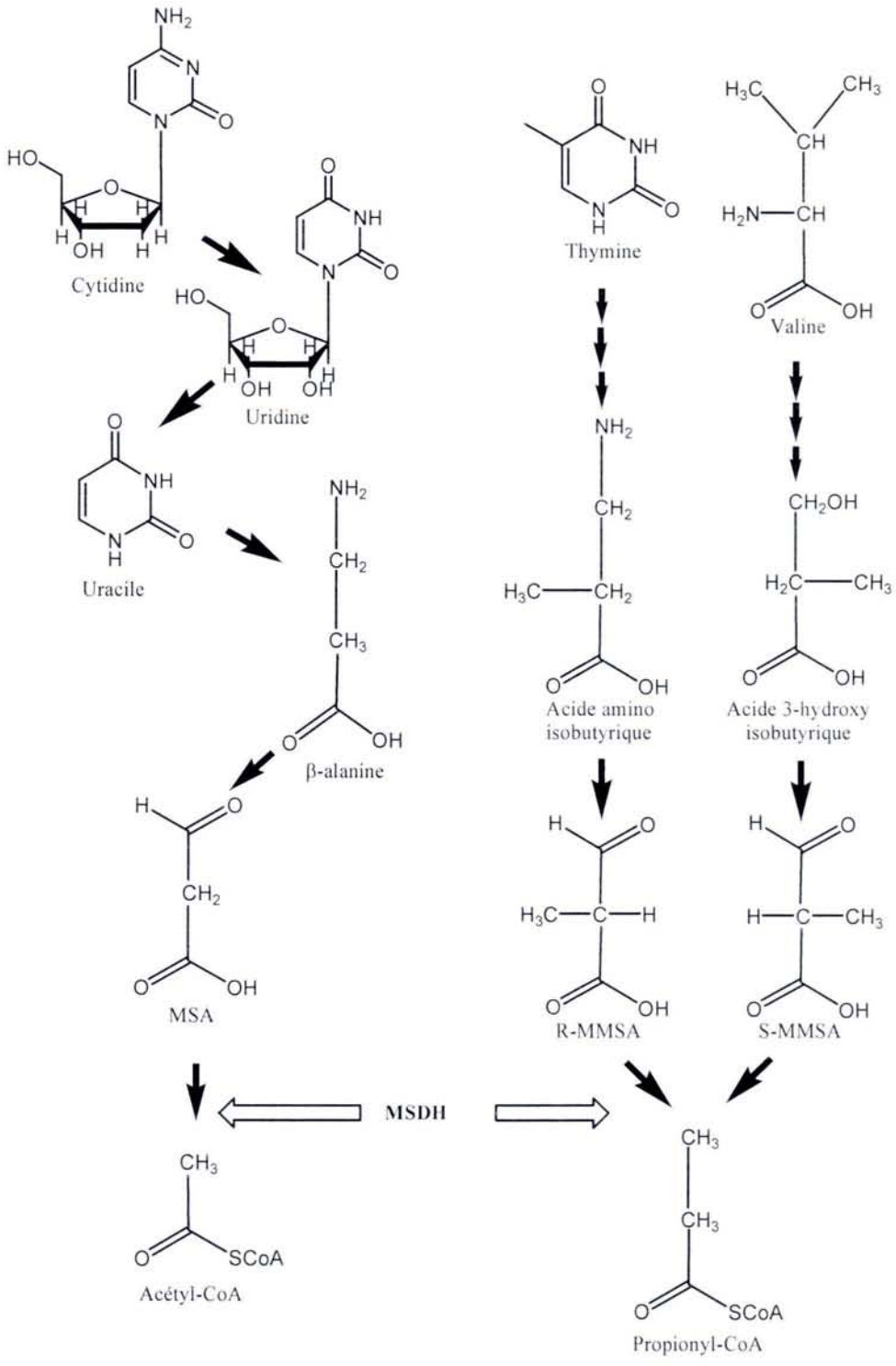


Figure 22: Aperçu des voies métaboliques convergeant vers la MSDH chez les mammifères (d'après Goodwin *et al.*, 1989).

3.3. Maladies associées au métabolisme des acides aminés branchés chez l'homme

Si des maladies liées à des déficiences enzymatiques dans la partie proximale du métabolisme des acides aminés branchés ainsi que dans les étapes en aval de la MSDH sont bien connues, les déficiences spécifiques de la voie de la valine sont rares (Gibson *et al.*, 1994 ; Sweetman et William, 1995). On peut citer par exemple la maladie « maple syrup urinary disease » pour laquelle une accumulation de 2-cétoacides liée à une perte d'activité du complexe 2-cétoacide déshydrogénase conduit à des symptômes cliniques neurologiques graves (Chuang et Shih, 1995). De même, l'absence d'enzymes impliquées en aval de la voie métabolique du PPCoA, à savoir la propionyl-CoA carboxylase et la méthylmalonyl-CoA mutase, est responsable de l'apparition de pathologies telles que des acidoses graves dès la naissance (Fenton et Rosenberg, 1995).

En ce qui concerne les voies du catabolisme de la valine, quelques cas de patients, pour lesquels une activité réduite de la MSDH est observée, présentent des symptômes de retard de développement (Pollitt *et al.*, 1985 ; Gray *et al.*, 1987 ; Gibson *et al.*, 1993). Un seul cas a été décrit où une mutation dans l'ORF du gène codant la MSDH semble être associée à une accumulation de 3-hydroxybutyrate dans les urines mais ceci sans symptômes graves (Chambliss *et al.*, 2000).

3.4. Le coenzyme A

3.4.1. Structure du Coenzyme A

Le CoA a été découvert en 1945 par Fritz Lipmann (Lipmann, 1945), comme facteur présent dans des extraits bouillis de foie, de rein et de muscle, nécessaire pour l'acétylation de sulfinamide. Ensuite, il a été décrit comme un coenzyme et comme facteur essentiel dans l'acétylation de la choline dans le cerveau (Kaplan et Lipmann, 1948). C'est un composé dérivant d'une vitamine du groupe B, l'acide pantothénique et il est essentiel dans de nombreuses réactions de synthèse et de dégradation.

La structure du CoA (Figure 23) a été déterminée par le biais de dégradations enzymatiques sélectives de la molécule et par analyse des produits de dégradations (Baddiley *et al.*, 1953). La structure peut être décomposée en plusieurs parties : une cystéamine, résultat de la décarboxylation d'une cystéine ; une β-alanine, acide aminé rare ; une molécule d'acide pantoïque qui se condense avec la β-alanine pour former l'acide pantothénique ; un phosphate

fixé par estérification sur la fonction alcool primaire libre de l'acide pantoïque ; une molécule d'adénosine monophosphate (AMP) et enfin un phosphate fixé en 3' du ribose de l'AMP.

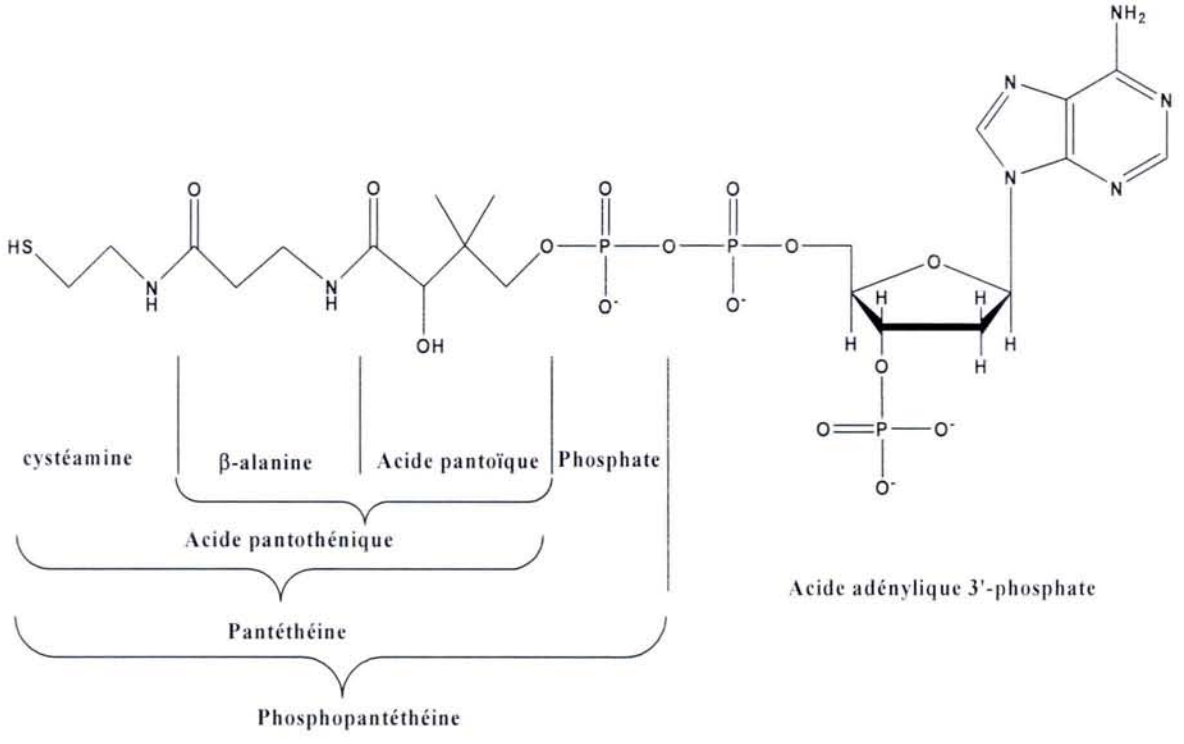


Figure 23 : Structure du coenzyme A (d'après Baddiley *et al.*, 1953)

La formule du CoA comporte de nombreux groupements. La fonction thiol libre portée par la cystéamine joue un rôle essentiel dans la catalyse d'enzymes impliquant le CoA. En effet, la fonction thiol sous forme thiolate se condense avec le groupement carboxylique des substrats à activer pour former une liaison thioester de potentiel énergétique élevé. La quantité d'énergie libérée par hydrolyse de cette liaison est de 8 kcal/mole.

Les dérivés acyl-CoA sont impliqués dans de nombreuses voies, telles que la dégradation des acides gras ou le cycle de l'acide citrique. L'acétyl-CoA est un intermédiaire central dans le métabolisme de la plupart des composés biologiques incluant des acides aminés, les oses ou les acides gras.

3.4.2. Différents modes de fixation du Coenzyme A dans les enzymes

Les enzymes qui lient le CoA catalysent une grande variété de réactions. Plusieurs exemples peuvent être cités. La citrate synthase (Remington *et al.*, 1982) catalyse une réaction de condensation entre un acétyl-CoA et un oxaloacétate pour former le citrate (réaction clé du

cycle de Krebs). C'est une enzyme dimérique, constituée uniquement d'hélices α. Chaque monomère est constitué de deux domaines, un petit et un large, qui peuvent passer d'une conformation ouverte à fermée par une rotation de 18°. Le CoA est lié sous forme compacte avec un repliement à 180° au niveau du pyrophosphate et de nombreuses liaisons hydrogènes avec les atomes de la chaîne principale de la protéine. La dihydrolipoyl transacétylase (Mattevi *et al.*, 1992), trimérique, transfère un acétyl d'un lipoamide sur un CoA libre. Le bras pantéthéine est trouvé sous deux conformations, une étendue dans le complexe binaire protéine-CoA, et une repliée dans le complexe ternaire protéine-CoA-lipoamide. L'acyl-CoA déshydrogénase (Kim *et al.*, 1993 ; Djordjevic *et al.*, 1995) catalyse la formation d'une double liaison aux positions 2,3 des acylCoA thioesters saturés (première étape de la β-oxydation des acides gras chez les animaux et dans le cytosol des bactéries). C'est une enzyme tétramérique, FAD dépendante, composée d'un domaine hélical où les hélices des domaines N et C-terminaux sont groupées ensemble. Le CoA est lié entre les deux hélices α de l'extrémité C-terminale, dans une forme repliée au niveau du pyrophosphate mais étendue au niveau du bras pantéthéine qui n'est pas en contact avec la base adénine. Le bras pantéthéine est protégé du solvant tandis que le pyrophosphate pointe vers le solvant. Le groupement NH_2 de l'adénine est lié au squelette de la chaîne principale de la protéine. Dans l'énoyl-CoA hydratase trimérique, qui catalyse l'hydratation du 2,3-énoyl-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA (deuxième réaction de la β-oxydation des acides gras), le CoA se fixe à l'interface entre deux sous-unités (poche). La méthylmalonyl-CoA-mutase (Mancia *et al.*, 1999) catalyse l'interconversion entre le méthylmalonyl-CoA et le succinyl-CoA. C'est un α-β hétérodimère de 150 kDa. Le CoA est lié en conformation étendue à un motif en tonneau αβ de la sous-unité α. Le bras pantéthéine est dans le cœur du tonneau et le 3'-phosphate-ADP est exposé au solvant. La succinyl-CoA synthétase (Wolodko *et al.*, 1994) catalyse la transformation du succinyl-CoA en succinate plus CoA (cycle de Krebs). Chez *E. coli*, c'est un $\alpha_2\beta_2$ hétérodimère assemblé en dimère de dimères. Le bras pantéthéine est étendu et en conformation non compacte, le 3'-phosphate-ADP étant lié par un mode classique Rossmann fold. L'exemple de l'acyl-CoA binding protein (Kragelund *et al.*, 1993) peut encore être cité. C'est une enzyme monomérique de 86 acides aminés, constituée de quatre hélices α, qui a une structure compacte en boule (la plus petite protéine connue à cette date qui lie le CoA). Le CoA s'y fixe dans une poche apolaire formée par trois hélices (sur les quatre).

En conclusion, de nombreuses structures tridimensionnelles de protéines liant le CoA sont aujourd'hui connues (Djordjevic *et al.*, 1995 ; Engel et Wierenga, 1996 ; Jacob *et al.*,

1997 ; Fraser *et al.*, 1999 ; Mancia *et al.*, 1999 ; Dyda *et al.*, 2000). L'inspection de la structure tridimensionnelle de ces protéines indique que la structure du site de fixation du CoA est différente d'une protéine à l'autre. En effet, des repliements aussi divers que le tonneau $(\alpha\beta)_8$ chez la méthylmalonyl-CoA mutase (Mancia *et al.*, 1999), le motif caractéristique de Rossmann chez la succinyl-CoA synthétase (Fraser *et al.*, 1999) ou encore des repliements dont le motif est variable sont observés (Engel et Wierenga, 1996).

Cependant, les interactions entre le CoA et les protéines présentent des points communs : le phosphate en 3' de l'adénosine est orienté vers le solvant et généralement stabilisé par un ou plusieurs ponts salins avec une lysine ou une arginine. La partie adénine pointe vers l'intérieur de la protéine en position anti par rapport au ribose et interagit avec la protéine par des liaisons hydrogènes. Le site de liaison du CoA est souvent situé à l'interface de deux sous-unités de la protéine si elle est oligomérique. Le bras pantéthéine est la plupart du temps dans une conformation étendue. La conformation du CoA varie principalement au niveau de l'étendue de la courbure au niveau du pyrophosphate : soit il y a des contacts de Van der Waals entre le bras et les atomes de l'adénine, soit l'adénine en 2'-endo et le bras étendu pointent dans des directions opposées. Le groupement NH_2 de la base adénine établit toujours une liaison hydrogène avec la protéine *via* des atomes de la chaîne principale.

Objectifs de travail

L'activité scientifique de l'Equipe Enzymologie Moléculaire est centrée sur l'étude des relations structure-fonction d'enzymes par des approches biochimiques, moléculaires et structurales. Ces études sont abordées au niveau de la catalyse chimique et de la spécificité structurale. Plusieurs classes d'enzymes sont étudiées, en particulier les aldéhyde déshydrogénases à cofacteur $NAD(P)^+$ non phosphorylantes CoA dépendantes ou non. Jusqu'à présent, les études étaient focalisées sur une ALDH non-phosphorylante non CoA dépendante, la GAPN de *S. mutans* qui oxyde irréversiblement le G3P en 3-phosphoglycérate.

Pour ma part, j'ai abordé l'étude d'une ALDH non phosphorylante à cofacteur NAD^+ CoA dépendante, la MSDH qui oxyde le MMSA ou le MSA en PPCoA ou en acétyl-CoA. Cette enzyme appartient à la même famille structurale que GAPN. Les différences majeures résident 1) au niveau de l'étape de désacylation qui consiste en une hydrolyse pour GAPN, et une transthioestérification avec le CoA pour la MSDH, et 2) au fait que la MSDH est la seule ALDH connue à ce jour à réaliser une β-décarboxylation du substrat.

Plusieurs questions se sont alors posées :

- ces enzymes suivent-elles le même mécanisme catalytique au niveau de l'activation de la C302 ? Peut-on généraliser les études faites sur GAPN ?
- au niveau de la spécificité structurale, quels sont les facteurs structuraux et moléculaires responsables de la reconnaissance du substrat notamment au niveau du carboxylate, et quel est le mécanisme de la décarboxylation ?
- quels sont les facteurs structuraux et moléculaires responsables de la reconnaissance du CoA ?

Pour y répondre, nous avons entrepris l'étude de la MSDH de *B. subtilis*, au niveau 1) de son mécanisme catalytique en essayant de déterminer les différents paramètres cinétiques de chaque étape de la catalyse, 2) de sa spécificité structurale et l'évolution de ses sites de spécificité par une approche de mutagenèse dirigée basée sur les alignements de séquences et les structures d'ALDH connues à ce jour. En parallèle, nous avons entrepris un travail de collaboration avec de l'équipe de biocristallographes du Dr Aubry du laboratoire LCM3B à Nancy en vue, à partir de la connaissance de la structure tridimensionnelle, d'apporter des informations sur le mode de reconnaissance des substrats et cosubstrats.

RESULTATS

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

PARTIE I :

Caractérisation du mécanisme enzymatique de la MSDH de *B. subtilis*

En préalable à toute étude enzymatique et structurale approfondie, il était indispensable de disposer en grande quantité d'une MSDH de *B. subtilis* purifiée jusqu'à homogénéité et des substrats MMSA et MSA qui n'étaient pas commerciaux. Ce travail préparatoire est décrit dans les paragraphes suivants ainsi que dans l'article 1.

1. Clonage de l'ORF du gène codant la MSDH de *B. subtilis*

1.1. Stratégie de clonage

L'ORF d'un gène codant une MSDH putative a été localisée dans le génome de *B. subtilis*, par alignement avec des séquences protéiques déduites de l'ORF des gènes codant les MSDH de *S. coelicolor* et *P. aeruginosa*. Le gène appelé *iolA* chez *B. subtilis* appartient à l'opéron *iol* qui participerait au métabolisme du myo-inositol (Yoshida *et al.*, 1997). L'ORF comportant 1463 pb, a été amplifiée par PCR avec des oligonucléotides contenant une extension en 5' permettant d'introduire un site de restriction *Nde* I (pour reconstituer le codon initiateur de la traduction) et une extension en 3' permettant d'introduire un site *Sac* I. Ce choix nous permettait d'introduire l'ORF du gène *iolA* de *B. subtilis* directement sous le contrôle du promoteur transcriptionnel du gène *lacZ* codant la β-galactosidase dans un vecteur pBluescript SK+ modifié, dans lequel un site *Nde*I avait été introduit pour permettre de recréer le codon initiateur de la traduction. Nous avions au préalable vérifié que les sites de restriction choisis n'étaient pas présents dans la région d'ADN amplifiée.

1.2. Construction du vecteur d'expression pSKmsdbsub contenant l'ORF du gène codant la MSDH de *B. subtilis*

Les différentes étapes de préparation du vecteur utilisé lors de la PCR, d'insertion dans le vecteur pBluescript SK+ préalablement digérés par *Nde* I et *Sac* I, puis d'isolement du plasmide recombinant sont résumées dans la figure 24. Le vecteur d'expression pSKmsdbsub ainsi obtenu est également représenté dans la figure 24.

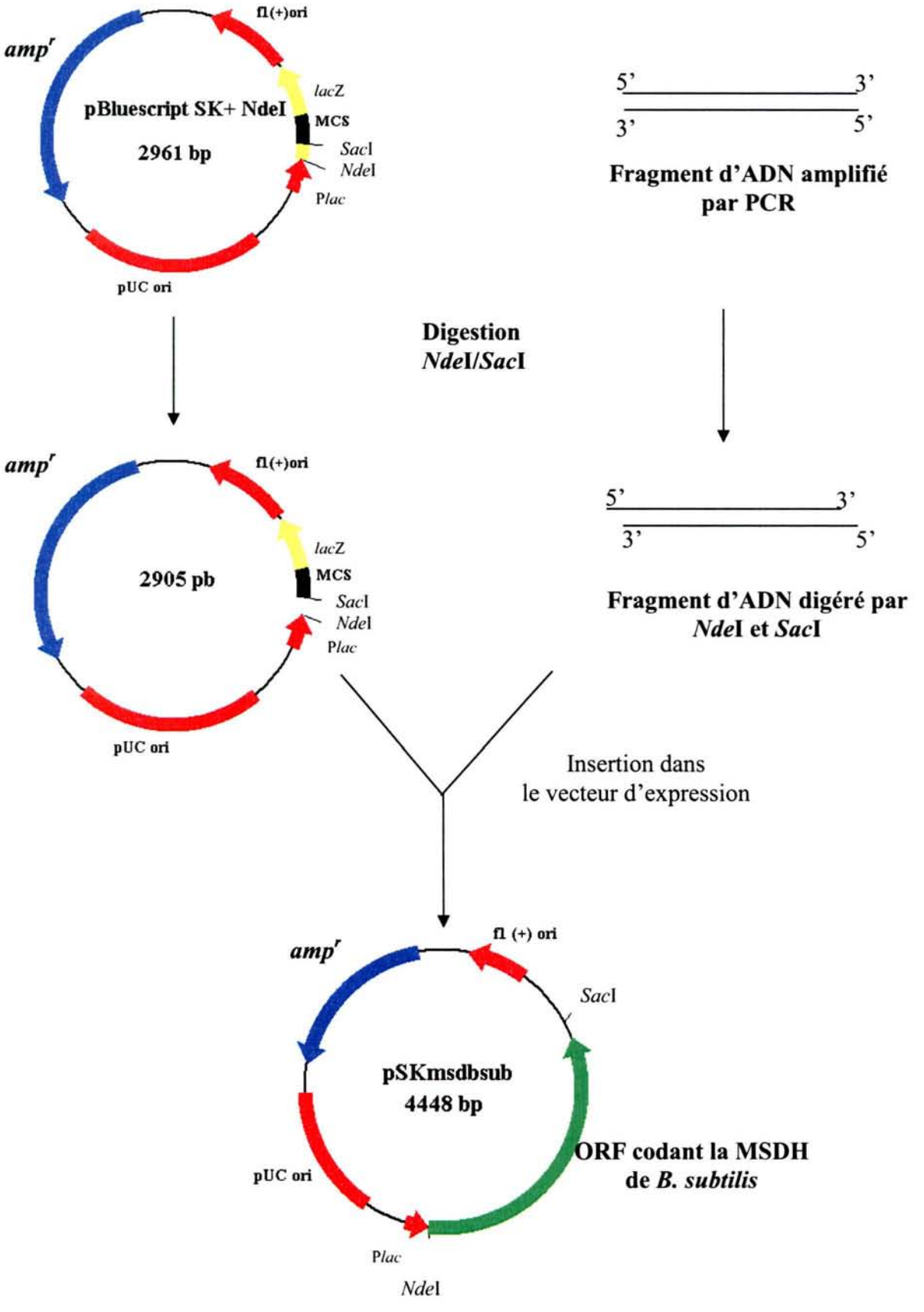


Figure 24 : Représentation schématique de la construction du vecteur d'expression p*SK*msdbsub. MCS : cassette de clonage ; *amp*^{r} : gène de résistance à l'ampicilline ; P*lac* : promoteur du gène *lacZ*.

2. Production, purification et caractérisation de la MSDH de *B. subtilis*

2.1. Production et purification

La MSDH de *B. subtilis* a été produite dans des cellules d'*E. coli* DH5α transformées par le plasmide pSKmsdbub contenant l'ORF du gène *iolA*. Différents tests préliminaires ont permis de définir les conditions de milieu et de température nécessaires à une surproduction importante de la MSDH sous forme soluble. Les protocoles de production et de purification sont décrits dans l'article 1. Un protocole identique à celui utilisé pour le type sauvage a été employé pour la purification des mutants protéiques de la MSDH.

La figure 25 présente le profil électrophorétique, sur gel SDS-PAGE 10%, d'échantillons correspondant à chaque étape de purification. Les activités spécifiques et les rendements à chaque étape de purification sont résumés dans le tableau 1. Les quantités d'enzymes pures obtenues sont de 250 mg par litre de culture. La mobilité électrophorétique est compatible avec une masse apparente de 53000 Da par monomère. L'analyse d'échantillons en spectrométrie de masse par G. Chevreux (ECPM, Strasbourg, France) a permis de déterminer une masse du monomère, soit 53319 Da en accord avec la masse théorique calculée de 53316 Da en absence de la Met à l'extrémité N-terminale de la séquence.

En fin de purification, le rapport A_{280}/A_{260} est de 1,72 (Tableau 1). La présence éventuelle de NAD^+ a été testée par voie enzymatique en conditions d'hydrolyse après réduction en NADH. En effet, la formation de NADH peut être facilement quantifiée par spectroscopie de fluorescence, qui est une technique plus sensible que le dosage spectrophotométrique à 340 nm. Cette méthode a permis de montrer que la MSDH de *B. subtilis* purifiée contient de 0 à 10 % de NAD^+ selon les lots d'enzymes.

Fractions	DO_{280}/ml	DO_{280} totale	Rapport DO_{280}/DO_{260}	A.S (µmol NADH. min^{-1}. DO_{280}^{-1})	Activité totale (µmol NADH.min^{-1})	Rendement (%)
Surnageant de sonication	64	5500	0,66	*	*	*
Surnageant de précipitation à 40% en sulfate d'ammonium	41	4300	0,70	*	*	*
Culot de précipitation à 80% en sulfate d'ammonium	99	3000	0,75	*	*	*
Fraction purifiée sur colonne ACA 34	7	1500	1,04	0,28	420	100
Fraction purifiée sur colonne Sépharose Q	5	1000	1,72	0,31	310	74

Tableau 1 : Activités spécifiques et rendements obtenus au cours de la purification de la MSDH de *B. subtilis* pour 4 litres de culture en milieu LB.
Les activités spécifiques n'ont pas été déterminées à des concentrations saturantes en NAD^+, MMSA et CoA et sont donc sous-estimées.
* *Mesures non fiables car trop faibles.*

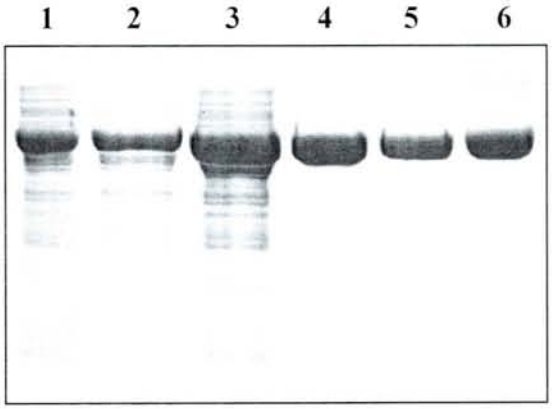


Figure 25 : Analyse des différentes étapes de purification de la MSDH de *B. subtilis* sur gel de polyacrylamide à 10 % en conditions dénaturantes.
Le gel a été révélé par coloration au bleu de Coomassie.
1, surnageant de sonication (50 mDO) ; **2**, surnageant de précipitation à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium (50 mDO) ; **3**, culot de précipitation à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium (50 mDO) ; **4**, MSDH purifiée sur colonne ACA34 (10 mDO) ; **5**, MSDH purifiée sur colonne sépharose Q (10 mDO) ; **6**, témoin MSDH *S. coelicolor* (10 mDO) (masse moléculaire théorique 52470 Da). Les quantités déposées sur le gel ont été estimées par la DO à 280 nm et sont indiquées entre parenthèses.

2.2. Détermination de l'état oligomérique de la MSDH de *B. subtilis*

Le profil d'élution d'enzyme pure en conditions natives sur une colonne de filtration sur gel Superose 12 étalonnée a permis de déterminer une masse apparente de 223 +/- 11 kDa pour la MSDH de *B. subtilis* (Figure 26). Compte tenu de la masse théorique du monomère (53316 Da), ceci implique que l'enzyme est isolée sous forme tétramérique.

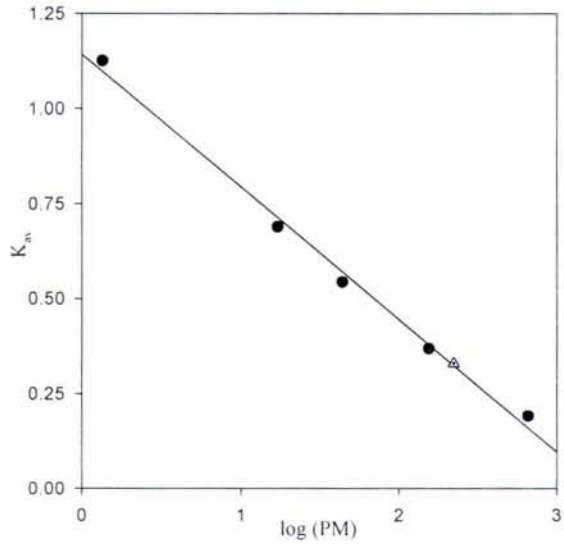


Figure 26 : Caractérisation de l'état oligomérique des MSDH de *B. subtilis* par tamisage moléculaire sur colonne superose 12 en conditions natives.
La colonne Superose 12 a un volume total de 17,8 ml, un volume mort de 7,7 ml et est étalonnée par injection d'un mélange de marqueurs de poids moléculaire (Biorad):

(1) la vitamine B12 (1,35 kDa)
(2) la myoglobine de cheval (17 kDa)
(3) l'ovalbumine de poulet (44 kDa)
(4) la bovine γ-globuline (158 kDa)
(5) la thyroglobuline (670 kDa)

1,5 mg de MSDH pure ont été injectés sur la colonne.
Le coefficient de partage K_{av} de la MSDH de *B. subtilis* de 0,34 qui correspond à un poids moléculaire de 223 ± 11 kDa, est représenté par le triangle sur la droite étalon.

2.3. Cristallogenèse et résultats préliminaires obtenus par radiocristallographie

Suite à la mise au point des conditions de production et de purification permettant l'obtention d'une quantité importante de MSDH de *B. subtilis* pure, une collaboration avec le groupe de Biocristallographie de Nancy dirigé par le Dr A. Aubry a été entreprise en vue de

déterminer la structure tridimensionnelle de l'enzyme de type sauvage. Les résultats préliminaires obtenus ont permis de définir les conditions expérimentales permettant l'obtention de cristaux de la MSDH de type sauvage sous forme holoenzyme diffractant à 2,5 Å. La MSDH de *B. subtilis* présentant une identité de séquence de 18-34 % avec les ALDH non-phosphorylantes dont les structures cristallines étaient connues, la résolution de la structure tridimensionnelle a donc été tentée par remplacement moléculaire. La forme holo de la bétaïne déshydrogénase s'est révélée être le meilleur modèle.

Article 1:

"Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data of Methylmalonate-Semialdehyde Dehydrogenase from *Bacillus subtilis*"

Acta Crystallographica Section D
Biological Crystallography
ISSN 0907-4449

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*

Hélène Dubourg,[a]‡ Claire Stines-Chaumeil,[b]‡ Claude Didierjean,[a]* François Talfournier,[b] Sophie Rahuel-Clermont,[b] Guy Branlant[b] and André Aubry[a]

[a]Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques, UMR 7036 CNRS-UHP, Groupe Biocristallographie, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, and [b]Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

‡ These authors contributed equally to this work.

Correspondence e-mail: claude.didierjean@lcm3b.uhp-nancy.fr

Received 29 March 2004
Accepted 21 May 2004

Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. Suitable crystals for X-ray diffraction experiments were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method using ammonium sulfate as precipitant. The crystals belong to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters a = 195.2, b = 192.5, c = 83.5 Å, and contain one tetramer per asymmetric unit. X-ray diffraction data were collected to 2.5 Å resolution using a synchrotron-radiation source. The crystal structure was solved by the molecular-replacement method.

1. Introduction

The members of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily oxidize a wide variety of aldehydes to non-activated or CoA-activated acids *via* a two-step chemical mechanism. Mechanistic and structural aspects have been studied extensively for homotetrameric and homodimeric CoA-independent ALDHs (see, for example, Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Marchal & Branlant, 1999; Marchal *et al.*, 2000; Cobessi *et al.*, 2000). In contrast, little information about the mechanistic and/or structural aspects of CoA-dependent ALDHs is available so far, except for the recent structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase (Manjasetty *et al.*, 2003). Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (MSDH), which is one of the few ALDHs belonging to this family (Steele *et al.*, 1992; Leal *et al.*, 2003), has been found in a wide variety of organisms ranging from bacteria and archaea to mammals. *Pseudomonas aeruginosa* (Bannerjee *et al.*, 1970; Steele *et al.*, 1992) and *Streptomyces coelicolor* (Zhang *et al.*, 1996) MSDHs are involved in valine catabolism. Investigation of the *myo*-inositol catabolism of *Bacillus subtilis* (Yoshida *et al.*, 1997) and *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* (Fry *et al.*, 2001) revealed the putative implication of MSDH in this pathway. In mammals, MSDH is a mitochondrial enzyme that is involved in the distal portions of the valine and pyrimidine catabolic pathways (Goodwin *et al.*, 1989). Over the two last decades, a possible correlation of organic acidaemia with MSDH deficiency has been explored (Gray *et al.*, 1987; Chambliss *et al.*, 2000). Roe *et al.* (1998) proposed that a psychomotor delay associated with methylmalonyl aciduria, without any increase of propionylcarnitine in the blood or urine, could be a direct consequence of MSDH deficiency.

This NAD-dependent ALDH catalyzes the oxidation of methylmalonate semialdehyde (MMSA) and malonate semialdehyde (MSA) to propionyl-CoA and acetyl-CoA, respectively. Therefore, MSDHs show another difference with respect to the chemical mechanism of the CoA-independent ALDH family because the catalyzed reaction also includes a β-decarboxylation step. Here, we report the cloning, overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the MSDH from *B. subtilis* (*Bs*_MSDH).

2. Material and methods

2.1. Cloning procedure, expression and purification

The *iolA* ORF was amplified by PCR using the *B. subtilis* 168 genomic DNA as a template and the forward and reverse primers 5′-GAAGGAGGCAATA**CATATG**GCAGA-AATCAG-3′ and 5′-CTTACGCAACAAA-**GAGCTC**ATAGAGAAGC-3′, respectively. The forward primer contains an *Nde*I restriction site (in bold) and the reverse primer contains a *Sac*I restriction site (in bold). These restriction sites were used to clone *iolA* into a plasmid derived from pBluescriptSK+, yielding pSKmsdbsub for overexpression under control of the *lac* promoter. The cloned *iolA* ORF was sequenced in order to confirm that no mutations had been introduced in the amplification reaction.

Escherichia coli DH5α transformants containing the pSKmsdbsub plasmid were grown at 310 K for 24 h in Luria–Bertani medium supplemented with ampicillin (200 µg ml^{-1}). Cells were harvested by centrifugation (20 min at 3000*g*) at 277 K and the pellet was suspended in 50 m*M* potassium

© 2004 International Union of Crystallography
Printed in Denmark – all rights reserved

DOI: 10.1107/S0907444904012533

phosphate pH 8.2 (buffer *A*) containing 10 m*M* β-mercaptoethanol. Cells were disrupted by sonication, after which unbroken cells and debris were removed by centrifugation (45 min at 20 000*g*). MSDH was purified by ammonium sulfate fractionation (40–80%) and gel filtration on ACA 34 resin equilibrated in buffer *A*. Fractions containing MSDH activity were then applied to a Q-Sepharose column using a FPLC system (Amersham Biosciences) previously equilibrated with buffer *A*. MSDH was eluted at 330 m*M* KCl with a linear gradient of 0–1 *M* KCl in buffer *A* at 5 ml min^{-1}.

At this stage, wild-type MSDH was pure as checked by electrophoresis on 10% SDS–polyacrylamide gel (Laemmli, 1970) followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining and electrospray mass-spectrometry analysis. The yield was estimated to be ~200 mg per litre of culture. The observed monomeric weight was 53 319 Da (the calculated weight without the N-terminal Met is 53 316 Da). The relative molecular weight of native wild-type MSDH was estimated by gel-filtration chromatography on a Superose 12 HR column as previously described (Roitel *et al.*, 1999). The obtained value of 223 ± 11 kDa is in good agreement with the theoretical value expected for a tetrameric enzyme, *i.e.* 213 kDa. Purified enzyme was stored at 253 K in the presence of 10 m*M* β-mercaptoethanol. MSDH was stable under these conditions for several weeks. The concentration was determined spectrophotometrically using an extinction coefficient of 280 nm of 51 000 M^{-1} cm^{-1} deduced by the method of Scopes (1974), Mach *et al.* (1992) and Gill & von Hippel (1989).

2.2. Crystallization

The purified enzyme was dialyzed against potassium phosphate buffer pH 7.8, 1 m*M* DTT, 1 m*M* EDTA and finally concentrated using a Centricon (Amicon/Millipore) with 30 kDa molecular-weight cutoff at 4500*g* and 277 K. Prior to crystallization experiments, the enzyme was incubated at 303 K for 30 min in phosphate buffer pH 7.8 containing 20 m*M* NAD. Crystallization experiments were performed using the hanging-drop vapour-diffusion method (Ducruix & Giegé, 1999) at room temperature. Drops were prepared by mixing 2 µl protein solution with an equal volume of reservoir solution and were suspended over 500 µl reservoir solution. The protein concentration used for the first screenings was 10 mg ml^{-1}. Initial crystallization trials were carried out at 277 and 293 K using commercially available sparse-matrix screens and a home-made ammonium sulfate kit (pH range 5.0–8.0 and ammonium sulfate concentration range 1.0–3.0 *M* in steps of 0.1). The commercially screens used were Crystal Screens I and II from Hampton Research and Clear Strategy Screens I and II from Molecular Dimensions Ltd. The crystallization experiment was repeated by increasing the protein concentration until crystals were obtained.

Table 1
Statistics of X-ray data measurement for *B. subtilis* MSDH crystals.

Values in parentheses refer to the outermost resolution shell (2.50–2.59 Å).

Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	a = 195.2, b = 192.5, c = 83.5
Resolution range (Å)	20.0–2.5
No. reflections measured	786249
No. unique reflections	108345
Completeness (%)	99.5 (91.9)
$\langle I/\sigma(I)\rangle$	9.39 (3.58)
R_{merge}† (%)	13.8 (37.2)

† $R_{merge} = \sum_{hkl}\sum_j |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl}\rangle|/\sum_{hkl}\sum_j I_{hkl,j}$, where $I_{hkl,j}$ is the intensity of observation j of Bragg reflection hkl.

2.3. Data collection and diffraction measurements

The cryoprotectant conditions for *Bs*_MSDH crystals were optimized using an in-house X-ray facility composed of an area detector (DIP2030b) with a φ goniometer using Cu $K\alpha$ radiation from a rotating-anode generator (Bruker–Nonius FR591 Model) and an Oxford Cryosystems Cryostream. The X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation from EMBL beamline X11 located at the DORIS storage ring, DESY, Hamburg. The wavelength used was 0.8126 Å and the data were collected at 100 K on a MAR CCD165 detector. 360 images were collected with a crystal-to-detector distance of 240 mm and 0.5° rotation per image. A 2.5 Å data set was processed and merged with the *XDS* suite (Kabsch, 1993).

2.4. Results and discussion

The first crystals were only obtained at a very high protein concentration (>150 mg ml^{-1}) using ammonium sulfate as precipitant. These initial crystallization conditions were further refined by changing the pH and the protein and precipitant concentrations. Finally, thin plates grew within 3–7 d to approximate dimensions of 0.3 × 0.3 × 0.05 mm under the following conditions: 2.0–2.3 *M* ammonium sulfate without buffer and a protein concentration of 200 mg ml^{-1}.

Prior to X-ray diffraction experiments, crystals were soaked briefly in reservoir solution supplemented with 18%(*v*/*v*) glycerol for flash-freezing. The diffraction pattern obtained using the home rotating-anode generator was too weak to determine the unit cell of the MSDH crystals. The diffraction pattern obtained using the synchrotron X-rays was consistent with the primitive orthorhombic Bravais lattice, with unit-cell parameters a = 195.2, b = 192.5, c = 83.5 Å. A total of 108 345 unique reflections (average multiplicity 8) were collected in the resolution range 20–2.5 Å. Detailed data-collection statistics are given in Table 1. The systematic absences unambiguously revealed screw twofold axes parallel to a, b and c, leading to the $P2_12_12_1$ space-group assignment. A reasonable Matthews coefficient of 3.6 Å^3 Da^{-1} (Matthews, 1968) was obtained for four monomers in the asymmetric unit. The resulting calculated solvent content is 65%.

*Bs*_MSDH displays 18–34% sequence identity to non-phosphorylating ALDHs whose crystal structures are available in the Protein Data Bank. Consequently, the molecular-replacement method was first tested to solve the crystal structure of *Bs*_MSDH. Considering the oligomeric state of *Bs*_MSDH, trials were carried out using the crystal structures of tetrameric ALDHs only. The holo form of the cod liver betaine aldehyde dehydrogenase search model gave the best solution (Johansson *et al.*, 1998; PDB code 1bpw). In *CNS* (Brünger *et al.*, 1998), a cross-rotational search followed by a translational search were performed in the resolution range 10–4 Å. The top two solutions seem to be equivalent, exhibiting correlation coefficients of 34.2 and 33.9%, while that of the next solution was 25.1%. Crystallographic refinement and structure analysis will be published elsewhere (coordinates have been deposited in the PDB with code 1t90).

We thank G. Chevreux and Dr A. Van Dorsselaer (ECPM, Strasbourg, France) for determining the molecular weight of wild-type MSDH and also S. Boutserin for her very efficient technical help. We would like to thank the Service Commun de Diffraction X sur Monocristaux (Université Henri Poincaré, Nancy, France) and the EMBL (Hamburg, Germany) for providing access to crystallographic experimental facilities.

References

Bannerjee, D., Sanders, L. E. & Sokatch, J. R. (1970). *J. Biol. Chem.* **245**, 1828–1835.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* D**54**, 905–921.

Chambliss, K. L., Gray, R. G. F., Rylance, G., Pollitt, R. J. & Gibson, K. M. (2000). *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**, 497–504.

Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. & Aubry, A. (2000). *J. Mol. Biol.* **300**, 141–152.

Ducruix, A. & Giegé, R. (1999). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.

Fry, J., Wood, M. & Poole, P. S. (2001). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1016–1025.

Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.

Goodwin, G. W., Rougraff, P. M., Davis, E. J. & Harris, R. A. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 14965–14971.

Gray, R. G., Pollitt, R. J. & Webley, J. (1987). *Biochem. Med. Metab. Biol.* **38**, 121–124.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. & Eklund, H. (1998). *Protein Sci.* **7**, 2106–2112.

Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800.

Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–687.

Leal, N. A., Havemann, G. D. & Bobik, T. A. (2003). *Arch. Microbiol.* **180**, 353–361.

Liu, Z. L., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. & Wang, B.-C. (1997). *Nature Struct. Biol.* **4**, 317–326.

Mach, H., Middaugh, C. R. & Lewis, R. V. (1992). *Anal. Biochem.* **200**, 74–80.

Manjasetty, B. A., Powlowski, J. & Vrielink, A. (2003) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 6992–6997.

Marchal, S. & Branlant, G. (1999). *Biochemistry*, **38**, 12950–12958.

Marchal, S., Rahuel-Clermont, S. & Branlant, G. (2000). *Biochemistry*, **39**, 3327–3335.

Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.

Roe, C. R., Struys, E., Kok, R. M., Roe, D. S., Harris, R. A. & Jakobs, C. (1998). *Mol. Genet. Metab.* **65**, 35–43.

Roitel, O., Sergienko, E. & Branlant, G. (1999). *Biochemistry*, **38**, 16084–16085.

Scopes, R. K. (1974). *Anal. Biochem.* **59**, 277–282.

Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A. & Sokatch, J. R. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 13585–13592.

Steinmetz, C. G., Peiguang, X., Weiner, H. & Hurley, T. D. (1997). *Structure*, **5**, 701–711.

Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T. & Fujita, Y. (1997). *J. Bacteriol.* **179**, 4591–4598.

Zhang, Y. X., Tang, L. & Hutchinson, C. R. (1996). *J. Bacteriol.* **178**, 490–495.

3. Mécanisme catalytique de la MSDH de *B. subtilis*.

Nous avons tout d'abord montré l'existence d'une phase de latence de plusieurs minutes lors du test d'activité (figure 27), qui peut être levée par une préincubation de la forme apo de la MSDH avec le NAD^+.

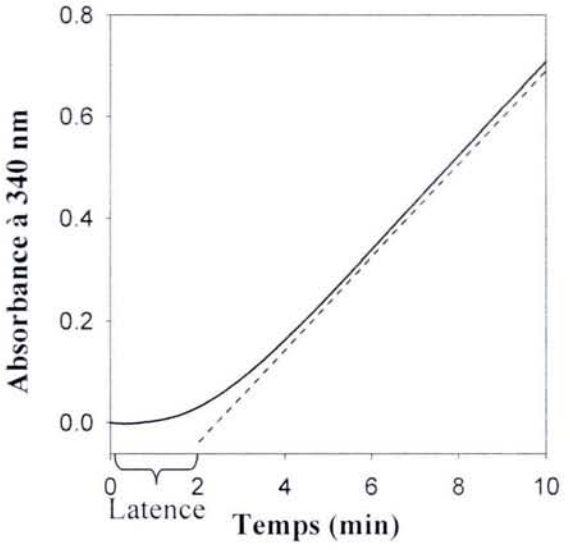


Figure 27 : Test d'activité de la MSDH de *B. subtilis* réalisé sans préincubation avec le NAD^+.
L'activité est mesurée dans les conditions suivantes: tampon KPi 50 mM pH 8,2 à 30°C, MMSA 600 µM, CoA 500 µM, NAD^+ 2 mM à une concentration en MSDH de 0,48 µN. L'activité enzymatique figurée par la tangente rouge n'est maximale qu'au bout de 7 min.

La fixation du NAD^+ favorise donc une étape d'activation impliquant vraisemblablement une réorganisation conformationnelle du site actif. Le suivi de l'extinction de fluorescence des résidus tryptophane comme sonde de changement conformationnel, nous a permis de confirmer cette hypothèse et d'accéder à la vitesse de ce réarrangement par le biais d'études réalisées sur le complexe binaire apoenzyme/NAD^+. Nous avons montré que l'addition de NAD^+ à la forme apoenzyme conduit à une extinction de l'émission de fluorescence qui est la conséquence de deux effets additifs. La première phase très rapide reflète la fixation du NAD^+ à l'apoenzyme et représente 75 % de l'extinction, alors que la seconde phase correspond à un changement conformationnel lent (figure 28).

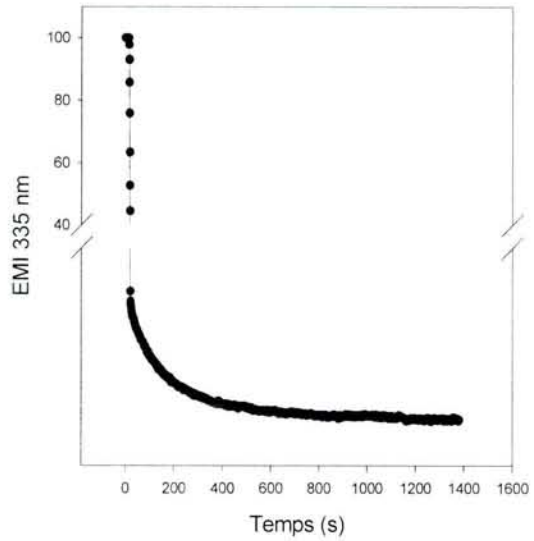


Figure 28 : Variation de l'intensité d'émission de fluorescence de la MSDH induite par la liaison du NAD^+.
L'extinction de fluorescence est mesurée sur un spectrofluorimètre SAFAS flx à 30 °C en présence de 5 µN de MSDH après addition de 2 mM NAD^+ dans un tampon KPi 50 mM pH 8,2. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 297 et 335 nm.

De plus, la constante de vitesse (k_{obs}) associée à cette seconde phase dépend de la concentration en NAD^+. Cela nous a permis de déterminer un K_{Dapp} de 0 ,38 mM pour le NAD^+ et un k_{obsmax} de 0,18 min^{-1}, ce qui est en accord avec la durée de la phase de latence observée lors du test d'activité. La MSDH de *B. subtilis* contenant 5 résidus tryptophane, l'analyse des propriétés de fluorescence des mutants W28F, W76F, W177F, W397F et W468F nous a permis d'identifier le résidu W468 comme seul responsable de l'extinction de fluorescence supplémentaire observée lors de la fixation du NAD^+. Ce résidu W468 étant localisé au niveau d'une boucle située à l'interface monomère/monomère d'un même dimère dans les ALDH dont la structure tridimensionnelle est connue, nos résultats montrent que la fixation du cofacteur induit au moins une réorganisation conformationnelle au niveau de cette interface.

L'étude de l'étape d'acylation en cinétique rapide montre que cette étape est rapide ($k_{obs} \geq 500\ s^{-1}$), non limitante et indépendante de la présence de CoA. De plus, nous avons montré que la MSDH de *B. subtilis* présente des propriétés de réactivité de demi-site. Le fait que seuls 2 des 4 sites soient fonctionnels posait la question de l'existence de deux populations de sites dans les formes apo et holoenzyme. L'utilisation d'une sonde chimique spécifique des cystéines telle que le 2,2'-dithiopyridine (2PDS) nous a permis de répondre à cette question par l'affirmative pour la C302 essentielle. Sa réactivité a été étudiée sur le quintuple mutant MSDH C49A-C176A-C305A-C369A-C430A (QCys), et nous avons montré l'existence de

deux populations de C302 aussi bien au niveau de la forme apo que holoenzyme. Dans la forme apo, ces deux populations présentent un pK_{app} d'environ 8,7 mais des réactivités différentes de $1,4 \times 10^5$ et de $1,8 \times 10^4$ $M^{-1}.s^{-1}$, chaque population représentant 2 cystéines sur les quatre cystéines du tétramère. La C302 n'est donc pas activée. La formation de l'holoenzyme induit une diminution d'au moins 230 fois de la réactivité de deux C302 par tétramère qui s'accompagne d'un abaissement du pK_{app} d'environ 8,7 à 7,9. Par contre, les 2 autres C302 présentent un pK_{app} et une réactivité comparable à ceux déterminés pour la forme apo. Une approche complémentaire utilisant l'iodoacétamide comme sonde chimique nous a permis d'attribuer de façon définitive le pK_{app} de 7,9 à la C302 appartenant aux deux sous-unités «actives».

Cette valeur de pK_{app} de 7,9 n'était pas compatible avec une étape d'acylation rapide comme nous l'avions montré précédemment et suggérait donc une activation supplémentaire de la C302 essentielle au niveau du complexe ternaire MSDH/NAD^+/substrat/. L'étude de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation en fonction du pH a permis de montrer qu'elle dépend d'un seul groupement ionisable de pK_{app} 5,7 ou 6, selon le substrat utilisé (MMSA ou MSA), qui pouvait être attribué à la C302. Ceci suggérait fortement que la formation du complexe ternaire conduisait à une réorganisation structurale locale supplémentaire au niveau du site actif, indispensable à une activation optimale de la C302. Ainsi, l'ensemble de nos résultats a démontré le caractère séquentiel du mode d'activation de la C302, dont le pK_{app} est progressivement abaissé d'environ 8,7 dans l'apoenzyme à 7,9 dans le complexe binaire, puis à une valeur inférieure à 6 dans le complexe ternaire.

L'étude approfondie du mécanisme catalytique a été poursuivie dans le but d'identifier le processus limitant de la réaction globale, qui était situé après le transfert d'hydrure et pouvait donc être associé soit au relargage du NADH, à la β-décarboxylation, à la transthioestérification ou encore à d'éventuelles étapes d'isomérisation.

La constante de vitesse de dissociation apparente (k_{off}) du NADH à partir du complexe thioacylenzyme-NADH a été déterminée par des approches de cinétique rapide à l'aide d'un système couplé enzymatique lactate déshydrogénase-pyruvate. Nous avons montré que le relargage du NADH n'est pas limitant. En effet, les valeurs de k_{off} apparentes sont respectivement de 56 s^{-1} avec le MMSA et de 50 s^{-1} avec le MSA soit nettement supérieures aux valeurs de k_{cat} de 1,1 s^{-1} et 7,5 s^{-1}. La caractérisation de l'étape de β-décarboxylation a été initiée en analysant les produits de la réaction par HPLC. Les résultats obtenus sont en faveur d'une étape dépendante de la forme acylenzyme et indépendante de la présence de CoA, le

produit décarboxylé correspondant (propionate ou acétate) étant obtenu dans des conditions d'hydrolyse. Dans le but de pouvoir accéder à la vitesse de cette étape, il a été nécessaire de développer une approche de cinétique rapide faisant intervenir un double système couplé enzymatique phosphoénolpyruvate décarboxylase/phosphoénolpyruvate puis malate déshydrogénase/oxaloacétate permettant de suivre la production de CO_2 sous forme de bicarbonate. Les résultats obtenus avec le MMSA comme substrat indiquent une vitesse de décarboxylation d'environ 2,5 s^{-1} du même ordre de grandeur que le k_{cat} de 1,1 s^{-1}, ce qui suggère que cette étape soit le processus limitant de la réaction globale. En effet, le k_{cat} de 1,1 s^{-1} a été calculé par site d'enzyme et non par sous-unité active, et comme deux sites sur les quatre sont actifs, le k_{cat} exprimé par sous-unité active serait de 2,2 s^{-1}. De plus, nos résultats indiquent que la décarboxylation conduit 1) à la production de bicarbonate et pas de CO_2, 2) à la formation d'un nouvel intermédiaire thioacylenzyme compétent pour subir l'attaque nucléophile du CoA lors de l'étape de transthioestérification.

Article 2

« Mechanistic characterization of the Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase from *Bacillus subtilis* » soumis à Biochemical Journal en Septembre 2005.

Biochem. J. (2006) **395**, 107–115 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20051525

Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*

Claire STINES-CHAUMEIL, François TALFOURNIER and Guy BRANLANT[1]

Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Université Henri Poincaré Nancy I, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Homotetrameric MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis* catalyses the NAD-dependent oxidation of MMSA (methylmalonate semialdehyde) and MSA (malonate semialdehyde) into PPCoA (propionyl-CoA) and acetyl-CoA respectively via a two-step mechanism. In the present study, a detailed mechanistic characterization of the MSDH-catalysed reaction has been carried out. The results suggest that NAD binding elicits a structural imprinting of the apoenzyme, which explains the marked lag-phase observed in the activity assay. The enzyme also exhibits a half-of-the-sites reactivity, with two subunits being active per tetramer. This result correlates well with the presence of two populations of catalytic Cys^{302} in both the apo- and holo-enzymes. Binding of NAD causes a decrease in reactivity of the two Cys^{302} residues belonging to the two active subunits and a pK_{app} shift from approx. 8.8 to 8.0. A study of the rate of acylation as a function of pH revealed a decrease in the pK_{app} of the two active Cys^{302} residues to approx. 5.5. Taken together, these results support a sequential Cys^{302} activation process with a pK_{app} shift from approx. 8.8 in the apo-form to 8.0 in the binary complex and finally to approx. 5.5 in the ternary complex. The rate-limiting step is associated with the β-decarboxylation process which occurs on the thioacylenzyme intermediate after NADH release and before transthioesterification. These data also indicate that bicarbonate, the formation of which is enzyme-catalysed, is the end-product of the reaction.

Key words: bicarbonate, CoA-dependent aldehyde dehydrogenase (ALDH), cysteine activation, β-decarboxylation, half-of-the-sites reactivity, lag-phase.

INTRODUCTION

Two structurally unrelated families of NAD(P)-dependent ALDHs (aldehyde dehydrogenases) catalyse the oxidation of aldehydes into acidic compounds via a two-step chemical mechanism, first with an acylation step common to both families, and then a deacylation step which differs in the nature of the acyl acceptor. The acylation step involves the nucleophilic attack of the catalytic cysteine residue on the aldehydic function followed by the hydride transfer that leads to formation of a thioacyl-enzyme intermediate and NAD(P)H. In phosphorylating ALDHs, inorganic phosphate acts as the acyl acceptor, thus leading to formation of a phospho-ester. This, for example, is the case in GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). By contrast, in the non-phosphorylating ALDHs, the acylenzyme intermediate undergoes a nucleophilic attack by a water or CoA molecule, thus leading to non-activated or CoA-activated acids respectively (Scheme 1). Numerous crystal structures of homotetrameric and homodimeric non-phosphorylating CoA-independent ALDHs have already been solved and essentially show identical structural features at the secondary, tertiary and quaternary levels [1–3]. Moreover, mechanistic aspects were studied extensively and several invariant residues were shown to be critical for the chemical mechanism of non-phosphorylating CoA-independent ALDHs [4–7]. Subsequently, evidence has been provided for the chemical activation of the catalytic Cys^{302} upon cofactor binding to non-phosphorylating GAPN (non-phosphorylating GAPDH) from *Streptococcus mutans* [8]. Moreover, additional studies of this GAPN have highlighted the essential roles of (i) an oxyanion-hole composed of the side-chain of the invariant Asn^{169} residue and the Cys^{302} NH-group which permits an efficient hydride transfer without base-catalyst assistance [9] and (ii) the Glu^{268} residue in the rate-limiting hydrolytic step through activation and orientation of the attacking water molecule [10].

By contrast, little information regarding the mechanistic and/or structural aspects of CoA-dependent ALDHs is available so far, excepting the crystal structure of a bifunctional enzyme 4-hydroxy 2-ketovalerate aldolase/acylating acetaldehyde dehydrogenase described recently [11]. However, from a structural viewpoint, this CoA-dependent dehydrogenase does not belong to the non-phosphorylating ALDH family, but to the phosphorylating GAPDH family.

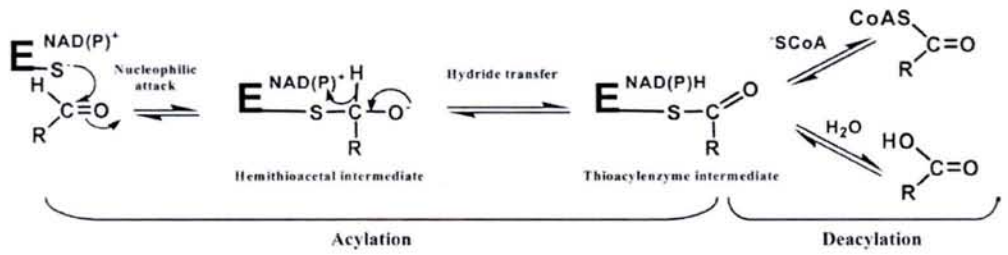
In the present paper, a detailed study of the enzymatic properties of the MSDH [MMSA (methylmalonate semialdehyde) dehydrogenase] from *Bacillus subtilis*, which is one of the few CoA-dependent ALDHs [12,13], has been undertaken. MSDH from *B. subtilis* is a homotetrameric enzyme putatively involved in *myo*-inositol catabolism [14]. It catalyses the NAD-dependent oxidation of MMSA and MSA (malonate semialdehyde) into PPCoA (propionyl-CoA) and acetyl-CoA respectively (Scheme 2). Therefore the oxidation process catalysed by MSDH from *B. subtilis* includes a β-decarboxylation step, which is a specific feature when compared with the chemical mechanism of the non-phosphorylating CoA-independent and CoA-dependent ALDHs described so far. As expected, sequence alignment reveals conservation of the catalytic Cys^{302} and Asn^{169} residues but the lack of Glu^{268}, which is consistent with the non-efficient hydrolytic activity exhibited by MSDHs.

The results obtained in the present study suggest that NAD binding elicits a slow conformational rearrangement [(imprinting), where conformational rearrangement can include as little as

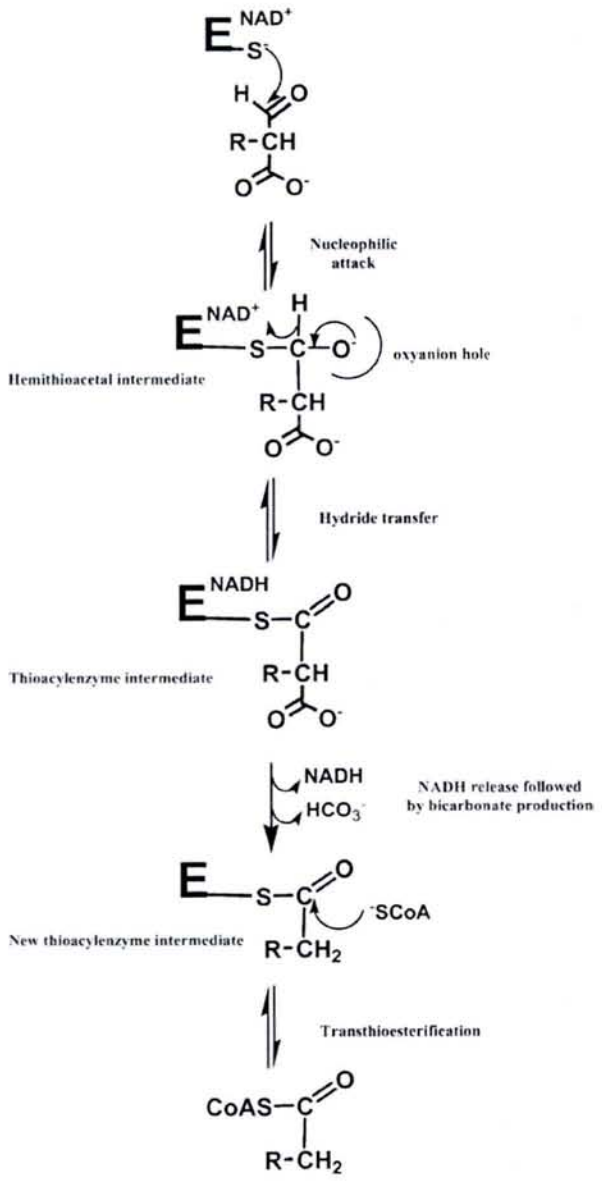
Abbreviations used: ALDH, aldehyde dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPN, non-phosphorylating GAPDH; IAM, iodoacetamide; LDH, lactate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; MMSA, methylmalonate semialdehyde; MSA, malonate semialdehyde; MSDH, MMSA dehydrogenase; 2PDS, 2,2′-dipyridyl disulphide; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPC, PEP carboxylase; PPCoA, propionyl-CoA.

[1] To whom correspondence should be addressed (email guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr).

© 2006 Biochemical Society



Scheme 1 Schematic representation of the catalytic mechanism of non-phosphorylating ALDHs



Scheme 2 Schematic representation of MSDH-catalysed reactions as proposed from kinetic studies (see the Results and Discussion sections)

R represents a CH_3 group in MMSA and PPCoA, whereas it represents a hydrogen atom in MSA and acetyl-CoA.

a reorientation of the Cys^{302} residue and repositioning of either the NAD or the quenched Trp^{468}, located at the dimer interface, or both] in the apo-structure of the MSDH from *B. subtilis*, which explains the marked lag-phase observed in the activity assay. The enzyme also exhibits a half-of-the-sites reactivity. Only two subunits per tetramer display activity, which correlates well with the presence of two populations of the catalytic Cys^{302} residue in both the apo- and holo-enzymes. In addition, kinetic analysis of the catalytic mechanism showed that the rate-limiting step is associated with the β-decarboxylation process which occurs on the thioacylenzyme after NADH release and before transthioesterification. The results and interpretation are discussed in relation to what is known about the catalytic mechanism and the three-dimensional structure of the non-phosphorylating ALDHs, in particular GAPN.

EXPERIMENTAL

Materials

NAD was from Roche (Mannheim, Germany). CoA, propionaldehyde, pyruvate, PEP (phosphoenolpyruvate), LDH (lactate dehydrogenase) and MDH (malate dehydrogenase) were from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), and PEPC (PEP carboxylase) was from Fluka (Buchs, Switzerland).

MMSA was synthesized as described by Kupiecki and Coon [15] and MSA was prepared from ethyl ester diethyl acetal of MSA (Acros Organics, Noisy-le-Sec, France). Both substrates were enzymatically titrated with MSDH.

Site-directed mutagenesis, production and purification of wild-type and mutant MSDH from *B. subtilis*

Site-directed mutagenesis was performed using the Quikchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Wild-type, QCys (C49A/C176A/C305A/C369A/C403A), W28F, W76F, W177F, W397F and W468F MSDHs were produced and purified by using a procedure already described [16]. Wild-type and mutant MSDHs were isolated as apo-forms. Enzyme concentrations were determined spectrophotometrically by using molar absorbption coefficients of 204000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ at 280 nm for apo-(wild-type) and QCys MSDHs, 180000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ for W28F MSDH, 164000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ for W76F, W177F and W397F MDSHs and 172000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ for W468F MSDH.

Quantification of the free cysteine content using 2PDS (2,2′-dipyridyl disulphide)

Free cysteine content in the wild-type and QCys MSDHs were deduced from the absorbance of pyridine-2-thione using an absorption coefficient of 8080 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ at 343 nm [17]. The

© 2006 Biochemical Society

enzyme was dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2, and 2PDS was added in excess relative to the enzyme.

Kinetic parameters of wild-type and QCys MSDHs under steady-state conditions

Initial-rate measurements were carried out at 30 °C on a SAFAS UV mc2 spectrophotometer by following the appearance of NADH at 340 nm in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2), or 50 mM Tes (pH 8.2). The initial-rate data were fitted to the Michaelis–Menten relationship using least-squares regression analysis to determine the k_{cat} and K_m values. All K_m values were determined at saturating concentrations of the other substrates: 500 μM MMSA or 1 mM MSA, 12 mM NAD and 500 μM CoA.

Kinetic studies of tryptophan fluorescence quenching

The time-course of MSDH fluorescence quenching induced by NAD-binding was recorded on a SAFAS flx spectrofluorimeter maintained at 30 °C after addition of 2 mM NAD to 1.25 μM wild-type and mutant MSDHs in 50 mM potassium phosphate, pH 8.2. Absorption and emission wavelengths were set at 297 and 335 nm respectively. For NAD-dependence of the conformational rearrangement, the k_{obs} (pseudo-first-order) values were determined at each NAD concentration by fitting the slow Trp^{468} fluorescence quenching to a monoexponential expression. Data were then fitted to equation (1) to determine K_{app} and $k_{obs\ max}$:

$$k_{obs} = (k_{obs\,max}[NAD])/(K_{app} + [NAD]) \quad (1)$$

pH-dependence of MSDH reactions with 2PDS and IAM (iodoacetamide)

Due to the high reactivity of Cys^{302} with 2PDS in the Qcys MSDHs, kinetic measurements were carried out on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) at 30 °C, under pseudo-first-order conditions over a pH range 5.5–9 with a mixed reaction buffer consisting of 22 mM succinic acid, 29 mM imidazole and 29 mM diethanolamine adjusted with NaCl to a constant ionic strength of 0.06 M (buffer A). One syringe contained MSDH in the presence or absence of 4 mM NAD, and the other contained 2PDS. When Cys^{302} reactivity was low i.e. in the presence of NAD, rate measurements were carried out using a SAFAS UV mc2 spectrophotometer, under the experimental conditions described above.

Alkylation rates for wild-type and QCys MSDHs using IAM were determined over a pH range of 5.5–9 in buffer A at 30 °C under pseudo-first-order conditions, by following the loss of activity. Inactivation of holo-(wild-type) and QCys MSDHs were carried out in the presence of 2 mM NAD. In all experiments, the pseudo-first-order and second-order rate constants, k_{obs} and k_2 respectively, were determined at each pH, and data were analysed as described by Marchal and Branlant [8].

HPLC analysis of MSDH reaction products in the absence of CoA

Identification of MSDH reaction products in the absence of CoA was carried out using HPLC. Reaction mixtures contained wild-type MSDH (4 μM), MMSA (500 μM), or MSA (400 μM) and NAD (2 mM). Progress curves of NADH production in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2) were followed at 30 °C. After completion of the reaction, the enzyme was precipitated by addition of 0.2 M HCl and eliminated by centrifugation. A fraction of the supernatant was then injected into a IOA2000 column (Alltech®) followed by isocratic elution using 0.1 M HCl. Products were monitored by refractometry using a SP 8430 RI detector (Spectra-Physics®) and MMSA, MSA, propionic acid, acetic acid, methylmalonic acid and malonic acid were used as standards.

Pre-steady-state kinetic measurements

Pre-steady-state kinetic analyses were carried out on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) and collected data were analysed using the SX18MV-R software package.

Analysis of the overall steps leading to thioacylenzyme formation

Progress curves of NADH production were recorded in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2), in the presence or absence of CoA at 30 °C. One syringe was filled with MSDH (4 μM) and NAD (4 mM) and the other contained MMSA at various concentrations. Data were fitted to equation (2) to determine k_{ac} and K_S values, where S represents the substrates MMSA or MSA.

$$k_{ac} = (k_{ac\,max}[S])/(K_S + [S]) \quad (2)$$

For pH-dependence studies, data were collected at 10 or 30 °C in buffer A and analysed as described by Marchal et al. [10].

NADH-dissociation rate from the thioacylenzyme–NADH complex

Experiments were carried out in the absence of CoA in 50 mM potassium phosphate (pH 8.2) at 30 °C. To evaluate the rate of NADH dissociation from the thioacylenzyme–NADH complex, the coupled pyruvate/LDH assay was used as an NADH trapping system. One syringe was filled with MSDH (7.5 or 15 μM) and NAD (4 mM), and the other contained either MMSA (1mM) or MSA (2 mM), LDH (7.5 μM) and pyruvate (20 mM).

Decarboxylation rate of the thioacylenzyme intermediate

The rate of the decarboxylation process was evaluated at 30 °C by using the PEP/PEPC/MDH system as a coupled assay. To minimize the background level of carbon dioxide present, nitrogen was bubbled through the stock potassium phosphate, $MgCl_2$ and PEP solutions. The reaction mixture containing 50 mM Tes (pH 8.2), 10 mM $MgCl_2$, 0.4 mM NADH, 4 mM PEP, 100 units/ml MDH and 10 units/ml PEPC was divided into two equal volumes. MSDH (3 or 6 μM, final concentrations) and NAD (2 mM) were added to one volume, and MMSA (1 mM) to the second. The two volumes were pre-incubated separately for 5 min to remove residual bicarbonate, and then mixed together. NAD reduction and NADH oxidation were recorded at 340 nm. The total rate of formation of both bicarbonate and carbon dioxide was assayed by supplementing the reaction mixture with 500 units of bovine erythrocyte carbonic anhydrase/ml.

RESULTS

Evidence for a lag-phase

Progress curves for enzymatic turnover exhibited an initial lag-phase, which prevented detailed kinetic and mechanistic characterization of the catalytic pathway. As shown in Figure 1, the steady-state rate was attained after approx. 5 min when the reaction was initiated by addition of apo-(wild-type) MSDH. The lag-phase was eliminated after pre-incubation of the apoenzyme with NAD. By contrast, pre-incubating the apo-form with MMSA

© 2006 Biochemical Society

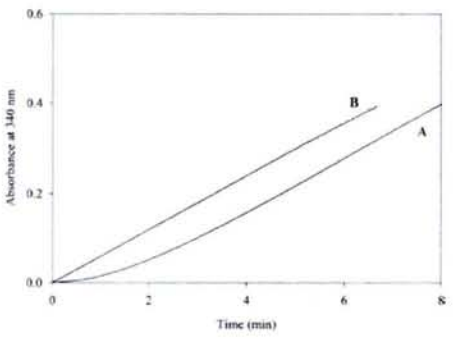


Figure 1 Progress curves for enzymatic turnover of wild-type MSDH from *B. subtilis*

Assays were performed at 30 °C under the following conditions: 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.2), 2 mM NAD, 500 μM MMSA and 500 μM CoA. In curve A, the reaction was initiated by adding 0.125 μM apo-MSDH and the steady-state rate was attained after approx. 5 min (solid line). In curve B, the enzyme pre-incubated for 20 min in the presence of 2 mM NAD was added to the complete assay to initiate the reaction.

or CoA at concentrations much higher than the K_m values had no effect. Moreover, pre-incubating apo-MSDH with both NAD and MMSA did not diminish the duration of the lag-phase when determined with NAD alone. Therefore MSDH activation appears to be promoted only by NAD. The simplest model capable of explaining the enzyme activation is:

$$E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [E \cdot NAD] \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} [E' \cdot NAD]$$

where E and E′ are the inactive and active forms of the enzyme respectively. To gain more insight into the role of NAD in the enzyme activation process, the quenching of tryptophan fluorescence intensity upon cofactor binding was evaluated. When apo-MSDH was excited at 297 nm, a fluorescence emission maximum was observed at 335 nm (results not shown). Addition of NAD led to fluorescence quenching, which is in fact the consequence of two additive effects: (i) the formation of the binary E • NAD complex upon NAD binding to the apo-structure, which results in 75 % of the quenching and the rate of which cannot be attained even when using a stopped-flow apparatus, and (ii) a slow phase which is time-dependent and represents 25 % of the quenching (Figure 2). This experiment was carried out using several NAD concentrations ranging from 0–5 mM, and at each NAD concentration a k_{obs} value was calculated by fitting the slow additional fluorescence quenching to a mono-exponential equation. This allowed the determination of a K_{app} of 0.38 mM for NAD and a $k_{obs\ max}$ of 0.18 min^{-1} (Figure 3). The $k_{obs\ max}$ value is consistent with the duration of the lag-phase when the MSDH apo-form is used for activity assays (Figure 1). Therefore the slow phase is likely to be representative of enzyme activation. In this context, the NAD concentration-dependence of this phase is in agreement with mechanism I.

MSDH from *B. subtilis* contains five tryptophan residues. Analysis of the fluorescence properties of each of the W28F, W76F, W177F, W397F, and W468F MSDH mutants revealed that time-dependent additional quenching is due only to Trp^{468} (Figure 2).

Kinetics of the reaction of apo- and holo-(wild-type) and QCys MSDHs with 2PDS and IAM

The reaction of 2PDS with apo-(wild-type) MSDH led to the formation of 4 moles of pyridine-2-thione per monomer under

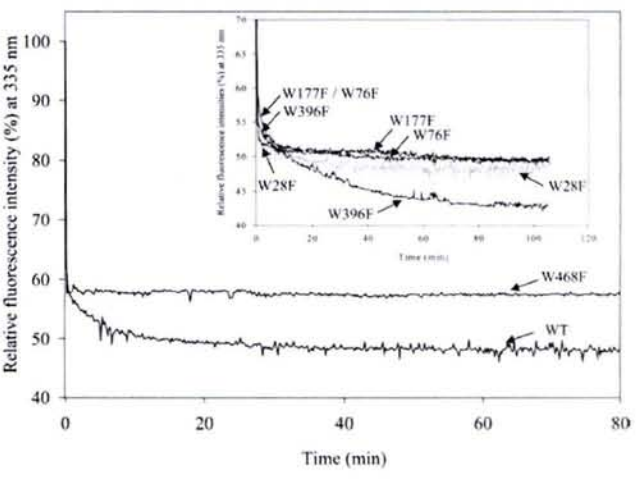


Figure 2 Time-course of the MSDH fluorescence change induced by NAD-binding

Fluorescence quenching was recorded after addition of 2 mM NAD to 1.25 μM wild-type (WT) and W468F MSDHs dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2 at 30 °C. The inset details the fluorescence quenching recorded for the W28F, W76F, W177F and W397F MSDHs under the same experimental conditions. Excitation and emission wavelengths were 297 and 335 nm respectively. The raw fluorescence quenching data were converted into relative fluorescence intensities using the fluorescence intensity of the apo-forms as a reference.

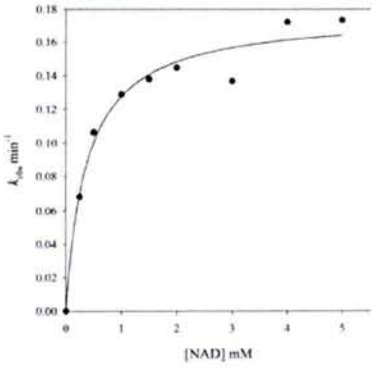


Figure 3 Effect of NAD concentration on the rate of the apo → holo transition

Apo-(wild-type) MSDH (1.25 μM) was incubated in the presence of NAD (0.25–5 mM) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2 at 30 °C. The time-course of the MSDH fluorescence change induced by NAD-binding was then recorded at 335 nm. At each NAD concentration a k_{obs} value was calculated by fitting the slow additional fluorescence quenching to a mono-exponential equation. Data were fitted to eqn (1) demonstrating a K_{app} of 0.38 $\pm$ 0.08 mM and a $k_{obs\ max}$ of 0.18 $\pm$ 0.01 min^{-1}.

native conditions, as determined from the absorbance change at 343 nm. This strongly suggested that, in addition to the catalytic Cys^{302} that is expected to be reactive, three other cysteine residues in the apo-structure were also reactive. MSDH from *B. subtilis* contains six cysteines at positions 49, 176, 302, 305, 369 and 430. Therefore to selectively study the chemical reactivity of Cys^{302} towards 2PDS, we substituted alanine for all the cysteine residues, except Cys^{302}. The fact that QCys MSDHs had catalytic parameters similar to those of the wild-type enzyme (see below) suggested that the substitutions did not cause significant effects at either the structural or enzymatic levels. Thus QCys MSDHs could be considered as representative of the wild-type enzyme, in order to study the pH-dependence of the second-order rate constant k_2 for the reaction of Cys^{302} with 2PDS. As shown in Figure 3 and Table 1, the pK_{app} of approx. 8.7 obtained for the

© 2006 Biochemical Society

Table 1 Parameters for the pH-dependence of the second-order rate constants for the reaction of Cys^{302} with 2PDS and IAM for the wild-type and QCys MSDHs

Kinetics of the reaction of Cys^{302} with 2PDS and IAM were determined over a pH range of 5.5–9 at 30 °C. The experimental conditions are described in the Experimental section. The second-order rate constants at each pH were fitted to a monosigmoidal equation using Sigmaplot (SPSS) to determine the pK_{app}s. The error estimates are those provided by the program.

Enzyme	Cys^{302} k_2 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	pK_{app}
Apo-MSDHs		
Wild-type		
+ IAM	30 ± 8	8.95 ± 0.15
QCys		
+ IAM	16 ± 5	8.80 ± 0.20
+ 2PDS*	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^5$	8.70 ± 0.05
	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^4$	8.75 ± 0.05
Activated-MSDHs†		
Wild-type		
+ IAM	19 ± 1	8.15 ± 0.05
QCys		8.10 ± 0.10
+ IAM	9 ± 1	
+ 2PDS*	$(5.1 \pm 0.3) \times 10^4$	8.60 ± 0.10
	77 ± 2	7.90 ± 0.10

* Kinetic transients showed the contribution of two populations of Cys^{302} present in equal concentration within the tetramer with two cysteines exhibiting a chemical reactivity higher than the other two.

† Activated forms refer to wild-type and QCys MSDHs pre-incubated for 20 min with 2 mM NAD at 30 °C in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2.

apo-QCys MSDH represents the contribution of two populations of Cys^{302} that are present in equal concentrations within the tetramer, with k_2 values of 1.4×10^5 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ for two cysteines, and 1.8×10^4 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ for the other two respectively. A similar behaviour was observed for the holo-form. Indeed, two cysteine residues exhibited a k_2 of 77 $M^{-1} \cdot s^{-1}$, which is at least 2 orders of magnitude lower when compared with the apo-form, whereas the two remaining cysteine residues were still reactive, with a k_2 value of 5.1×10^4 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (Figure 4 and Table 1). Moreover, the pK_{app} of the less reactive cysteine residues shifted to 7.9 whereas the pK_{app} of the other two was not significantly changed.

Another means by which to characterize Cys^{302} reactivity was to follow the loss of activity upon IAM alkylation. In this case, only the Cys^{302} belonging to the 'active' subunits is probed. The inactivation process of the apo-(wild-type) and QCys MSDHs obeyed pseudo-first-order kinetics. The pH-rate profiles showed a sigmoidal behaviour with a pK_{app} of 8.95 and 8.80, and k_2 values of 30 and 16 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ for apo-(wild-type) and QCys MSDHs respectively (Table 1). For both holo-forms, Cys^{302} exhibited a pK_{app} of approx. 8.1, close to the value (7.9) obtained for the two less reactive Cys^{302} residues in QCys MSDHs when using 2PDS. The k_2 values for holo-forms were approx. 2-fold lower than those of the apo-forms (Table 1).

Steady-state kinetic parameters of wild-type and QCys MSDHs

Prior to any kinetic studies, wild-type or QCys MSDHs were activated in the presence of NAD. The kinetic parameters determined at the optimum pH of 8.2 and at 30 °C for the MSDH-catalysed reaction under steady-state conditions are summarized in Table 2. The wild-type enzyme displayed K_m values of 2.3 mM and 1.78 mM for NAD, and 0.1 mM and 0.03 mM for CoA using MMSA and MSA as substrates respectively, and the k_{cat} value was 6.7-fold higher when using MSA as the substrate. The kinetic parameters for the QCys MSDHs are similar to those of the wild-type enzyme. The K_m values for NAD and MMSA were 1.8-fold lower and 2.1-fold higher respectively, whereas the K_m

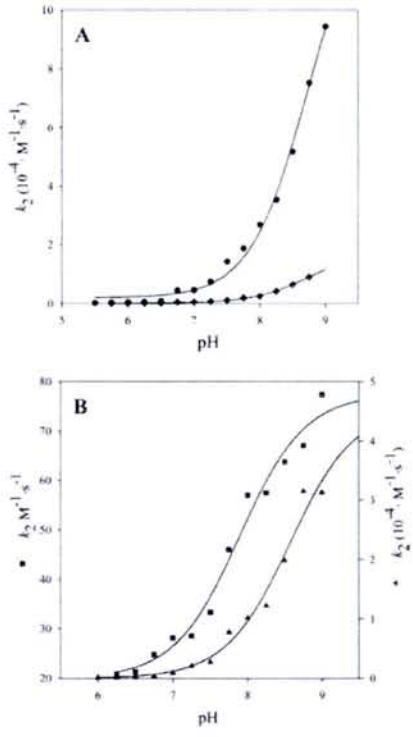


Figure 4 pH-dependence of the second-order-rate constant k_2 for the reaction of Cys^{302} with 2PDS on QCys MSDH

Kinetic studies were performed over a pH range of 5.5–9.0 or 6.0–9.0 in buffer A at 30 °C. The MSDH concentration was 1.55 μM and 2PDS was 20- or 30-fold in excess relative to the free-SH concentration. Experimental data were analysed as described by Marchal and Branlant [8]. (**A**) Transients obtained on the apo-form were best described by a double exponential expression reflecting the contribution of two populations of non-equivalent Cys^{302} present in equal concentrations (at pH $\leqslant$ 6.5, only one population was observed). Both data sets were fitted against a one-pKa model, which gave a pK_{app} of approx. 8.7 but different k_2 values of 1.4×10^5 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (●) and 1.8×10^4 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (◆) respectively. (**B**) As described for the apo-form, two populations of Cys^{302} were also characterized in the holo-form. Data sets were fitted against a one-pKa model, which gave k_2 and pK_{app} values of 77 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ and 7.90 (■), and 5.1×10^4 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ and 8.60 (▲) respectively. As described above, the two Cys^{302} populations were not distinguishable at pH $\leqslant$ 6.5. Thus the k_2 value of approx. 20 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ exhibited by the 'activated' Cys^{302} (■) at pH $\leqslant$ 6.5 reflects the contribution of the 'non-activated' population (▲) (k_2 approx. 130 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ at pH 6.0). Therefore the pK_{app} value of 7.9 is slightly overestimated.

for CoA and the k_{cat} remained unchanged. In the absence of CoA, the steady-state rate constant (k_{H_2O}) of $10^{-3} \cdot s^{-1}$ reflects the poor efficiency of the hydrolytic process in the MSDH-catalysed reaction compared with the transthioesterification step.

Determination of the rate-limiting step

Prior to any single turnover experiments, wild-type or QCys MSDHs were activated in the presence of NAD.

Analysis of the overall step leading to thioacylenzyme formation

Under pre-steady-state conditions, at pH 8.2 and 30 °C, fast kinetic experiments showed a burst of NADH production at a concentration of 2 mM NAD and sub-saturating MMSA or MSA concentrations. A similar k_{obs} of approx. 500 s^{-1} was measured for the wild-type and QCys MSDHs in the presence or absence of CoA irrespective of the substrate used. These results indicate that the rate-limiting step takes place after hydride transfer and show that the acylation process is CoA-independent. The burst

© 2006 Biochemical Society

Table 2 Kinetic parameters of the wild-type and QCys MSDH-catalysed reactions under steady-state conditions

Kinetic parameters were deduced from non-linear regression of experimental data sets, according to the Michaelis–Menten model; k_{cat} values are expressed per subunit (considering four active subunits per tetramer). The steady-state initial rates of the reaction of wild-type and QCys MSDHs were measured at 30 °C in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2 As mentioned in the Experimental section, the determination of the decarboxylation rate was performed in 50 mM Tes, pH 8.2. Thus control experiments were performed in the same buffer and, as expected, the kinetic parameters obtained were similar to those obtained using potassium phosphate buffer. k_{H_2O} values represent the steady-state rate constants of the reaction in the absence of CoA.

MSDH	K_m MMSA (mM)	K_m NAD (mM)	K_m CoA (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{H_2O} (s^{-1})
Wild-type	0.06 ± 0.01	2.30 ± 0.06	0.12 ± 0.02	1.1 ± 0.1	10^{-3}
QCys	0.17 ± 0.03	1.22 ± 0.14	0.10 ± 0.03	1.25 ± 0.12	10^{-3}
	K_m MSA (mM)	K_m NAD (mM)	K_m CoA (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{H_2O} (s^{-1})
Wild-type	0.12 ± 0.01	1.78 ± 0.39	0.030 ± 0.01	7.4 ± 0.3	10^{-3}

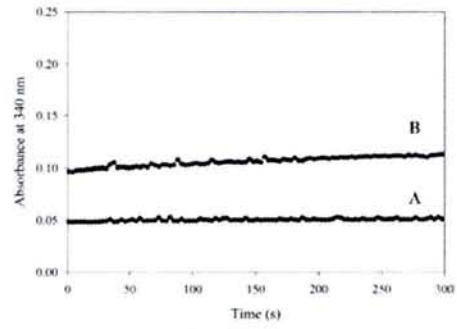


Figure 5 Burst kinetics for the MSDH-catalysed reaction

The experiment was carried out under pre-steady-state conditions in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.2) at 30 °C and in the absence of CoA. Under these experimental conditions, accumulation of the thioacylenzyme is observed due to the very low steady-state rate, $10^{-3} \cdot s^{-1}$. After mixing, the reaction contained 2 mM NAD, 500 μM MMSA and 4 μM (curve A) or 8 μM (curve B) of 'activated'-MSDH. The burst of NADH production was monitered at 340 nm. The extrapolated intercept from the steady-state rate portion corresponds to a burst of 0.5 mol of NADH/mol of MSDH monomer.

magnitude observed during the first turnover with both substrates showed that only 2 mol of NADH were formed per mol of tetramer (Figure 5). As a control experiment, NAD concentration was increased to 20 mM, but this did not modify the magnitude of NADH production and the k_{obs}. This burst magnitude is related to both the number of functional active sites and the k_{ac}/k_{cat} or k_{ac}/k_{H_2O} ratios. Considering the values given in Tables 2 and 3, the theoretical burst magnitude should be 4 for tetrameric MSDH. Therefore the data clearly indicate that wild-type and QCys MSDHs exhibited half-of-the-sites reactivity.

The pH-dependence of the acylation rate constant for the wild-type enzyme was determined in the absence of CoA. To avoid any k_{ac}/K_S contribution to the pH–k_{ac} curve, the experiment should be carried out at a saturating MMSA concentration over the full pH range (5.0–8.5). Owing to the fact that the acylation rate appeared to be too fast at 30 °C, the experiments were performed at 10 °C. The apparently similar K_S value of 3.6 mM determined at both pH 5.0 and 8.5, which is 60-fold higher than the K_m obtained under steady-state conditions (Table 3), suggested no variation in the K_S value within the pH range 5.0–8.5. At an MMSA concentration of 10 mM which was found to be saturating, the pH–k_{obs} profile exhibited a sigmoidal curve that was related to the contribution of one ionizable group of pK_{app} 5.4 that must be deprotonated for acylation, and characterized by a k_{ac} of 450 s^{-1} (Figure 6, see legend). The same experiment was also performed at 30 °C and at sub-saturating substrate concentrations i.e. 0.5 mM MMSA and 0.4 mM MSA. Under these conditions, the pH–k_{ac} profile

Table 3 Parameters for the pH-dependence of wild-type and QCys MSDHs pre-steady-state kinetics

$k_{ac\,max}$ and K_S values were deduced from non-linear regression analysis of experimental data collected at 10 or 30 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus, according to equation (2). Other experimental data are given in the Experimental section. pH-dependence experiments were carried out in buffer A at 10 and 30 °C (for more details see the Experimental section). Data were analysed by non-linear regression analysis against a one-pK_a model.

MSDH	$k_{ac\,max}$ (s^{-1})	K_S (mM)	pK_{app} Cys^{302}
Wild-type			
MMSA			
10 °C	450 ± 10	3.6 ± 0.2	5.4 ± 0.1*
30 °C	1200 ± 180‡	3.5 ± 1.0‡	5.7 ± 0.1†
MSA			
30 °C	2900 ± 900‡	4.7 ± 1.8‡	6.0 ± 0.1†
QCys			
MMSA			
30 °C	480 ± 20	2.2 ± 0.2	5.9 ± 0.1†

* Experiment carried out at saturating concentrations of MMSA.

† Experiments performed using sub-saturating concentrations of MMSA (0.5 mM) or MSA (0.4 mM).

‡ At greater than 3 mM MMSA or 2 mM MSA, acylation appears to be too fast at 30 °C to allow accurate determination of k_{ac} values. The $k_{ac\,max}$ and K_S values were then estimated by extrapolation to saturating MMSA or MSA concentrations and fitting experimental data to eqn (2).

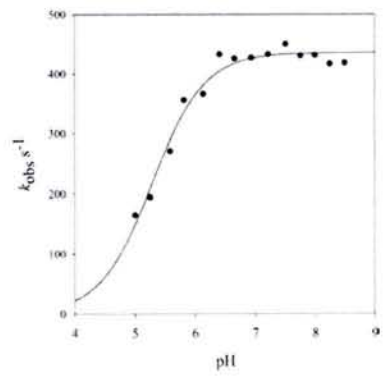


Figure 6 Representative pH-dependence of the acylation rate constant k_{ac} for the wild-type MSDH-catalysed reaction

Pre-steady-state data were collected at 10 °C on a SX18MV-R stopped-flow apparatus (Applied PhotoPhysics) using the 5 μl cell, by rapidly mixing 4 μM wild-type MSDH, 2 mM NAD and 10 mM MMSA (final concentrations) over a pH-range of 5–8.5 in buffer A. At pHs lower than 5, MSDH was not stable. NADH appearance was monitored at 340 nm and experimental data (●) were best fitted by non-linear regression analysis against a one-pK_a model, identified by the best-fit theoretical curve (solid line).

© 2006 Biochemical Society

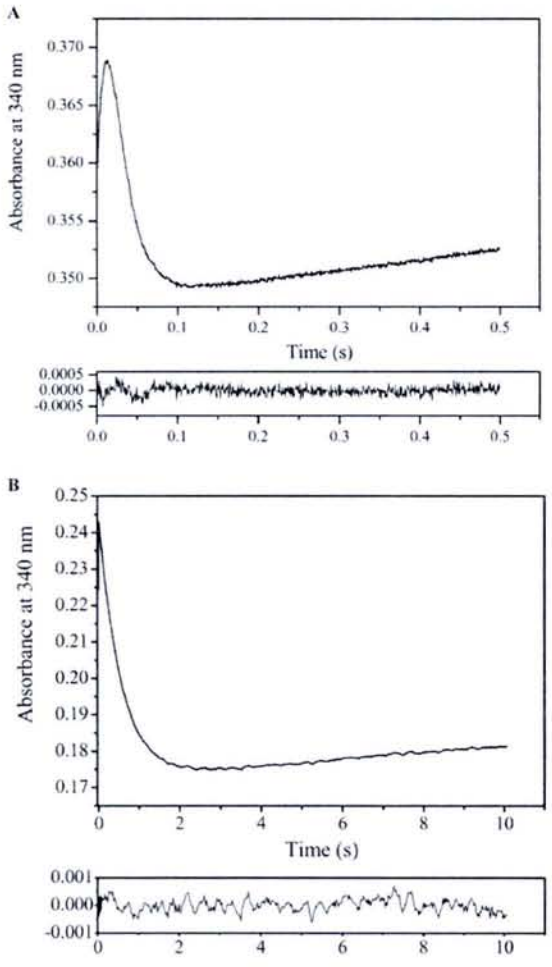


Figure 7 Representative transient for the determination of (A) the NADH dissociation rate and (B) the decarboxylation rate from the wild-type thioacylenzyme intermediate with MMSA as substrate

(**A**) A solution of 7.5 μM LDH, 20 mM pyruvate and 1 mM MMSA was rapidly mixed with an equal volume of 7.5 μM 'activated'-MSDH and 4 mM NAD. Both syringes contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2. Under the same experimental conditions, the rate of oxidation of free NADH by LDH was shown to be 130 s^{-1}. Data collected were best fitted to a triphasic expression using the Origin 7 software (Microcal), as shown by the lack of systematic deviation in the plot of residuals (lower panel). The first phase represents the acylation step, the second one the NADH consumption after its release from the thioacylenzyme–NADH complex and the third one could be due to the reverse LDH-catalysed reaction. The rate constants obtained for the global fitting are $72 \pm 1\ s^{-1}$, $56 \pm 1\ s^{-1}$, and $(3.00 \pm 0.07) \times 10^{-2}\ s^{-1}$ respectively. (**B**) The rate of the decarboxylation process was determinated at 30 °C from the thioacylenzyme intermediate by using the PEP/PEPC/MDH system as a coupled assay. Experimental conditions are described in detail in the Experimental section. Data collected using a split time-base (2000 points for the first 100 ms, and 2000 points for the remaining 10 s) were best fitted to a triphasic expression using the Origin 7 software as shown by the lack of systematic deviation in the plot of residuals (lower panel). The first phase represents the acylation step, the second one the bicarbonate release and the third one could be due to the reverse MDH-catalysed reaction. The rate constants obtained for the global fitting are $415 \pm 5\ s^{-1}$, $2.5 \pm 0.1\ s^{-1}$, and $(1.00 \pm 0.01) \times 10^{-3}\ s^{-1}$ respectively.

could also include a k_{ac}/K_S contribution. In fact, similar pK_{app} values were obtained (5.7 and 6.0) using MMSA and MSA respectively. As expected, data obtained from QCys MSDHs and a sub-saturating concentration of MMSA at 30 °C did not differ significantly from those of the wild-type MSDH, with similar pK_{app} and $k_{ac\ max}$, and K_S values that were decreased only 2.5-fold and 1.6-fold respectively (see comment, Table 3).

NADH release from the thioacylenzyme–NADH complex is not rate-limiting

The rate of NADH dissociation from the thioacylenzyme–NADH complex was determined using LDH as an NADH-trapping system. The experiment was performed using wild-type MSDH at pH 8.2 and 30 °C under pre-steady-state conditions and in the absence of CoA. The resulting progress curves were fitted to a triphasic expression: the first kinetic phase represents the burst of NADH production associated with the acylation process, whereas the second corresponds to the titration of the NADH that dissociates from the thioacylenzyme–NADH complex, and the third in which the rate is very low, could be due to the reverse LDH-catalysed reaction. Under the experimental conditions used (see Figure 7A), the rate of NADH oxidation by LDH (130 s^{-1}) was higher than the apparent rate constants of 56 s^{-1} (Figure 7A) and 50 s^{-1} (results not shown) determined for the second kinetic phase using MMSA and MSA as substrates respectively. Thus these apparent rate constants can be assigned to the NADH release from the thioacylenzyme–NADH complex. These rates – which are likely to be underestimated values of the intrinsic rates of NADH release – are 51-fold and 7-fold higher than the k_{cat} values using MMSA and MSA as substrates respectively.

Determination of the decarboxylation rate and identification of bicarbonate as a product of the MSDH-catalysed oxidation of MMSA

In the absence of CoA, HPLC analysis identified propionate and acetate as the products of the wild-type-catalysed reactions with MMSA and MSA as substrates respectively. This result suggested that the decarboxylation process precedes CoA-binding. To validate this assumption, a coupled assay was used to determine (i) the rate of the decarboxylation of the thioacylenzyme intermediate and (ii) whether carbon dioxide or bicarbonate is released as a final product. For this assay, PEPC was used as a bicarbonate (but not carbon dioxide)-trapping system to convert PEP into oxaloacetate, the reduction of which into malate by MDH was monitored by NADH disappearance at 340 nm (see Figure 7B). Again, this experiment was performed at pH 8.2 and 30 °C under pre-steady-state conditions and in the absence of CoA. A rate of 2.5 s^{-1} was found for the rate of bicarbonate formation. This value is much higher than the rate of noncatalysed hydration of carbon dioxide, which is approx. 0.04 s^{-1} at room temperature [18]. Therefore this demonstrates that bicarbonate is the end product of thioacylenzyme decarboxylation. Moreover, the rate of bicarbonate formation is similar to the k_{cat} values of wild-type and QCys MSDH-catalysed reactions (Table 2). Indeed, as described in Table 2, k_{cat} values were expressed per subunit taking into account four active subunits per tetramer. If we consider the half-of-the-sites reactivity, the 'true' k_{cat} value is 2.2 s^{-1}.

DISCUSSION

MSDH from *B. subtilis* exhibits a marked lag-phase in activity assays. Binding of NAD to the apo-form promotes an activation step that converts the enzyme from an inactive form to an active one. Thus a conformational rearrangement is likely to accompany the activation process. This is supported by a modification of the Trp^{468} environment as shown by the additional time-dependent fluorescence quenching observed upon NAD binding. Inspection of known three-dimensional structures of non-phosphorylating CoA-independent ALDHs [1–3] shows that position 468 is located at the dimer interface. Therefore the change in the Trp^{468} fluorescence properties in MSDH likely reflects a local rearrangement within the dimer interface. However, the molecular and

© 2006 Biochemical Society

structural factors which are responsible for MSDH activation remain to be characterized. In this context, a coenzyme-induced disorder-to-order transition of the loop containing residue 468, similar to that reported by Hurley et al. [19] on the human mitochondrial ALDH2, is a possibility. The observation that after one turnover the lag is suppressed suggests that MSDH undergoes structural imprinting. *In vitro*, this imprinting appears to be promoted only by NAD. No effect is observed in the presence of MMSA that would support a kinetic mechanism whereby NAD acts as the first-binding substrate followed by MMSA (or MSA) as the second substrate. The lag-phase observed with MSDH has already been reported for yeast ALDH, for which the rate of the conformational rearrangement induced by NADP-binding was shown to be accelerated in the presence of Mg^{2+} [20,21]. However, this is not a general feature since the MSDH-activation process does not exhibit such a dependence towards divalent cations such as Mg^{2+} or Ca^{2+} (results not shown). The question regarding the physiological significance of the lag-phase in MSDH still remains to be addressed.

MSDH from *B. subtilis* exhibits a half-of-the-sites reactivity. That is supported by the stoichiometry of NADH formation of 2 moles per tetramer in the absence of CoA. Since the presence of CoA had no effect on the rate of the acylation step, the value of 2 moles of NADH per tetramer is representative of what occurs in the presence of CoA. The half-of-the-sites reactivity shows that only two active sites per tetramer are functional and therefore raises the question as to whether two populations of active sites already pre-exist in the apo- and holo-enzymes. This seems to be the case at least for the catalytic Cys^{302}. First, kinetic data obtained for the apo-QCys MSDH, using 2PDS as a specific cysteine probe, reveal the contribution of two Cys^{302} species exhibiting a pK_{app} of approx. 8.7, but different reactivities. Second, formation of the holo-form induces an at least 230-fold decrease in the reactivity of two Cys^{302} residues per tetramer with a pK_{app} shift from approx. 8.7 to 7.9, whereas it has little effect on the reactivity and the pK_{app} of the two remaining Cys^{302} residues. The IAM inactivation data, from which a pK_{app} of 8.1 was determined, provide strong evidence for the assignment of the 7.9 pK_{app} to the Cys^{302} belonging to the two 'active' subunits.

Among the non-phosphorylating ALDH family members, there are few that share this property of the half-of-the-sites reactivity. It has been considered as an extreme example of negative co-operativity [19,22], but the structural basis for this co-operativity is still not understood. Studies of the tetrameric human liver mitochondrial ALDH have led to the proposal of a model where there is one functioning and one non-functioning subunit in each dimer pair [22]. It is tempting to apply such a model to the tetrameric MSDH from *B. subtilis*.

The k_{ac}-versus-pH curve fits to a monosigmoidal profile with a pK_{app} between 5.4 and 6.0 depending on the substrate used. To be active, Cys^{302} of MSDH should exist in the deprotonated form. Since the transient hemithioacetal intermediate is not protonated, due to the presence of an oxyanion hole, the pK_{app} value of 5.4–6.0 can be assigned to Cys^{302}. It is also expected that in the pH range 5–8.5, the carboxyl group of the substrate does not contribute to the k_{ac}-versus-pH curve as the protein environment composed of Arg^{124} and Arg^{301} (C. Stines-Chaumeil, unpublished work) is likely to decrease its pK_{app} to a value of less than 4.5. The pK_{app} of 5.4–5.7 for Cys^{302} in the ternary NAD–MMSA–MSDH complex strongly suggests that formation of the ternary complex induces an additional local conformational rearrangement within the active site, leading to a decrease of the Cys^{302} pK_{app} value by more than 2 units, when compared with the MSDH–NAD binary complex. Thus the Cys^{302} activation mode appears to be sequential in MSDH from *B. subtilis* with a Cys^{302} pK_{app} shift from approx. 8.8 in the apo-form to approx. 8.0 in the binary complex and finally 5.4–5.7 in the ternary complex. A notable feature of this activation process is the low reactivity of the two catalytic Cys^{302} residues in the holo-form. However, this does not prevent the acylation step from being fast and not rate-limiting.

As shown in the Results section, the acylation process is not rate-limiting because the acylation rate, determined in the presence or absence of CoA, is much higher – at least 350-fold – than the k_{cat} value. Thus the rate-limiting step follows NADH production, although one needs to bear in mind that *in vitro* the 'true' rate-limiting process is associated with the structural imprinting reaction (the kinetic studies can be considered as representative of the *in vivo* situation in *B. subtilis*. Indeed, the NAD concentration is likely to be such that MSDH is in an MSDH–NAD form). The fact that the apparent dissociation rate constants for NADH release from the thioacylenzyme–NADH complex were higher than the k_{cat} values showed that this step is not rate-limiting and occurs prior to transthioesterification. Thus the rate-limiting step is associated with either the β-decarboxylation step, the transthioesterification, the release of the product or any of the potential conformational changes. In fact, the β-decarboxylation process is likely to be rate-limiting for the overall reaction. This is supported by the value of $2.5\ s^{-1}$ for the rate of bicarbonate formation determined with MMSA as a substrate, which is similar to the k_{cat} value (see Table 1). The fact that bicarbonate is the end product of the thioacyl enzyme decarboxylation is confirmed by the values of the decarboxylation rate which are similar in the presence or absence of carbonic anhydrase. The question which now arises is related to the MSDH-catalysed formation of the bicarbonate. A possible mechanism would result in the direct release of bicarbonate product as proposed for the β-ketoacyl synthase domain of a multifunctional fatty acid synthase [23]. An alternative mechanism would require the inclusion of an additional step for hydration of carbon dioxide after decarboxylation. Finally, our studies also show that the decarboxylation step occurs on the thioacylenzyme intermediate, and thus leads to formation of a new thioacylenzyme species that should be competent to undergo a nucleophilic attack by a CoA molecule to form the activated-CoA ester product. The proposed ping-pong mechanism (Scheme 2) is in accordance with the kinetic mechanism described for the acetaldehyde and the succinate dehydrogenases, which also belong to the CoA-dependent ALDH family [24,25].

As indicated in the Introduction section, the MSDH from *B. subtilis* belongs to the structural family of the non-phosphorylating ALDHs. However, as shown in the present study, MSDH from *B. subtilis* exhibits several peculiar properties when compared with GAPN from *Streptococcus mutans*, a CoA-independent ALDH extensively studied by our laboratory. First, the lag-phase exhibited during the enzymatic turnover in MSDH is absent in GAPN. Second, the Cys^{302} activation mode is different. As described above, the ternary-complex formation is essential for full Cys^{302} activation in MSDH. In GAPN, the scenario is clearly different. Formation of the NADP–GAPN binary complex is sufficient to achieve full activation of the catalytic Cys^{302}, although addition of the substrate kinetically favours formation of a competent ternary complex [8]. Thus it appears that among the non-phosphorylating ALDH family, evolution has led to different solutions to achieve the chemical activation of the catalytic Cys^{302}. Third, both tetrameric enzymes are composed of two populations of non-equivalent active sites, but in GAPN all the subunits are functional although they differ in catalytic efficiency (A. Pailot, personal communication). Finally, MSDH exhibits two other major differences: its active site is adapted to catalyse a β-decarboxylation of the substrate and a transthioesterification

© 2006 Biochemical Society

process. This explains why the ordered kinetic mechanism of GAPN, in which NADPH dissociates last, is not relevant to the MSDH mechanism in which NADH release precedes the transthioesterification. In this context, it would be informative to know how the CoA molecule is recognized by MSDH and in particular whether and how the NADH- and CoA-binding sites overlap with each other. Determination of the three-dimensional structures of MSDH from *B. subtilis* in complex with its different co-substrates will be very informative.

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the University Henri Poincaré Nancy I, the IFR 111 Bioingénierie and local funds from the Région Lorraine. We are indebted to Dr S. Rahuel-Clermont for participating in the early stages of this work. We are grateful to S. Boutserin for her very efficient technical help, and Dr Nicolas Brosse for his help with MMSA synthesis. We also thank Drs Van Dorsselear and G. Chevreux for MS determination. We also thank Dr S. Sonkaria for careful reading of the manuscript before publication.

REFERENCES

1 Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. and Wang, B. C. (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. Nat. Struct. Biol. **4**, 317–326
2 Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. and Hurley, T. D. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. Structure **5**, 701–711
3 Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A. (1999) Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J. Mol. Biol. **290**, 161–173
4 Farres, J., Wang, T. T., Cunningham, S. J. and Weiner, H. (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. Biochemistry **34**, 2592–2598
5 Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. and Meighen, E. (1995) Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an $NADP^+$-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. Biochemistry **34**, 16725–16732
6 Wang, X. and Weiner, H. (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. Biochemistry **34**, 237–243
7 Vedadi, M. and Meighen, E. (1997) Critical glutamic acid residues affecting the mechanism and nuclotide specificity of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. Eur. J. Biochem. **246**, 698–704
8 Marchal, S. and Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Biochemistry **38**, 12950–12958
9 Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. and Aubry, A. (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J. Mol. Biol. **300**, 141–152
10 Marchal, S., Rahuel-Clermont, S. and Branlant, G. (2000) Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Biochemistry **39**, 3327–3335
11 Manjasetty, B. A., Powlowski, J. and Vrielink, A. (2003) Crystal structure of a bifunctionnal aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**, 6992–6997
12 Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A. and Sokatch, J. R. (1992) Characterization of the mmsAB operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. J. Biol. Chem. **267**, 13585–13592
13 Leal, N. A., Havemann, G. D. and Bobik, T. A. (2003) PduP is a coenzyme-A-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella enterica serovar Typhimurium* LT2. Arch. Microbiol. **180**, 353–361
14 Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T. and Fujita, Y. (1997) Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, iol, of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **179**, 4591–4598
15 Kupiecki, F. P. and Coon, M. J. (1960) Methylmalonic semialdehyde. Biochem. Prep. **7**, 69–71
16 Dubourg, H., Stines-Chaumeil, C., Didierjean, C., Talfournier, F., Rahuel-Clermont, S., Branlant, G. and Aubry, A. (2004) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **D60**, 1435–1437
17 Mellor, G. W., Thomas, E. W., Topham, C. M. and Brocklehurst, K. (1993) Ionization characteristics of the Cys-25/His-159 interactive system and of the modulatory group of papain: resolution of ambiguity by electronic perturbation of the quasi-2-mercaptopyridine leaving group in a new pyrimidyl disulphide reactivity probe. Biochem. J. **290**, 289–296
18 Liu, M., Sergienko, E. A., Guo, F., Wang, J., Tittmann, K., Hübner, G., Furey, W. and Jordan, F. (2001) Catalytic acid-base groups in yeast pyruvate decarboxylase. 1. Site-directed mutagenesis and steady-state kinetic studies on the enzyme with the D28A, H114F, H115F, and E477Q substitutions. Biochemistry **40**, 7355–7368
19 Hurley, T. D., Perez-Miller, S. and Breen, H. (2001) Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Chem. Biol. Interact. **130–132**, 3–14
20 Dickinson, F. M. (2003) Conformational changes and activation of yeast aldehyde dehydrogenase by various agents. Chem. Biol. Interact. **143–144**, 169–174
21 Dickinson, F. M. (1996) The purification and some properties of the Mg^{2+}-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. **315**, 393–399
22 Zhou, J. and Weiner, H. (2000) Basis of half-of-the-sites reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Biochemistry **39**, 12019–12024
23 Shone, C. C. and Fromm, H. J. (1981) Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. Biochemistry **20**, 7494–7501
24 Söhling, B. and Gottschalk, G. (1993) Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. Eur. J. Biochem. **212**, 121–127
25 Witkowski, A., Joshi, A. K. and Smith, S. (2002) Mechanism of the β-ketoacyl synthase reaction catalyzed by the animal fatty acid synthase. Biochemistry **41**, 10877–10887

Received 16 September 2005/6 December 2005; accepted 7 December 2005
Published as BJ Immediate Publication 7 December 2005, doi:10.1042/BJ20051525

© 2006 Biochemical Society

4. Questions qui restent posées suite à ce travail

L'analyse et l'interprétation de nos différents résultats laissent un certain nombre de questions sans réponse :

- Quels sont les facteurs structuraux et/ou moléculaires impliqués dans le processus d'activation de la MDSH mis en évidence par l'existence d'une phase de latence ?
- Quels sont les facteurs structuraux et/ou moléculaires impliqués dans les propriétés de réactivité de demi-site ?
- Quel est le mécanisme détaillé de la β-décarboxylation ? Le bicarbonate est-il directement produit ou bien l'hydratation du CO_2 est-elle catalysée par l'enzyme ?
- Quel environnement protéique est impliqué dans la stabilisation du groupement carboxylate des subtrats ? Les résidus invariants R124 et R301 sont-ils impliqués ? Quel(s) rôle(s) peuvent-ils jouer dans le processus de décarboxylation ?
- L'étape de transthioestérification ne peut être étudiée puisqu'elle est située après l'étape de décarboxylation qui est limitante. Quels sont les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance du CoA ? Quelle est la nature de l'environnement protéique permettant l'abaissement du pK_{app} du groupement thiolate du CoA et son positionnement adéquat nécessaire à une transthioestérification efficace ?

PARTIE II :

Etude des sites de spécificité structurale

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

1. Spécificité de substrat

1.1. Stratégie

Comme dans les GAPN, les résidus R124 et R301 sont invariants dans les MSDH. Ceci est déduit des alignements des structures primaires des MSDH caractérisées biochimiquement avec le consensus de GAPN (Figure 29). Il a été montré que ces deux arginines dans la GAPN de *S. mutans* étaient impliquées dans le positionnement et la reconnaissance du substrat G3P, notamment au niveau de la stabilisation du phosphate (voir Introduction page 35). Il était donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que dans les MSDH ces deux résidus pouvaient être impliqués dans la reconnaissance et la stabilisation du groupement carboxylate des substrats MMSA ou MSA et/ou dans le positionnement du substrat pour former un complexe Michaelien efficace.

Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons généré les mutants R124L, R301L ainsi que le double mutant R124L/R301L puis étudié l'impact de ces substitutions sur l'efficacité de la catalyse.

```
                        124                 301
Homo sapiens            DVFRGLQVVEHA    FGAAGQRCMALST
Rattus norvegicus       DVFRGLQVVEHA    FGAAGQRCMALST
Pseudomonas fluorescens DIFRGLEVVEHA    FGAAGQRCMATSV
Brucella melitensis     DIQRGLEVVEVC    YGSAGERCMAISV
Pseudomonas aeruginosa  DVWRGIEVVEHA    VGAAGQRCMAISV
Streptomyces coelicor   EVARGLEIVDLA    YGSAGERCMAISA
Bacillus subtilis       EVGRGIENVEFA    FGSAGERCMACAV

Consensus MSDH          DV RGLEVVE A    FG AGQRCMA S
Consensus GAPN          EV R  D         F      RC
Consensus ALDH          D        RY     F N GQ C A SR
```

Figure 29 : Alignement partiel de séquence autour des résidus R124 et R301 des MSDH et comparaison avec les autres ALDH non-phosphorylantes.
Les séquences de 7 MSDH caractérisées biochimiquement ont été prises en compte. L'alignement de séquence a été réalisé à l'aide du logiciel Bioedit et la numérotation des acides aminés a été faite suivant la nomenclature de Weiner (Wang et Weiner, 1995). Les résidus arginines, conservés dans les MSDH et les GAPN, sont surlignés en noir. 19 séquences de GAPN et 40 séquences d'ALDH (à l'exception de GAPN) issues des banques de données EMBL, Swiss-Prot, GenBank™, et Pir ont été alignées pour déterminer deux consensus représentatifs. Seuls les résidus conservés à plus de 95% sont mentionnés.

1.2. Etude des propriétés enzymatiques des mutants R124L, R301L et R124L/R301L

Les paramètres cinétiques déterminés pour les différents mutants à l'état stationnaire sont rassemblés dans le tableau 2. La substitution des résidus R124 et R301 par un résidu leucine conduit à une diminution importante de la vitesse globale de la réaction par rapport à

celle de l'enzyme de type sauvage. Les affinités apparentes pour le substrat MMSA et le NAD^+ sont augmentées pour les mutants R124L et R301L alors que l'affinité apparente pour le CoA est diminuée d'environ 5 fois pour ces deux mutants. Les paramètres cinétiques n'ont pas pu être déterminés pour le double mutant R124L/R301L à cause de la trop faible valeur de k_{cat} (inférieur à 10^{-2} s^{-1}). Les études réalisées en cinétique rapide indiquent que pour l'ensemble des mutants générés l'étape limitante de la réaction reste associée à la désacylation. De plus, le fait d'observer un saut de production de NADH correspondant à 2 moles par tétramère montre que les trois mutants présentent des propriétés de réactivité de demi-site comme cela a été montré pour le type sauvage.

	K_M MMSA (mM)	K_M CoA (µM)	K_M NAD^+ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	Etape limitante
Type sauvage	0,06 ± 0,01	120 ± 20	2,30 ± 0,06	1,1 ± 0,1	Désacylation
R124L	0,006 ± 0,001	570 ± 70	0,06 ± 0,01	0,030 ± 0,005	Désacylation
R301L	0,023 ± 0,005	620 ± 80	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	Désacylation
R124L/R301L	nd	nd	nd	$< 10^{-2}$	Désacylation

Tableau 2 : Paramètres cinétiques déterminés pour les mutants R124L et R301L
nd : non déterminé car k_{cat} trop faible
Les paramètres cinétiques ont été déduits à partir des jeux de données expérimentales par régression non-linéaire suivant le modèle de Michaelis-Menten ; les valeurs de k_{cat} sont exprimées par sous-unités (en considérant quatre sous-unités actives par tétramère). La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à 30 °C dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 8,2 avec des enzymes préalablement activées par le NAD^+.

1.3. Etude de l'étape d'acylation pour les mutants R124L, R301L et R124L/R301L

Les études réalisées en cinétique rapide montrent que, pour les mutants, aucune saturation n'est observable avec le substrat MMSA (tableau 3), contrairement au type sauvage pour lequel un K_S de 3,6 mM a pu être déterminé. Les substitutions R124L, R301L et R124L/R301L conduisent donc à une forte diminution de l'affinité apparente pour le MMSA. Ces résultats reflètent l'importance des résidus R124 et R301 dans la fixation du substrat MMSA.

	K_S MMSA (mM)	k_{obs} max (s^{-1})	k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)
Type sauvage	3,5 ± 1,0	1200 ± 180	$3,33.10^5$
R124L	> 15	/	6000
R301L	> 15	/	5400
R124L/R301L	> 15	/	650

Tableau 3 : Constantes de vitesse de second-ordre k_2 et constantes d'affinité apparente K_S de l'étape d'acylation pour le type sauvage et les mutants R124L, R301L et R124L/R301L.
Les mesures ont été réalisées à 30°C en cinétique rapide et en absence de CoA dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 8,2 ; en présence de 8 µN (en sites) d'enzyme, préalablement activée avec du NAD^+ 2 mM, et d'une concentration de MMSA variant de 0 à 12 mM. Pour le type sauvage, l'ajustement des données expérimentales par régression non linéaire à l'équation (1) a permis la détermination par extrapolation d'un K_S de 3,5 ± 1 mM pour le MMSA et un $k_{obs\ max}$ de 1200 ± 180 s^{-1}. Par contre, seule une constante de vitesse de second-ordre k_2 a pu être déterminée pour les trois mutants.

$$k_{obs} = k_{obs\ max} . [S] / K_S + [S] \qquad \text{éq. (1)}$$

La comparaison des constantes de vitesse de second-ordre k_2 entre les mutants et le type sauvage indique que l'efficacité de l'étape d'acylation est diminuée respectivement d'un facteur 55 et 62 pour les mutants R124L et R301L, et d'un facteur 512 pour le double mutant R124L/R301L. Ceci indique que les étapes conduisant à la formation de l'intermédiaire thioacylenzyme sont au moins 55 fois moins efficace que pour le type sauvage. Ces étapes incluent la reconnaissance du substrat MMSA, l'attaque nucléophile de la C302 sur la fonction aldéhyde en C1 ainsi que le transfert d'hydrure. Cette faible efficacité pourrait s'expliquer par une attaque nucléophile non efficace de la C302 sur la fonction aldéhyde du substrat due par exemple à une augmentation de son pK_{app} par rapport au type sauvage ou à un positionnement relatif de la fonction aldéhyde par rapport à la C302 non optimal pouvant conduire à un transfert d'hydrure moins efficace. Dans le but d'écarter ou de valider la première hypothèse, une étude de la variation de la constante de vitesse de second-ordre k_2 en fonction du pH a été réalisée. Cette étude n'a été réalisée que pour le mutant R124L à sous-saturation en MMSA. Le résultat obtenu indique que cette vitesse apparente dépend d'un seul groupement ionisable de pK_{app} 5,9 (Figure 30) proche du pK_{app} de 5,7 déterminé pour la C302 dans le type sauvage dans des conditions expérimentales similaires.

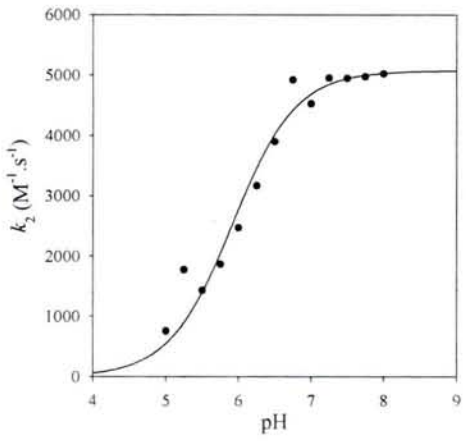


Figure 30 : Variation de la constante de vitesse de second-ordre k_2 en fonction du pH pour le mutant R124L de la MSDH de *B. subtilis*.
Les constantes de vitesse associées à l'étape d'acylation (k_{obs}) ont été mesurées à 30 °C en cinétique rapide en absence de CoA, dans un polytampon composé de succinate 22 mM, imidazole 29 mM, diéthanolamine 29 mM à une force ionique constante de 60 mM. Les mesures ont été réalisées sur le mutant R124L préalablement activé en présence de 2 mM de NAD^+ et 4 mM de MMSA. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde par régression non linéaire. Un pK_{app} de 5,9 ± 0,1 et un $k_{2\ max}$ de 5100 ± 200 $M^{-1}.\ s^{-1}$ ont été déterminés.

Le pK_{app} de 5,9 peut donc être attribué à la C302, le groupement carboxylate du substrat devant, de par son environnement protéique composé des arginines 124 et 301, avoir un pK_{app} très bas sans doute inférieur à 4. L'efficacité de l'étape d'acylation étant comparable dans les trois mutants, il est probable qu'un résultat identique aurait été obtenu avec les mutants R301L et R124L/R301L. Une comparaison de nos résultats avec ceux obtenus sur GAPN de *S. mutans* permet d'affiner nos interprétations. En effet, il a été montré que le résidu R124 de GAPN était impliqué uniquement dans la reconnaissance du groupement phosphate en C_3 du substrat D-G3P, la substitution R124L se traduisant par une diminution de l'efficacité de l'étape d'acylation d'un facteur 16, dû à un effet K_S. Par contre, la substitution des résidus R301 et R459, avait conduit à une diminution d'un facteur 10^5 de l'efficacité de l'étape d'acylation indiquant un rôle des deux arginines non seulement dans la fixation du groupement phosphate en C_3 mais aussi dans le positionnement et l'orientation corrects du D-G3P vis-à-vis de la C302. Dans la MSDH, les effets observés sur la constante de vitesse k_2 pour les trois mutants sont beaucoup moins drastiques suggérant un rôle majeur des résidus R124 et R301 au niveau de la fixation du substrat *via* leur interaction avec le groupement carboxylate, la diminution de la constante de vitesse résultant principalement d'une augmentation du K_S.

1.4. Détermination d'une constante de vitesse apparente de relargage du NADH du complexe thioacylenzyme-NADH.

La caractérisation cinétique de l'étape d'acylation des trois mutants, montre que, même à sous-saturation en substrat, la vitesse apparente de formation du NADH est largement supérieure au k_{cat} démontrant que l'étape limitante pour les trois mutants était située après le transfert d'hydrure. Elle pouvait être associée au relargage du cofacteur réduit, à la décarboxylation, à l'étape de transthioestérification, au relargage du produit ou encore à des changements conformationnels potentiels de l'enzyme. Nous avons donc entrepris de déterminer une constante de vitesse apparente de relargage du NADH à partir du complexe thioacylenzyme-NADH en utilisant une approche expérimentale identique à celle décrite pour le type sauvage dans l'article 2. L'utilisation du système couplé pyruvate/lactate déshydrogénase nous a permis de déterminer des k_{off} apparents pour chacun des trois mutants. Les valeurs mentionnées dans le tableau 4 sont très certainement largement sous-estimées par rapport aux constantes de vitesse de relargage intrinsèque, les expériences n'ayant pu être réalisées qu'à une concentration sous-saturante de MMSA au niveau de l'étape d'acylation. Cependant, malgré ces conditions, les k_{off} apparents mesurées sont largement supérieurs aux valeurs de k_{cat} d'un facteur 20 à 96 selon les mutants. Ceci montre que la vitesse de relargage du NADH du complexe thioacylenzyme-NADH n'est pas limitante pour ces mutants comme nous l'avons montré pour le type sauvage (voir article 2).

	k_{off} apparent NADH (s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})
Type sauvage [(a)]	57	1,1
R124L	2,4	0,03
R301L	1,5	0,07
R124L/R301L	1,0	$< 10^{-2}$

Tableau 4 : Constantes de vitesse apparentes de relargage du NADH du complexe thioacylenzyme-NADH pour les mutants R124L, R301L et R124L/R301L.
Les k_{off} apparents ont été mesurés à 30°C en cinétique rapide et en absence de CoA dans un tampon phosphate 50 mM pH 8,2. Une solution de 30 µN de lactate déshydrogénase, 20 mM de pyruvate et 1 mM de MMSA a été mélangée à un volume équivalent d'une solution contenant 30 ou 60 µN de MSDH activée et 4 mM de NAD^+. Dans les mêmes conditions expérimentales, la constante de vitesse d'oxydation du NADH libre par la lactate déshydrogénase est de 130 s^{-1}. Le traitement des données expérimentales est détaillé dans l'article 2. [(a)] valeurs tirées de l'article 2.

1.5. Identification des produits de la réaction en présence de CoA

L'analyse des produits de la réaction en présence de MMSA et de CoA a été réalisée par chromatographie échangeuse d'anions à l'aide d'une colonne source 15Q Pharmacia® couplée à un système Äkta Explorer Amersham®. L'élution des produits présents dans le mélange réactionnel a été effectuée par un gradient de KCl dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 8,2. L'utilisation de témoins a permis d'identifier le PPCoA comme produit de la réaction catalysée par les mutants R124L et R301L (pour le double mutant R124L/R301L, les conditions expérimentales n'ont pas permis de détecter le PPCoA, le k_{cat} étant trop faible (< 10^{-2} s^{-1}) pour permettre son accumulation). Les résultats obtenus pour les mutants R124L et R301L prouvent que la réaction de décarboxylation a bien lieu.

1.6. Etudes cinétiques du type sauvage et des mutants avec le propionaldéhyde comme substrat

1.6.1. Stratégie

Le propionaldéhyde (PPA) est un substrat non naturel de la MSDH. L'intérêt d'effectuer des études cinétiques avec ce substrat est qu'il ne possède pas de groupement carboxylate par rapport au substrat naturel MMSA (Figure 31), ce qui permet de s'affranchir de l'étape de β-décarboxylation du substrat dans la réaction globale. De plus, l'intermédiaire thioacylenzyme formé sera identique à celui obtenu avec le substrat MMSA après l'étape de décarboxylation. Cette étape étant limitante pour la MSDH de type sauvage, l'utilisation du PPA devait permettre d'appréhender l'étape de transthioestérification par le CoA et de valider nos interprétations concernant le rôle des résidus R124 et R301 dans la fixation du(des) substrat(s) naturel(s) *via* la stabilisation du groupement carboxylate. En effet, la substitution des résidus R124 et R301 ne devrait pas conduire à des modifications significatives des paramètres cinétiques obtenus avec le PPA pour la MSDH de type sauvage.

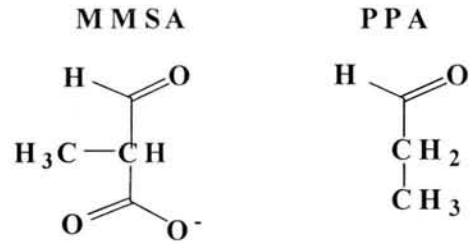


Figure 31 : Représentation schématique des substrats MMSA et PPA

1.6.2. Les constantes cinétiques à l'état stationnaire

Les valeurs de K_M et de k_{cat} déterminées en présence de CoA sont rassemblées dans le tableau 5. Les résultats obtenus montrent que la substitution R124L conduit seulement à une diminution d'un facteur ~ 4 du k_{cat} et de l'affinité apparente pour le CoA par rapport au type sauvage alors que les K_M pour le NAD^+ et le PPA sont inchangés. Pour le mutant R301L, les paramètres cinétiques n'ont pas pu être déterminés avec précision à cause de la diminution d'un facteur supérieur à 10 de l'affinité apparente pour le CoA. Cependant, la vitesse globale de la réaction catalysée par ce mutant est du même ordre de grandeur que celle déterminée pour le mutant R124L et le type sauvage.

	K_M PPA (mM)	K_M CoA (µM)	K_M NAD^+ (µM)	k_{cat} (s^{-1})	étape limitante	k_{cat} (MMSA) (s^{-1})
Type sauvage	9,8 ± 0,3	85 ± 10	33 ± 13	6,3 ± 0,1	désacylation	1,1 ± 0,1
R124L	9,3 ± 1,1	330 ± 35	38 ± 1	1,4 ± 0,2	désacylation	0,030 ± 0,005
R301L	nd[a]	> 1000[a]	nd[a]	> 1,5[a]	désacylation	0,07 ± 0,01

Tableau 5 : Paramètres cinétiques déterminés pour le type sauvage et les mutants R124L et R301L

[a] La forte augmentation du K_M pour le CoA n'a pas permis de se placer à une concentration saturante en CoA pour déterminer avec précision les autres paramètres cinétiques. La valeur de k_{cat} pour le mutant R301L est par défaut supérieure à 1,5 s^{-1}.
Les paramètres cinétiques sont déduits à partir des jeux de données expérimentales par régression non-linéaire suivant le modèle de Michaelis-Menten ; les valeurs de k_{cat} sont exprimées par sous-unités (en considérant quatre sous-unités actives par tétramère). La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à 30 °C dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 8,2 avec des enzymes préalablement activées par le NAD^+.

Nos résultats montrent également que le k_{cat} avec le PPA est plus élevé d'un facteur environ 6 pour le type sauvage par rapport à celui déterminé avec le MMSA. Le fait que la vitesse de formation du NADH soit plus rapide que le k_{cat} (voir paragraphe suivant) suggère que le k_{cat} de 6,3 s^{-1} correspond à la constante de vitesse associée à l'étape de trans-thioestérification. Ceci suppose, comme cela a été démontré pour le type sauvage, que la vitesse de relargage du NADH du thioacylenzyme ne soit pas limitante. Cette hypothèse, quoique très raisonnable, demande à être validée. Le fait que le k_{cat} déterminé pour les mutants R124L et R301L soit peu modifié par rapport à celui du type sauvage, suggère un comportement de ces mutants semblable à celui du type sauvage. Seule reste à expliquer la

diminution d'affinité apparente du CoA pour le mutant R301L. Enfin, le fait que le k_{cat} pour le mutant R124 soit 47 fois plus rapide avec le PPA comme substrat qu'avec le MMSA est un fort argument en faveur de l'intervention des arginines 124 et 301 en vue de faciliter la β-décarboxylation et la formation du bicarbonate comme produit final (voir Partie discussion).

1.6.3. Etude de l'étape d'acylation

Pour le type sauvage, les études réalisées en cinétique rapide montrent, comme attendu, que l'affinité apparente pour le PPA est drastiquement diminuée (facteur 720) par rapport au MMSA avec un K_S de 2,6 M et un $k_{obs\ max}$ de 120 s^{-1} (figure 32). Pour les mutants R124L et R301L, aucune saturation n'a été observée avec le PPA.

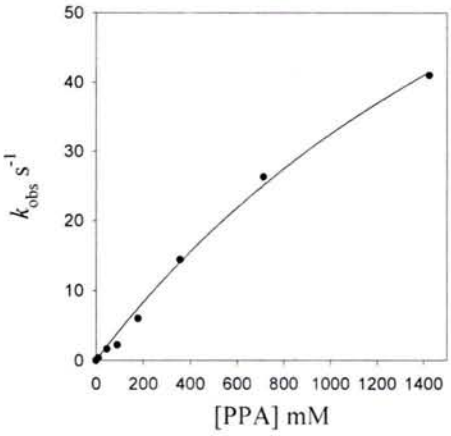


Figure 32 : Etude de la variation de la constante de vitesse associée à l'étape d'acylation (k_{obs}) en fonction de la concentration en PPA pour le type sauvage de la MSDH.
Les constantes de vitesse associées à l'étape d'acylation (k_{obs}) ont été mesurées à 30 °C en cinétique rapide en absence de CoA, et à pH 8,2 dans un polytampon composé de succinate 22 mM, imidazole 29 mM, diéthanolamine 29 mM à une force ionique constante de 60 mM. Les mesures ont été réalisées en présence de 8 µN de MSDH de type sauvage préalablement activée, de NAD^+ 2 mM et d'une concentration de PPA variant de 0 à 1,4 M. L'ajustement des données expérimentales par régression non linéaire à l'équation (1) (page 73) a permis la détermination par extrapolation d'un K_S de 2,6 ± 0,6 M pour le PPA et un $k_{obs\ max}$ de 120 ± 20 s^{-1}.

La comparaison des constantes de vitesse de second-ordre k_2 entre les mutants R124L et R301L et le type sauvage indique une efficacité de l'étape d'acylation avec le PPA comparable pour les trois enzymes (Tableau 6). Un tel résultat conforte nos précédentes interprétations concernant le rôle des résidus R124 et R301 dans la stabilisation du groupement carboxylate.

	K_S PPA (M)	K_S MMSA (mM)	$k_{obs\ max}$ (s^{-1}) PPA	k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$) PPA	k_2 ($M^{-1}.s^{-1}$) MMSA
Type sauvage	2,6 ± 0,6	3,5 ± 1,0	120 ± 20	36	$3,33.10^5$
R124L	> 3	>15	/	110	6000
R301L	> 3	>15	/	114	5400

Tableau 6 : Constantes de vitesse de second-ordre k_2 et constantes d'affinité apparente K_S de l'étape d'acylation pour le type sauvage et les mutants R124L et R301L.
Les mesures ont été réalisées à 30°C en cinétique rapide et en absence de CoA dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 8,2 ; en présence de 8 µN (en sites) d'enzyme, préalablement activée, de NAD^+ 2 mM, et d'une concentration de PPA ou de MMSA variant de 0 à 1,4 M ou de 0 à 12 mM respectivement. Pour le type sauvage, l'ajustement des données expérimentales par régression non linéaire à l'équation (1) page 73 a permis la détermination par extrapolation d'un K_S de 2,6 ± 0,6 et un $k_{obs\ max}$ de 120 ± 20 pour le PPA ou un K_S de 3,5 ± 1 mM pour le MMSA. Par contre, seule une constante de vitesse de second-ordre k_2 a pu être déterminée pour les deux enzymes mutées.

Une étude de la variation de la constante de vitesse apparente k_{obs} en fonction du pH a été réalisée pour le type sauvage à sous-saturation en PPA. Le résultat obtenu indique que la constante de vitesse apparente dépend d'un seul groupement ionisable de pK_{app} 6,0 (Figure 33).

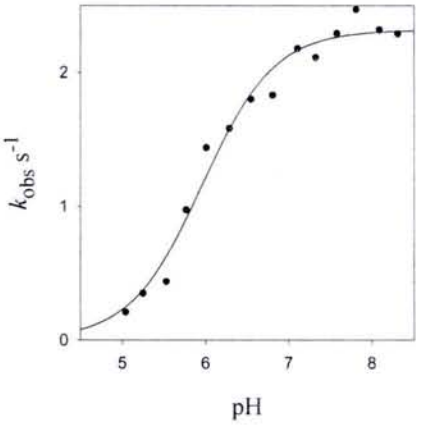


Figure 33 : Variation de la constante de vitesse apparente k_{obs} en fonction du pH pour le type sauvage de la MSDH de *B. subtilis* avec le PPA comme substrat.
Les constantes de vitesse associées à l'étape d'acylation (k_{obs}) ont été mesurées à 30 °C en cinétique rapide en absence de CoA, dans un polytampon composé de succinate 22 mM, imidazole 29 mM, diéthanolamine 29 mM à une force ionique constante de 60 mM. Les mesures ont été réalisées sur le type sauvage préalablement activé en présence de 2 mM de NAD^+ et 50 mM de PPA. Les points expérimentaux ont été ajustés à une équation de type monosigmoïde par régression non linéaire. Un pK_{app} de 6,0 ± 0,1 et un $k_{obs\ max}$ de 2,3 ± 0,1s^{-1} ont été déterminés.

Comme le PPA ne porte aucune fonction ionisable, le pK_{app} de 6,0 peut être attribué à la C302. Ce résultat confirme que, pour le type sauvage, la diminution de l'efficacité de l'étape

d'acylation d'un facteur 10^4 par rapport au substrat MMSA n'est pas due à une augmentation du pK_{app} de la C302, mais résulte probablement d'un positionnement non optimal de la fonction aldéhyde du PPA vis-à-vis de la fonction thiolate de la C302 pouvant conduire éventuellement à un transfert d'hydrure moins efficace sur le pyridinium du NAD^+.

2. Evolution de site actif de la MSDH : introduction d'une activité hydrolytique

2.1. Stratégie

Les résultats cinétiques obtenus pour le type sauvage de la MSDH montrent que le site actif est adapté pour le CoA mais pas pour activer une molécule d'eau puisque l'hydrolyse est très peu efficace avec un k_{cat} de l'ordre de 10^{-3} s^{-1}. Un autre volet de l'étude a donc consisté à essayer de modifier par ingénierie protéique la spécificité d'accepteur d'acyle de la MSDH en vue d'introduire une activité hydrolytique efficace.

Les ALDH non-phosphorylantes, sauf celles CoA-dépendantes, possèdent un résidu E268 invariant qui joue un rôle essentiel dans l'étape d'hydrolyse (voir introduction page 35). La stratégie a donc été d'introduire un résidu glutamate dans le site actif de la MSDH CoA-dépendante et d'étudier l'impact de cette substitution sur l'efficacité de l'étape de désacylation. Dans la séquence de la MSDH de *B. subtilis*, ce résidu E268 est substitué par un résidu leucine non conservé. De plus, l'inspection de l'alignement des séquences des ALDH non-CoA et CoA-dépendantes (Figure 34), et la comparaison des structures tridimensionnelles de la MSDH de *B. subtilis* (Dubourg, communication personnelle) avec les différentes formes de la GAPN de *S. mutans* (Figure 35) a révélé un environnement différent de la position 268. En effet, cet environnement est plus hydrophobe dans le site actif de la MSDH de *B. subtilis*. Hormis le résidu L268, les résidus W177, M178 et V244 invariants dans les MSDH ont pu être identifiés. Le résidu W177 est également conservé dans les ALDH non-CoA dépendantes mais dans GAPN un résidu Ser est retrouvé à cette position. En fait, la chaîne latérale du résidu W177 adopte un positionnement similaire à celui du résidu R459 impliqué dans le positionnement et l'orientation du substrat G3P dans GAPN. Par contre, les résidus M178 et V244 sont remplacés par les résidus K178 et T244 dans les ALDH non-CoA dépendantes, la position 178 étant très fortement conservée alors que la position 244 est invariante. Enfin, le résidu L427 invariant dans les ALDH non-CoA dépendantes est remplacé par un résidu asparagine dont le rôle serait de stabiliser le groupement carboxamide de la

partie nicotinamide du cofacteur NAD^+. Le tableau 7 récapitule les positions conservées dans les ALDH non-CoA dépendantes ou les MSDH.

```
                          178      244          268      427          465
Homo sapiens              PAMIPLWMFP  ISFVGSNKAG  KRVQANMGAK  PYGNGTAIFT  PVPLPMFSFT
Rattus norvegicus         PAMIPLWMFP  ISFVGSNQAG  KRVQANMGAK  PYGNGTAIFT  PVPLPMFSFT
Pseudomonas fluorescens   PAMIPLWMFP  VSFVGSTAVG  KRVQSMMGAK  PFGNGTGLFT  PVPVPFFSFT
Brucella melitensis       PAMIPLWKAG  IGFVGSTPIA  KRVQCFGGAK  EFGNGVAIFT  PVPIAYYTFG
Pseudomonas aeruginosa    PAMIPLWMFP  VSFVGSVAVG  KRVQSFAGAK  PYGNGTSIFT  PVPLPFFSFT
Streptomyces coelicor     PAMVPLWMFP  VSFVGSTPIA  KRVQALGGAK  PFGNGTAIFT  PVPVGYHSFG
Bacillus subtilis         PMMVPCWMFP  ISFVGSKPVG  KRVQSLTGAK  EFANGACLFT  PAPMAFFPFS
Consensus MSDH            PAMIPLWMFP  ISFVGS   G  KRVQ   GAK  P GNGT IFT  PVP   FSF
Consensus GAPN            P NL  SKIA  I FTG    G  P    ELGGK  G  LQ  VFT  RG D  FPF
Consensus ALDH            PL    WK    AFTGST VG   VTLELGGK  G  LAA VFT        PFG
                                        ▲           ▲          ▲            ▲
```

Figure 34 : Alignement partiel de séquences comprenant des résidus proches spatialement de la position 268 (voir aussi figure 35).
Les séquences de 7 MSDH caractérisées biochimiquement sont prises en compte. L'alignement de séquence a été réalisé à l'aide du logiciel Bioedit et la numérotation des acides aminés est en accord avec la nomenclature de Weiner (Wang et Weiner, 1995). Les résidus seulement conservés dans les MSDH sont surlignés en noir. Les triangles noirs indiquent le résidu 268 et les positions proches spatialement de ce résidu. 19 séquences de GAPN et 40 séquences d'ALDH (à l'exception de GAPN) issues des banques de données EMBL, Swiss-Prot, GenBank™, et Pir ont été alignées pour déterminer deux consensus représentatifs. Seuls les résidus conservés à plus de 95% sont mentionnés.

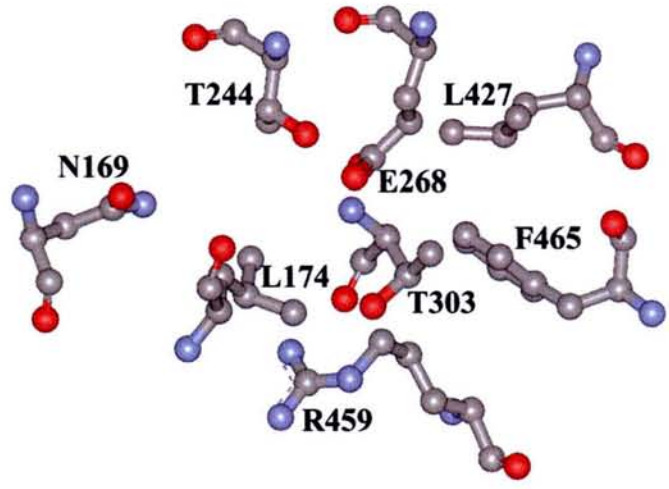


Figure 35 : Représentation schématique du site actif de la GAPN de *S. mutans* (d'après Cobessi et *al.*, 2000).
Pour des raisons de lisibilité seules les chaînes latérales des résidus constituant l'environnement de la position 268 ont été représentées.

ALDH non-CoA dépendantes	MSDH
E268	X
K178	M178
T244	V244
L427	N427
F465	F465

Tableau 7 : Positions conservées dans le site actif des MSDH ou des ALDH non-CoA dépendantes.
Remarque : Le résidu K178 n'est pas localisé à proximité immédiate de la position 268 mais dans GAPN, et probablement dans les autres ALDH non-CoA dépendantes, la liaison hydrogène établie entre les chaînes latérales des résidus K178 et T244 est indispensable au maintien d'une architecture du site actif compatible avec la catalyse (Pailot, communication personnelle).

Cette approche rationnelle de la problématique nous a conduit à générer un certain nombre de mutants multiples car il était évident que la seule substitution L268E ne serait pas suffisante pour permettre l'introduction d'une activité hydrolytique efficace.

2.2. Résultats préliminaires

Dans un premier temps, l'étude des propriétés cinétiques du mutant L268E a montré que l'introduction d'un résidu Glu n'avait pas d'effet drastique sur la vitesse de la réaction globale en présence de CoA avec une diminution d'un facteur 20. Nous avons également montré que l'étape d'acylation n'était pas limitante et que le mutant L268E présentait des propriétés de réactivité de demi-site comme le type sauvage. Par contre, l'activité hydrolytique n'était pas améliorée.

La plupart des mutants générés à savoir L268E/W177S, L268E/V244T/M178K, L268E/V244T/M178K/W177S ont tous présenté une activité trop faible pour que les paramètres cinétiques puissent être déterminés. Seul le double mutant L268E/V244T a pu être étudié partiellement. L'étape d'acylation reste efficace avec un k_{obs} seulement diminué d'un facteur 4 par rapport au type sauvage. De plus, les affinités apparentes pour le substrat, le

CoA et le NAD^+ ne sont pas modifiées. Par contre, le k_{cat} est diminué d'un facteur 10 en présence de CoA alors que l'activité hydrolytique n'a pas été améliorée.

Nos résultats bien que préliminaires montrent que toute substitution va probablement conduire à une perturbation au moins locale de l'architecture du site actif et qu'il sera impossible d'introduire une activité hydrolytique efficace. Une alternative consisterait à envisager une approche d'évolution dirigée qui potentiellement pourrait nous permettre de convertir une ALDH CoA dépendante en ALDH non-CoA dépendante. Cependant, une telle approche sera difficile à mettre en œuvre du fait de la nécessité de disposer d'un test de criblage suffisamment sensible pour permettre la détection d'une activité « hydrolytique » sur des extraits bruts.

Nos études ont montré que le mécanisme catalytique de la MSDH de *B. subtilis* implique une étape d'activation NAD^+-dépendante qui se traduit par l'existence d'une phase de latence lors des tests d'activité. Une réorganisation conformationnelle du site actif avec une vitesse de 0,18 min^{-1} accompagne la levée de cette phase de latence avec un abaissement du pK_{app} de la C302 catalytique d'environ 8,7 à 7,9. Le fait que l'addition de MMSA ou de MSA seul n'a aucun effet sur la durée du temps de latence est en faveur d'un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel la fixation du NAD^+ précède celle du substrat. Ceci est confirmé par le fait que l'addition de MMSA de façon concomitante au NAD^+ n'accélère pas le processus d'activation. La formation du complexe ternaire MSDH/NAD^+/substrat amène à un abaissement supplémentaire du pK_{app} de la C302 de 7,9 à environ 5,5. Ces résultats suggèrent une réorganisation structurale locale supplémentaire au niveau du site actif lors de la formation du complexe ternaire indispensable à l'activation optimale de la C302.

L'étape d'acylation a été montrée être non limitante pour la réaction globale avec un k_{ac} > à 1000 s^{-1} largement supérieur aux valeurs de k_{cat} de 1,1 et 6,7 s^{-1} déterminées respectivement avec le MMSA et le MSA. Elle est aussi indépendante de la présence de CoA. L'efficacité de cette étape implique nécessairement un positionnement adéquat de la fonction aldéhyde du substrat qui est plane par rapport au thiolate du C302. Ceci doit être en partie assuré par les deux résidus invariants R124 et R301 dont le rôle est de stabiliser le groupement carboxylate du substrat. L'attaque nucléophile de la C302 sur la fonction aldéhyde conduit alors à la formation de l'intermédiaire tétraédrique thiohémiacétal dont la charge négative est stabilisée par la présence d'un site de reconnaissance oxyanion composé de la chaîne latérale du résidu invariant N169 et du NH de la chaîne principale des résidus 302 et 303. Le transfert d'hydrure vers le C_4 de la partie nicotinamide du cofacteur peut alors se faire sans assistance basique, comme cela a été montré pour GAPN de *S. mutans* (Cobessi *et al.*, 2000). Nous avons également montré que les étapes de relargage du cofacteur réduit NADH et de β-décarboxylation précédaient la liaison du CoA. L'analyse cinétique approfondie de chacune de ces étapes a permis de montrer que le relargage du NADH est non limitant et précède le processus de décarboxylation qui représente l'étape cinétiquement limitante de la réaction globale. Cette étape de décarboxylation conduit à la libération de bicarbonate et génère un nouvel intermédiaire thioacylenzyme qui doit être compétent pour subir l'attaque nucléophile de la molécule de CoA et produire l'ester de CoA qui sera ensuite libéré.

L'ensemble de nos résultats est donc en faveur d'un mécanisme cinétique de type ping-pong (Figure 35) comme cela a été montré pour l'acétaldéhyde déshydrogénase et la succinate déshydrogénase (Shone et Fromm, 1981 ; Söhling et Gottschalk, 1993).

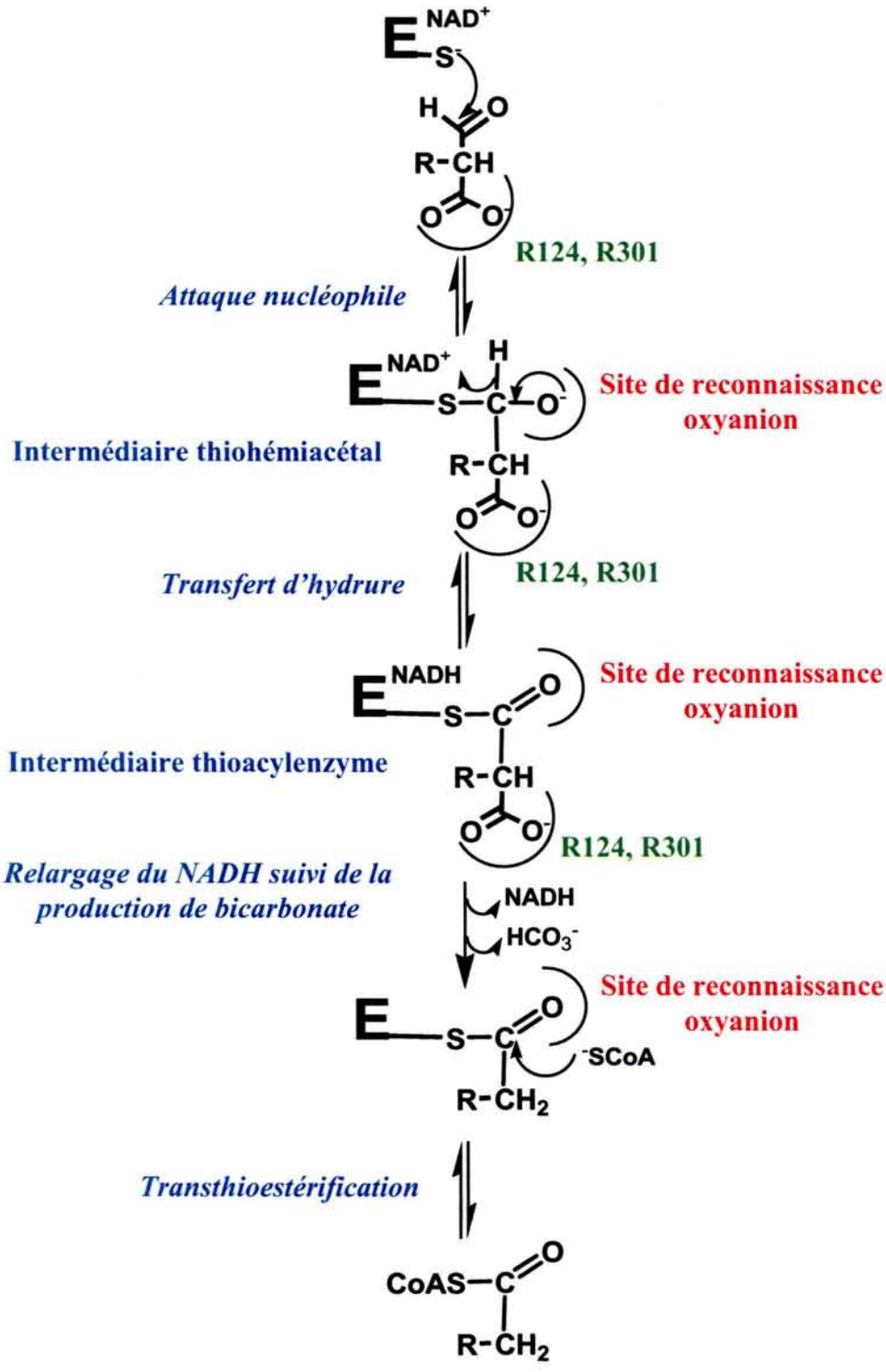


Figure 35 : Représentation schématique du mécanisme proposé pour les réactions catalysées par la MSDH de *B. subtilis*.
R représente un groupement CH_3 pour le MMSA et le PPCoA alors qu'il représente un atome d'hydrogène pour le MSA et l'acétylCoA.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos études cinétiques préliminaires sont d'ailleurs en accord avec ce mécanisme et montrent qu'il existe une inhibition par le CoA et le NAD^+ dont il faudra tenir compte dans le traitement des données. A ce stade, il reste à déterminer l'ordre de fixation des différents substrats pour définir le type de mécanisme ping-pong suivi par la MSDH. L'approche consistera à effectuer des expériences de compétition par les produits de la réaction afin de pouvoir totalement le valider.

Ce mécanisme amène plusieurs commentaires. Bien que nos expériences aient clairement permis de montrer que le processus de décarboxylation constituait l'étape limitante de la réaction globale, il est évident qu'*in vitro* celle-ci est associée à l'étape d'activation de la MSDH par le NAD^+. Par contre, il est probable qu'*in vivo* la concentration intracellulaire de NAD^+ permette l'existence d'une forme activée de la MSDH. De plus, le fait que la phase de latence associée à ce processus d'activation disparaisse après un seul cycle catalytique montre que la MSDH subit un phénomène « d'empreinte structurale » qui est initié par la liaison du NAD^+ à l'apoenzyme. Une phase de latence avait déjà été décrite pour l'ALDH cytosolique de levure. Pour cette ALDH, le changement conformationnel induit par la liaison du cofacteur est accéléré par la présence d'ions Mg^{2+}(voir Introduction page 33), ce qui n'est pas le cas de la MSDH pour laquelle l'étape d'activation ne semble pas dépendre de cations divalents comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+}.

Nous avons montré que le mode d'activation de la C302 était séquentiel avec un abaissement progressif du pK_{app} de la C302 d'environ 8,8 dans l'apoenzyme à ~ 8,0 dans la forme holo puis à ~ 5,5 dans le complexe ternaire MSDH/NAD^+/substrat. Dans un contexte plus général, ce mode d'activation est clairement différent de celui décrit pour la GAPN de *S. mutans*. En effet, il a été montré que dans GAPN, la formation du complexe binaire GAPN/$NADP^+$ est suffisant pour permettre l'activation complète de la C302 bien que l'addition du substrat favorise cinétiquement la formation d'un complexe ternaire efficace (Marchal et Branlant, 1999). Ainsi, il apparaît qu'au sein de la famille des ALDH non-phosphorylantes, l'évolution a conduit à différentes solutions pour permettre une activation optimale de la C302 catalytique. La question qui reste posée concerne la nature des facteurs moléculaires et/ou structuraux impliqués dans l'activation de la C302 dans la MSDH. Il est probable que cette activation résulte de plusieurs effets additifs locaux comme cela a été montré pour GAPN (voir Figure 18 page 29). L'influence de la charge positive portée par le cycle pyridinium du cofacteur peut être exclue tout au moins au niveau du complexe binaire MSDH/NAD^+ car le pK_{app} de 7,8 déterminé pour la C302 dans le complexe binaire MSDH/NADH est similaire à la valeur d'environ 8,0 déterminée dans le complexe

MSDH/NAD^+. De même, l'implication des résidus R124 et R301 peut être aussi exclue. En effet, les valeurs du p*K*a de C302 déterminées à partir de la courbe décrivant la variation du k_{obs} de l'étape d'acylation en fonction du pH sont semblables dans l'enzyme sauvage et dans les enzymes où les résidus R124 et R301 ont été substitués. L'inspection de la structure tridimensionnelle d'un complexe binaire MSDH/NAD^+ (Dubourg H., communication personnelle) ne permet pas l'identification d'autres éléments structuraux mais il est possible que des groupements NH peptidiques ou le NH_2 de la chaîne latérale de N169 soient impliqués comme cela a été proposé pour GAPN.

Enfin, dans le cadre plus général des ALDH phosphorylantes et non-phosphorylantes, le mécanisme de type ping-pong que nous proposons se distingue du mécanisme séquentiel ordonné décrit pour les ALDH non-phosphorylantes non-CoA dépendantes. Pour ces dernières, un travail de collaboration entre notre groupe et l'équipe de Biocristallographie de Nancy I a très récemment conduit à l'obtention d'un complexe thioacylenzyme/NADPH de GAPN de *S. mutans*. L'analyse de la structure cristalline de ce complexe a permis de mettre en évidence l'isomérisation de la partie NMNH du cofacteur après le transfert d'hydrure (Figure 36 ; D'Ambrosio *et al.*, en révision). Cette isomérisation s'avère indispensable pour que le résidu E268 joue son rôle lors de l'étape d'hydrolyse et est en accord avec le mécanisme cinétique décrit dans lequel le cofacteur NAD(P)H se dissocie après le relargage du produit.

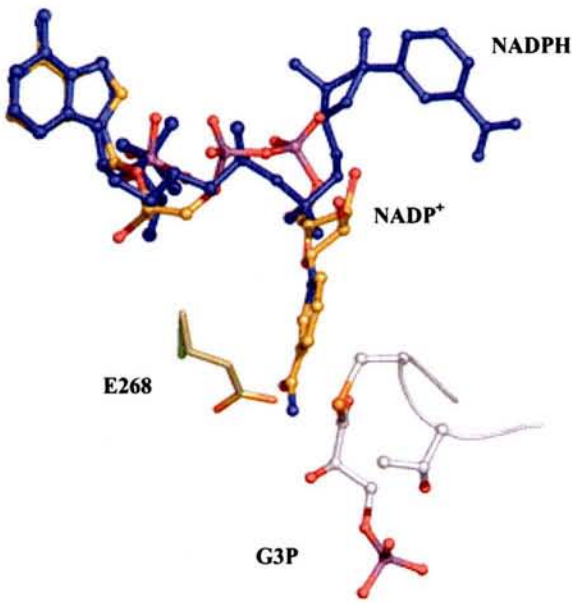


Figure 36 : Superposition des structures cristallines d'un complexe ternaire non covalent de la GAPN de *S. mutans* (Cobessi *et al.*, 2000) et de l'intermédiaire thioacylenzyme (D'Ambrosio *et al.*, en révision).
Les deux conformations adoptées par le cofacteur au cours de l'étape d'acylation ($NADP^+$) et de désacylation (NADPH) sont représentées et illustrent le basculement complet de la partie NMNH du cofacteur au cours de l'acte catalytique.

Le basculement complet de la portion NMNH est rendu possible par l'existence d'une large cavité qui est également retrouvée dans les structures des autres ALDH non-phosphorylantes non-CoA dépendantes et qui implique des résidus conservés. Il est donc raisonnable de postuler que l'isomérisation du cofacteur est partie intégrante du mécanisme catalytique de cette famille d'ALDH. A l'inverse, nos résultats montrent clairement qu'un tel basculement n'est pas nécessaire dans la MSDH puisque le relargage du NADH précède la liaison du CoA. Comment peut-on expliquer cette différence ? Une des hypothèses serait que les sites de fixation du CoA et du cofacteur NAD^+ se superposent au moins partiellement. Dans ce cas, le départ du NADH serait un préalable à la liaison du CoA. Pour répondre à cette question, il serait nécessaire de connaître la structure d'un complexe ternaire MSDH/NAD^+/CoA. Une alternative serait l'absence de la cavité décrite pour les ALDH non-phosphorylantes non-CoA dépendantes rendant impossible l'isomérisation du cofacteur réduit. L'inspection de la structure tridimensionnelle d'un complexe binaire MSDH/NAD^+ de *B. subtilis* montre qu'une cavité équivalente existe (Dubourg H., communication personnelle). La structure de la MSDH de *B. subtilis* étant quasiment superposable à celles des autres ALDH non-phosphorylantes, il est clair que l'évolution a conduit à deux solutions différentes pour permettre à la seconde étape du mécanisme catalytique des ALDH non-phosphorylantes d'être efficace. La question qui se pose alors concerne la nature des facteurs moléculaires et/ou structuraux responsables du départ « précoce » du NADH au cours de la réaction catalysée par la MSDH. Il est possible que la cavité présente dans la MSDH constitue la poche de liaison du CoA, ce qui empêcherait toute isomérisation du cofacteur. Dans ce contexte, la résolution de la structure d'un complexe MSDH/CoA s'avèrerait très informative. Enfin, se pose la question d'une éventuelle étape d'échange de cofacteur (relargage de NADH/entrée de NAD^+) précédant l'étape de transthioestérification. Ceci a déjà été proposé pour le mécanisme de la GAPDH qui est de type ping-pong comme pour la MSDH (Harrigan et Trentham, 1974). Dans ce cas, l'étape d'échange précèderait l'attaque nucléophile de l'intermédiaire thioacylenzyme par une molécule de phosphate inorganique. Cet échange n'est cependant pas la conséquence d'une gêne stérique empêchant la phosphorolyse de se faire. En fait, l'entrée d'une nouvelle molécule de NAD^+ aurait comme rôle de polariser la fonction carbonyle de l'intermédiaire thioacylenzyme avec comme conséquence de conduire à une accélération de la vitesse de l'étape de phosphorolyse.

Au cours de nos travaux, une étude cinétique approfondie du mécanisme catalytique de la MSDH a été entreprise. Néanmoins, l'étude des deux étapes caractéristiques de la réaction catalysée par les MSDH n'a été que partiellement abordée, c'est le cas de l'étape de

β-décarboxylation ; ou pas du tout abordée, c'est le cas de l'étape associée à la transthioestérification.

Au niveau de l'étape de décarboxylation, ce qui n'a pas été déterminé est le mécanisme qui conduit à la formation du bicarbonate. Un mécanisme possible conduit à un relargage direct de bicarbonate (mécanisme A Figure 37) et implique l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau activée sur la fonction carboxylate du substrat MMSA ou MSA conduisant à la formation d'un intermédiaire tétraédrique chargé négativement. La présence du site de reconnaissance oxyanion composé du résidu invariant N169 et du groupement NH-peptidique de la C302 favoriserait le relargage du bicarbonate. La protonation de l'intermédiaire énolate conduit alors à la formation d'un nouvel intermédiaire thioacylenzyme compétent pour l'étape de transthioestérification. Une alternative consisterait en la production de CO_2 également favorisée par la présence du site de reconnaissance oxyanion. L'hydratation du CO_2 en bicarbonate serait ensuite catalysée au niveau du site actif de la MSDH (mécanisme B Figure 37).

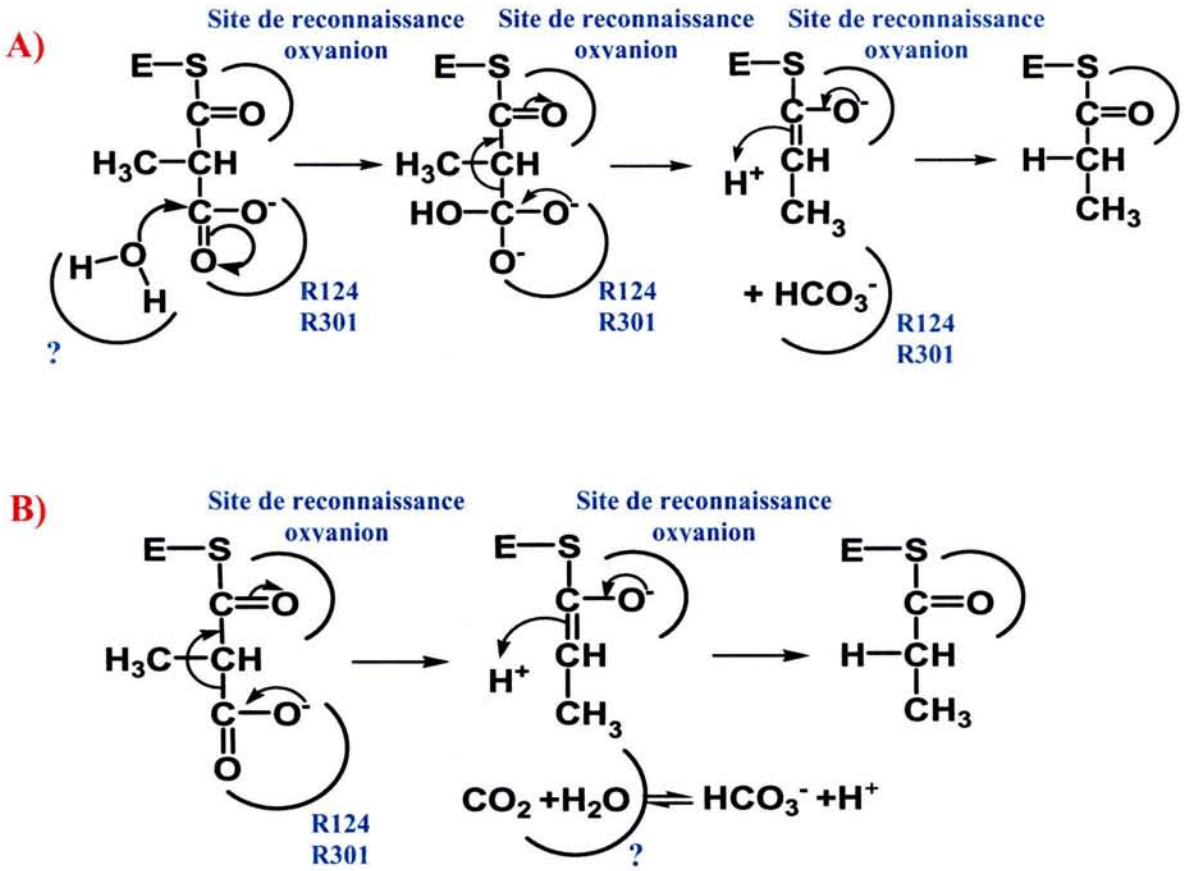


Figure 37 : Mécanismes proposés pour la réaction de décarboxylation catalysée par la MSDH de *B. subtilis*.

Les deux mécanismes impliquent une stabilisation de la fonction carboxylate du substrat et de l'intermédiaire tétraédrique formé dans le mécanisme A. Ceci pourrait être le rôle des résidus R124 et R301. En effet, les résultats obtenus sur les mutants R124L et R301L avec le substrat MMSA et le PPA (voir partie 2 des résultats) sont clairement en faveur d'un rôle de ces deux résidus arginines dans la stabilisation du groupement carboxylate. Dans ce cas, la vitesse associée à l'étape de décarboxylation devrait être affectée pour les deux mutants. Pour confirmer cette hypothèse, cette vitesse devra être déterminée par une approche identique à celle développée pour le type sauvage.

Dans les deux mécanismes, le site de reconnaissance oxyanion joue un rôle central dans la réaction de décarboxylation en polarisant la fonction carbonyle de l'intermédiaire thioacylenzyme. Dans le mécanisme A, le rôle des charges positives portées par les chaînes latérales des résidus R124 et R301 serait d'augmenter le caractère électrophile du carbone du groupement carboxylate et de bien le positionner pour permettre une attaque nucléophile efficace de la molécule d'eau. Un mécanisme similaire a récemment été décrit pour le domaine β-cétoacyl synthase d'une « fatty acid synthase » multifonctionnelle (Witkowski *et al.*, 2002). Dans le mécanisme B, le rôle des résidus R124 et R301 serait de placer le groupement carboxylate selon une orientation permettant de positionner la liaison C-C qui sera rompue, perpendiculairement aux orbitales π de la fonction carbonyle de l'intermédiaire thioacylenzyme. Ce mécanisme, impliquant un recouvrement d'orbitales maximal, est proche de celui proposé pour la méthylmalonylCoA décarboxylase. Pour cette enzyme, l'orientation adéquate du groupement carboxylate est assurée par une liaison hydrogène avec la chaîne latérale d'un résidu tyrosine (Benning *et al.*, 2000).

En l'état actuel de nos connaissances il n'est pas possible de valider ou d'exclure l'un ou l'autre de ces mécanismes. D'ailleurs, d'autres questions restent encore sans réponse :

- quel environnement protéique est impliqué dans le positionnement et l'activation de la molécule d'eau (mécanisme A) ?
- quelle est la nature du catalyseur acide permettant la protonation de l'espèce énolate générée (mécanismes A et B) ? Est-ce une molécule d'eau ou un résidu du site actif ?
- comment est catalysée l'hydratation du CO_2 en bicarbonate (mécanisme B) ?

Les deux mécanismes faisant intervenir au moins une molécule d'eau, si l'étape limitante pour la réaction de décarboxylation est associée à l'activation de cette molécule d'eau, la substitution de H_2O par D_2O devrait conduire à un effet isotopique de solvant. Ce n'est pas ce qui est observé, ce qui permet d'exclure cette hypothèse.

SCD - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Le deuxième point que notre étude n'a pas permis d'aborder est l'efficacité de l'étape de transthioestérification car cette étape est située après l'étape limitante qu'est l'étape de décarboxylation. Cependant, comme indiqué dans la partie 2 des Résultats, l'utilisation d'un analogue de substrat qui ne possède pas de groupement carboxylate comme le PPA pourrait apporter des éléments de réponse. En effet, les résultats préliminaires obtenus avec le PPA montrent que l'étape limitante est située après celle du transfert d'hydrure. Dans l'hypothèse raisonnable où le mécanisme cinétique avec le PPA reste de type ping-pong, il est probable que l'étape associée au relargage du cofacteur réduit n'est pas limitante. Cela devra bien sûr être validé par une approche similaire à celle utilisée avec le substrat naturel MMSA. La réaction d'oxydation du PPA en PPCoA ne faisant plus intervenir d'étape de décarboxylation, le processus limitant pour la réaction globale devrait être associé à la transthioestérification. Le fait que pour le type sauvage le k_{cat} déterminé avec le PPA soit augmenté d'un facteur environ 6 par rapport à celui déterminé avec le MMSA est en faveur de cette hypothèse. Dans ce cas, une étude de la variation de la vitesse globale de la réaction en fonction du pH nous permettrait d'accéder aux pK_{app} de groupements ionisables impliqués dans l'étape de transthioestérification. En particulier, le pK_{app} de la fonction thiolate du CoA, qui doit être activée, devrait pouvoir être déterminé. Dans ce contexte, il serait donc aussi très intéressant de déterminer la structure d'un complexe binaire MSDH/CoA ou d'un complexe ternaire MSDH/NAD^+/CoA. Cette connaissance pourrait permettre d'un côté d'identifier les facteurs moléculaires et structuraux impliqués dans la liaison du CoA et la nature du contexte protéique impliqué dans l'activation et l'orientation adéquates de la fonction thiolate du CoA pour une attaque efficace sur l'intermédiaire thioacylenzyme et d'un autre côté de comprendre pourquoi nos essais d'ingénierie en vue de transformer une ALDH SCoA-dépendante en une ALDH non-phosphorylante efficace mais non ScoA-dépendante ont échoué.

Enfin, nous avons montré que la MSDH de *B. subtilis* présente des propriétés de réactivité de demi-site avec deux sous-unités actives par tétramère. Parmi les ALDH non-phosphorylantes, cette réactivité de demi-site n'a été décrite que pour un petit nombre d'ALDH et a été interprétée comme un exemple extrême de coopérativité négative (Zhou et Weiner, 2000 ; Hurley *et al.*, 2001). Les études réalisées sur l'ALDH2 de foie humain et son variant oriental ont conduit à la proposition d'un modèle dans lequel seule une sous-unité serait active par dimère. Ce modèle est-il applicable à la MSDH ? Si un phénomène de coopérativité existe entre les deux monomères d'un même dimère, l'interface inter-monomère doit être impliquée. Nous avons indiqué précédemment que la fixation du NAD^+ sur la forme

apo de la MSDH conduit à une réorganisation structurale lente du site actif des monomères actifs (voir discussion de l'Article 2). Cette réorganisation conduit à une extinction de l'émission de fluorescence du résidu W468. L'inspection de la structure cristalline du complexe binaire MSDH/NAD^+ de *B. subtilis* indique que le W468 se situe à l'extrémité N-terminale d'un brin β qui suit une boucle de 23 résidus impliquée dans les contacts inter-monomères au sein d'un même dimère (Dubourg H., communication personnelle). Ainsi, la modification des propriétés de fluorescence du résidu W468 reflète-t-elle au minimum une réorganisation structurale de l'interface intra-dimère.

Des études antérieures menées au laboratoire par Arnaud Pailot sur la GAPN de *S. mutans* avaient montré que dans cette autre ALDH non-phosphorylante, les quatre sous-unités ne sont pas équivalentes. Contrairement à la MSDH de *B. subtilis*, cela ne se traduit pas par des propriétés de réactivité de demi-site strict. Par contre, l'étude de l'étape d'acylation en cinétique rapide montre que pour deux sous-unités la vitesse associée à cette étape est nettement supérieure à 1500 s^{-1} (et ne peut donc pas être déterminée avec précision par des techniques classiques en cinétique rapide), alors qu'elle est de l'ordre de 500 s^{-1} pour les deux autres sous-unités. La substitution F465Y dans GAPN conduit à la perte des propriétés de coopérativité, les quatre sous-unités devenant équivalentes avec une vitesse associée à l'étape d'acylation d'environ 120 s^{-1}. Comment expliquer ce résultat ? L'inspection des alignements de séquences de l'ensemble des ALDH et des structures cristallines disponibles indiquent que ce résidu invariant est localisé dans une boucle équivalente à celle décrite dans la MSDH (voir paragraphe précédent). Il est donc possible que la substitution F465Y ait entraîné une modification de la conformation de la boucle 445-467 même mineure, rendant les quatre sous-unités équivalentes en terme d'efficacité catalytique.

L'analyse de l'alignement des séquences de cette région indique la conservation de deux résidus Pro (P457 et P459) dans les MSDH, alors qu'un troisième résidu Pro est présent en position 453 sauf pour la MSDH de *B. subtilis* où on retrouve un autre résidu Pro mais en position 464 (Figure 38 page 94). Ce résidu P464 est également retrouvé dans GAPN. Il est d'ailleurs quasiment invariant dans les ALDH non-CoA dépendantes.

```
                          445                       467
Homo sapiens               V DVGQVGVNVP IPVPLPMFSF TG
Rattus norvegicus          V DVGQVGVNVP IPVPLPMFSF TG
Pseudomonas fluorescens    I DVGQVGINIP IPVPVPFFSF TG
Brucella melitensis        V QVGMVGINVP IPVPIAYYTF GG
Pseudomonas aeruginosa     I EVGQVGINIP IPVPLPFFSF TG
Streptomyces coelicor      I EAGMVGVNVP IPVPVGYHSF GG
Bacillus subtilis          I DAGMLGINLG VPAPMAFFPF SG
Consensus GAPN               E GTV IN     RG D FPF  G
Consensus ALDH               LAGTVW N           PF GG
```

Figure 38 : Alignement de séquences de la région 445-467 des MSDH caractérisées biochimiquement et comparaison avec d'autres ALDH.
Les résidus P457 et P459 invariants dans les MSDH sont écrits en bleu alors que le résidu P464 est écrit en vert. Les consensus GAPN et ALDH ont été déterminés comme indiqué dans la légende de la Figure 34 page 81.

Le nombre important de résidus Pro dans la boucle 445-467 doit entraîner des contraintes géométriques importantes qui vont fortement influencer sa conformation. Pour valider cette hypothèse, les trois résidus Pro de la MSDH de *B. subtilis* ont été substitués en Ala. Les résultats préliminaires obtenus sur les mutants P457A et P464A sont prometteurs dans la mesure où les quatre sous-unités deviennent fonctionnelles. Bien qu'il existe un différentiel important en terme d'efficacité de l'étape d'acylation entre les sous-unités, avec un $k_{obs} > 1000\ s^{-1}$ pour deux des sous-unités et d'environ $1\ s^{-1}$ pour les deux autres, ce résultat confirme l'importance de cette boucle dans l'expression des propriétés de coopérativité. Ceci a d'ailleurs été confirmé très récemment par des études sur l'ALDH2 (Larson *et al.*, 2005 voir introduction paragraphe 2.4.1.2 page 31). Il est maintenant nécessaire d'affiner la caractérisation cinétique des mutants P457A et P464A. De plus, la résolution de la structure tridimensionnelle d'un complexe binaire P464A-MSDH/NAD^+ ou P457A-MSDH/NAD^+ devrait s'avérer informative. En effet, la superposition de cette structure à celle du complexe binaire MSDH/NAD^+ de type sauvage pourrait permettre l'identification de facteurs moléculaires et/ou structuraux impliqués dans ce phénomène de communication inter-sous-unités.

Au niveau évolution, il est probable que ces propriétés de réactivité de demi-site (totale ou partielle) soient conservées dans l'ensemble des ALDH non-phosphorylantes. Qu'en est-il des ALDH phosphorylantes ? Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire sur la GAPDH, une ALDH phosphorylante homotétramérique, sont aussi en faveur de l'existence d'une réactivité de demi-site similaire à celle décrite précédemment pour GAPN. Ainsi, cette partie de notre étude dégage-t-elle des perspectives qui s'inscrivent dans une problématique plus générale en vue de caractériser les facteurs moléculaires impliqués au niveau des interfaces dans les propriétés de coopérativité de la superfamille des ALDH.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Plasmide et phage

pBluescript II SK $^{+}$ modifié au niveau du codon initiateur de la traduction: phagemide de 3kb contenant un fragment du gène codant la β-galactosidase d'*E. coli* qui permet la complémentation des souches portant *lacZ*ΔM15. Il porte également le gène responsable de résistance à l'ampicilline (amp^{r}) et l'origine de réplication du phage M13. La présence d'une cassette de clonage contenant des sites de restriction uniques et l'introduction d'un site *Nde*I au niveau de l'ATG permet le clonage du gène codant la protéine que l'on désire surexprimer.

pSKmsdbsub : plasmide recombinant pBluescript SK^{+} obtenu par clonage de la séquence codante du gène de la MSDH de *B. subtilis*.

1.2. Souche bactérienne

***E. coli* DH5α:** *sup*E44, Δ*lac*U169, (ϕ80 *lacZ*ΔM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1 (Hanahan, 1983). Cette souche est utilisée pour la préparation de plasmide, la mutagenèse dirigée et la production en erlenmeyers de la MSDH de type sauvage ou mutée.

1.3. Milieux de culture

Milieu riche LB :

Tryptone	10g/L
Extrait de levure	5g/L
NaCl	5g/L
H_2O distillée qsp	1L

pH ajusté à 7,5 par NaOH 10 N, autoclavé pendant 50 min à 1 bar

Milieu SOC (glucose) :

Bactotryptone	2% (p/v)
Extrait de levure	0,5%(p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
$MgSO_4$	10 mM
Glucose	20 mM

Pour les milieux solides, 15 g de bacto-agar sont ajoutés par litre de milieu de culture avant stérilisation. Pour la sélection des clones recombinants, de l'ampicilline est ajoutée à une concentration de 100 mg/L après stérilisation.

2. Techniques de génie génétique

2.1. Transformation des bactéries supercompétentes

La souche DH5α est rendue supercompétente grâce à la méthode de Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Une culture bactérienne est réalisée en milieu SOB à une température comprise entre 18 et 20°C, sous forte agitation. Cette dernière est arrêtée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO_{600nm} atteint 0,3-0,5 puis centrifugée. Le culot est alors repris dans une solution de TB froid (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, $MnCl_2$ 55 mM, pH 6,7). Après une incubation de 10 min dans la glace et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans $1/10^{ème}$ du volume initial de solution TB en présence de DMSO (7 % final). Des fractions aliquotes sont rapidement congelées par immersion dans de l'azote liquide et stockées à -80°C.

Pour la transformation, 50 ng d'ADN plasmidique sont mélangés à 50 µl de cellules supercompétentes. Le mélange est placé dans la glace pendant 30 min puis est soumis à un choc thermique de 30 s à 42°C et enfin, placé dans la glace pendant 5 min. Les cellules sont régénérées dans 200 à 400 µl de milieu SOC sous agitation pendant une heure à 37°C. Le mélange de transformation est ensuite étalé sur boite de Pétri LB contenant l'antibiotique de sélection (Amp) puis incubé à 37°C pendant une nuit.

2.2. Préparation de l'ADN

La minipréparation d'ADN est une technique utilisée pour la préparation rapide d'une faible quantité d'ADN (à partir de 2 à 5 ml de culture) dans un but d'analyse ou de criblage. Le protocole passe d'abord par la lyse alcaline des cellules grâce à une solution de NaOH 0,2 N SDS 1%. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution d'acétate de potassium/acide acétique, puis centrifugé. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors directement précipité par ajout d'éthanol à 100 %. Le culot ainsi obtenu est alors lavé à l'éthanol 70 % puis séché, et repris en tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. L'ADN plasmidique est finalement traité par la ribonucléase A ($1 \mu g.ml^{-1}$) avant d'être précipité par un

mélange PEG 20 %/NaCl 2,5M. Un kit de purification plasmidique (Qiagen) est utilisé pour les préparations en plus grande quantité.

2.3. Analyse de l'ADN

2.3.1. Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour « polymerase chain reaction »)

Afin de vérifier la présence du gène codant la MSDH sur le plasmide après mutagenèse ou clonage, la portion d'ADN comprise entre deux oligodésoxynucléotides fixés de part et d'autre du gène dans le plasmide est amplifiée, et sa taille est vérifiée par migration sur un gel d'agarose.

L'amplification est réalisée directement sur les cellules d'une colonie obtenue après mutagenèse ou clonage, déposées dans un microtube et auxquelles sont ajoutés un mélange de 2'-désoxynucléotide triphosphate (dNTP) et la polymérase ADN-dépendante thermostable de *Thermus aquaticus* (T*aq*-polymérase) :

Oligodésoxynucléotide 1	100ng
Oligodésoxynucléotide 2	100ng
Tampon PCR 10×	5µl
dNTP (1,25 mM de chaque)	8µl
T*aq*-polymérase (Boehringer)	2 unités
H_20 qsp	50µl

La réaction est effectuée dans un appareil Biorad, par répétition d'un cycle comprenant une étape de dénaturation (30 s à 94°C), une étape d'hybridation (30 s à 42°C) et une étape d'élongation (30 s à 74°C).

25µl du produit issu de la réaction de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) en présence d'un marqueur de taille.

2.3.2. Digestion par les enzymes de restriction

Pour vérifier la taille des plasmides et du fragment inséré, l'ADN est hydrolysé par des enzymes de restriction (Roche et Biolabs) à une concentration de 5 U/µg d'ADN pendant une à deux heures à 37°C dans les conditions d'utilisation décrites par le fournisseur. Les

fragments d'ADN hydrolysé sont ensuite séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (p/v).

2.3.3. Séquençage de l'ADN double brin

L'ADN double brin (db) a été séquencé suivant la méthode de Tabor et Richardson (Tabor et Richardson, 1987) en utilisant la sequenase (usb®). Cette technique a été utilisée pour la vérification de la séquence codante du gène de la MSDH de *B. subtilis* après insertion dans le vecteur d'expression plasmidique et après mutagenèse.

1ère étape : Dénaturation de l'ADN db circulaire

ADN plasmidique db	0,5 pmole
NaOH 2,5 N	2 µL
H_2O qsp	20 µL

2ème étape : Hybridation de l'amorce nucléotidique

Oligodésoxynucléotide	6 pmoles
NaAc 3M, pH 4,6	4 µL
Ethanol	75 µL

Le mélange est incubé 10 min à -80°C, puis centrifugé 15 min à 16000g.

Le culot est repris dans :

H_2O	8 µL
Tampon 5×	2 µL

(Tris-HCl 200 mM, $MgCl_2$ 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5)

Le mélange est incubé 2 min à 95 °C.

3ième étape : Elongation

Ajout de :

(α-^{33}P)dATP	5 µCi
dithiothréitol (DTT) 100 mM	1 µL
Sequenase	2 unités
Mélange d'extension 5×	2 µL

(dCTP, dGTP, dTTP 7,5 µM chacun)

Le mélange est incubé 5 min à température ambiante.

4ième étape : Arrêt de la réaction

Mélange précédent	3,5 µL
2',3'-didésoxynucléotide triphosphate (ddNTP)/dNTP (20 µM/200 µM)	2,5 µL

Le mélange est incubé 5 min à 37 °C. La réaction est stoppée par l'ajout de 3,5 µL de bleu de formamide. Les produits de la réaction sont fractionnés sur un gel de polyacrylamide dénaturant (polyacrylamide 6%/urée 8 M). Après migration, l'ADN est fixé sur le gel par trempage dans de l'acide acétique 10% (v/v). Les bandes d'ADN élongué sont révélées par autoradiographie.

2.4. Mutagenèse dirigée selon la réaction de PCR

2.4.1. Principe de la méthode

La méthode utilise l'ADN polymérase thermostable *Pfu* de *Pyrococcus furiosus* (six fois plus fidèle dans la réplication de l'ADN que la polymérase *Taq*) pour répliquer les deux brins du plasmide avec une grande fidélité et sans déplacer les oligodésoxynucléotides de mutagenèse.

Elle nécessite aussi un plasmide double brin superenroulé et un couple d'oligodésoxynucléotides de mutagenèse portant chacun la mutation à introduire. Les oligodésoxyribonucléotides, chacun complémentaire d'un des deux brins du plasmide, vont servir d'amorces 3'OH pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase *Pfu*, ce qui conduit à un plasmide muté aux extrémités non religuées.

Le produit d'amplification est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn*I (séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, pour digérer l'ADN parental et ainsi sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est *dam* méthylé et donc susceptible d'être digéré par *Dpn*I. Une fraction du mélange de digestion est utilisée pour transformer des bactéries DH5α supercompétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté et le répliquer (Figure 39 page 101).

2.4.2. Mutagenèse

1ère étape : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Plasmide db	100 ng
Oligodésoxynucléotide 1	125 ng
Oligodésoxynucléotide 2	125 ng
Tampon PCR 10×	5 µL
dNTP (1,25 mM de chaque)	1 µL
P*fu* polymérase (Boehringer)	2,5 unités
H_2O qsp	50 µL

La réaction est effectuée dans un appareil Biorad par répétition de 18 cycles, chaque cycle comprenant une étape de dénaturation (30 sec à 95°C), une étape d'hybridation (1 min à 55°C) et une étape d'élongation (10 min à 68 °C).

Le produit issu de la réaction de PCR est ensuite incubé dans la glace, de façon à ce que la température devienne inférieure à 37 °C.

2ième étape : Digestion du produit de la réaction de PCR

Produit de la PCR	50µL
D*pn*I	10 unités

Le mélange de digestion est ensuite incubé 2 heures à 37 °C.

3ième étape : Transformation des bactéries supercompétentes

La transformation est réalisée avec 5 µL du mélange de mutagenèse et 80 µL de bactéries DH5α supercompétentes. Les cellules sont étalées sur boîte LB avec Amp.

En général, une centaine de clones est obtenue par cette méthode avec un taux de mutation variant de 50 à 80 %. Les clones sont séquencés pour vérifier la présence de la mutation désirée et l'absence de toute autre mutation dans le gène *iol*A.

2.5. Technique de clonage

L'ORF du gène codant la MSDH de *B. subtilis* est amplifiée par la réaction de PCR à l'aide de deux oligodésoxyribonucléotides amorces contenant des extensions en 5' et en 3' de façon à introduire les sites de restriction *Nde*I au niveau du site d'initiation de la traduction en5' et *Sac*I en 3'. Le fragment d'ADN amplifié est hydrolysé par les enzymes de restriction

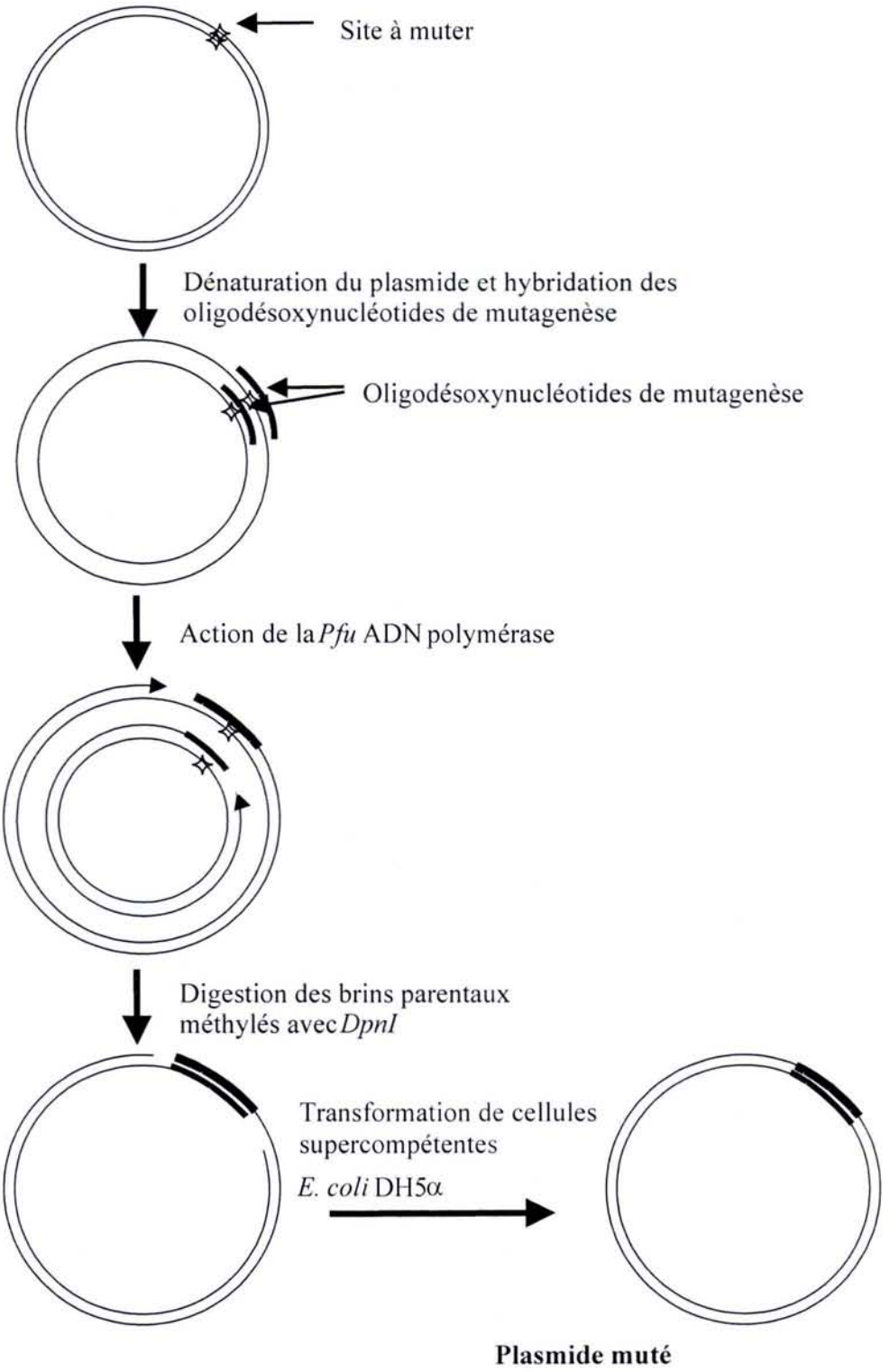


Figure 39: Principe de la mutagenèse par réaction de PCR.

*Nde*I et *Sac*I comme le vecteur pBluescript SK^+ où a été introduit un site *Nde*I. Les produits d'hydrolyse sont ensuite purifiés sur gel d'agarose 1 % (p/v) à l'aide du kit « Nucleospin extract » (Macherey-Nagel®). Un dixième de la quantité récupérée est déposé sur gel d'agarose pour analyse et estimation de la concentration finale.

La réaction de ligation est effectuée avec la T4 ADN ligase (1 U) (Roche) dans le tampon $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 66 mM, pH 7,6 en présence de 50 ng de vecteur hydrolysé et d'un excès molaire de 3 à 10 fois du fragment contenant l'ORF. Le mélange est incubé une nuit à 16°C. Après transformation de la souche *E. coli* DH5α par le mélange de ligation, les clones obtenus sont testés pour la présence de la séquence contenant l'ORF par la technique de PCR sur colonie. Les clones positifs sont soumis à une analyse de restriction puis à un séquençage pour vérifier l'absence de mutation au sein de la séquence codante. Le plasmide obtenu est appelé pSKmsdbsub.

3. Production, purification et caractérisation de l'enzyme MSDH

3.1. Production des enzymes MSDH de type sauvage et mutés

L'enzyme MSDH est produite dans la souche d'*E.coli* DH5α par le plasmide recombinant pSKmsdbsub portant le gène codant la MSDH sauvage ou mutée.

Les cultures sont ensemencées au $1/100^{ème}$ en milieu LB supplémenté en ampicilline (200mg/L). Elles sont incubées pendant 24 heures à 37 °C, sous agitation. Les cellules récoltées par centrifugation à 3000 g, sont lavées au tampon A (Saccharose 25 %, EDTA 5 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7,5) et stockées à –20 °C.

3.2. Purification

3.2.1. Eclatement des cellules et précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium

Le culot cellulaire, issu d'un litre de culture, est repris dans 20 mL de tampon de purification (KPi 50 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, pH 8,2) et broyé sous une pression de 1350 bars à l'aide d'un broyeur de cellules (ConstantSystems®). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 30000g pendant une heure.

Le surnageant est amené à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium, puis il est placé une heure à 4°C sous agitation. La protéine, restée en solution, est récupérée dans le surnageant après centrifugation pendant 45 min à 30000g puis le surnageant est amené à 80 %

de saturation en sulfate d'ammonium. A cette concentration en sel, l'enzyme précipite et une dernière centrifugation après une heure à 4°C sous agitation permet de la récupérer dans le culot.

3.2.2. Filtration sur gel

Le culot est repris dans un volume minimum de tampon de purification puis déposé sur une colonne de gel filtration ACA34 (acrylamide 3 %, agarose 4 %, BIOSEPRA) dont le domaine de fractionnement se situe entre 20 et 350 kDa. L'élution s'effectue dans le même tampon et est suivie par la lecture de la DO à 260 et à 280 nm. Les fractions contenant la protéine (fractions pour lesquelles le rapport DO_{280}/DO_{260} est proche de 1) sont rassemblées.

3.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions

La solution contenant l'enzyme MSDH est diluée pour obtenir une DO_{280} égale à 2 puis injectée sur une colonne Sépharose Q préparative (agarose 6 % comprenant des groupements triméthylammonium méthylés, Pharmacia®), équilibrée dans le tampon KPi 50 mM, pH 8,2 et couplée à un système FPLC (Pharmacia®). L'élution est réalisée par un gradient de KCl de 0 à 1 M dans le même tampon sous un débit de 5mL/min. Cette étape permet de séparer l'enzyme des fragments d'acides nucléiques ou d'autres contaminants protéiques encore présents après filtration sur gel. Les fractions contenant la protéine MSDH sont rassemblées et concentrées par filtration sous pression sur membrane Amicon YM30. A ce stade, la protéine MSDH est pure et peut être conservée à -20°C sous forme précipitée en présence de sulfate d'ammonium (90% de saturation) et de β-mercaptoéthanol 10 mM.

3.2.4. Caractérisation des enzymes MSDH de type sauvage et mutées

3.2.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

L'électrophorèse dénaturante permet de suivre l'évolution du degré de pureté de l'enzyme au cours de la purification (Laemmli, 1970). Après concentration des protéines par migration dans un gel à 5 %, celles-ci sont séparées suivant leur taille dans un gel à 10 %. Les échantillons sont dénaturés par chauffage avant dépôt et le gel, ainsi que le tampon d'électrophorèse (tampon glycine), contiennent du dodécylsulfate de sodium (SDS).

Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie R-250 à 0,2 % (p/v) ou par le nitrate d'argent, en fonction des quantités déposées sur le gel.

3.2.4.2. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire du monomère de la MSDH après purification est déterminée par spectrométrie de masse électrospray. Etant donné que cette technique nécessite un échantillon débarrassé de toute trace de sels, la solution de la protéine est injectée sur une HiPrep 26/10 Deasalting (Amersham Biosciences®) puis éluée par un flux isocratique de bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 7,5. L'échantillon lyophilisé est ensuite analysé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique UMR-CNRS-ULP 7509 à Strasbourg dirigé par le Dr Van Dorsselaer.

3.2.4.3. Détermination de l'état oligomérique : filtration sur gel Superose 12 couplée au système FPLC

Le support chromatographique de cette colonne est constitué de particules d'agarose réticulé de 10 µm de diamètre. Les pores représentent 55 % du volume et la gamme de séparation s'étend de 1 à 300 kDa. L'injection de l'échantillon protéique (0,5 mg ans 200 µL) est réalisé grâce à une boucle d'injection avec un débit de tampon phosphate (KPi 50 mM , KCl 150 mM, pH 8,2) de 0,2 mL/min. La colonne, d'une contenance de 23 mL, a été étalonnée avec un mélange de marqueurs de poids moléculaires. La détermination du volume mort (V_0) et du volume total (V_t), respectivement 6,9 et 18,2 mL, permet de calculer le coefficient de partition K_{av} selon l'équation $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ où V_e représente le volume d'élution de la protéine.

3.2.4.4. Mesure de la concentration

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant pour l'enzyme tétramérique un coefficient d'extinction de 51000 $M^{-1}.cm^{-1}$ déterminé à l'aide des méthodes de Lewis (Mach *et al.*, 1992) et de Gill et Von Hippel (Gill et Von Hippel, 1989) et de Scopes (Scopes, 1974)

3.2.4.5. Synthèse chimique du méthylmalonate semialdéhyde et du malonate semialdéhyde

3.2.4.5.1. Synthèse (Kupiecki et Coon, 1960)

100 g de Zinc en granulés et 25 ml de benzène sec sont chauffés à reflux jusqu'à ébullition. Une solution de 36,2 g d'éthyl 2-bromopropionate et 40 ml d'éthylorthoformate dans 75 ml de benzène sec sont ajoutés goutte à goutte pendant 45 min. La solution est chauffée à faible ébullition jusqu'à épaississement du mélange réactionnel, puis 75 g de Zinc sont ajoutés. Le mélange est chauffé à reflux pendant 6 heures. Il est ensuite placé dans une ampoule à décanter avec 200 ml d'éther et 100 g de glace. La solution est acidifiée par ajout d'acide acétique, puis la phase éthérée est lavée avec 150 ml d'eau et 150 ml de bicarbonate de sodium 5% froid. Les traces d'eau présentes dans la phase éthérées sont alors éliminées par ajout de sulfate de magnésium et distillation sous pression réduite. La purification du produit est réalisée par distillation fractionnée à 95-98°C sous une pression de 16 mm de mercure. Le produit est saponifié par ajout de soude 2 N pendant 5 heures sous agitation, puis acidifié par H_2SO_4 0,5 N pendant une heure. Le pH est ajusté à 4,75 par une solution de KOH 2N. Le MMSA est conservé à -80°C. A l'issue de la première étape de synthèse et purification par distillation fractionnée, 13,3 g de produit protégé sont obtenus, soit un rendement de 36% basé sur la quantité d'éthyl 2-bromopropionate de départ. Le spectre RMN montre que ce produit protégé sur la fonction acide et la fonction aldéhydique est pur. Pour la synthèse du MSA, le produit intermédiaire obtenu avant saponification est commercialisé chez Acros Organic®. Les protocole de saponification et d'acidification sont identiques à ceux décrits pour la synthèse du MMSA.

3.2.4.5.2. Dosage

Le MMSA et le MSA sont dosés enzymatiquement en présence d'un excès de MSDH, de NAD^+ 2 mM et dans des conditions de réaction irréversible (en absence de CoA) par dosage du NADH formé au spectrophotomètre à 340 nm. Un rendement de 80% est obtenu par rapport au produit protégé. Le rendement global de la synthèse pour le MMSA est de 29%.

3.2.4.6. Dosage de la concentration en NAD^+ contenu dans l'enzyme en sortie de purification par fluorimétrie

Le contenu en NAD^+ de la MSDH purifiée est dosé enzymatiquement après ajout de MMSA en suivant l'apparition de NADH par fluorimétrie. La réaction est réalisée dans des conditions irréversibles d'hydrolyse (en absence de CoA). La quantité de NADH formée est dosée sur un spectrofluorimètre SAFAS flx par excitation à 358 nm et enregistrement du spectre d'émission de 340 à 640 nm, le pic d'émission maximum du NADH étant situé à 460 nm. L'émission de fluorescence est étalonnée à l'aide d'une gamme de concentration en NADH.

3.2.4.7. Suivi de l'extinction d'émission de fluorescence des résidus tryptophane

L'extinction d'émission de fluorescence des résidus Tryptophane de la MSDH induit par la liaison du NAD^+ est enregistrée sur un spectrofluorimètre SAFAS flx après addition de 2 mM NAD^+ à 5 µN de MSDH dans un tampon KPi 50 mM pH 8,2 à 30 °C. Les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont respectivement de 297 et 335 nm. Pour le suivi du réarrangement en fonction de la concentration en NAD^+, les valeurs de k_{obs} sont déterminées pour chaque concentration en NAD^+ par ajustement à une monoexponentielle. Les données sont alors ajustées à l'équation suivante pour déterminer la constante de dissociation apparente de NAD^+ et le k_{obs} maximal.

$$k_{obs} = (k_{obsmax} \times [NAD^+]) / (K_{Dapp} + [NAD^+])$$

3.2.4.8. Test enzymatique

Les tests d'activité enzymatique sont effectués dans un tampon KPi 50 mM pH 8,2 ou un tampon TES 50 mM pH 8,2 à saturation des différents substrats dans un volume de 500 µL en suivant l'apparition de NADH à 340 nm en fonction du temps. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en µmoles de NADH produit par minute et par unité de DO à 280nm.

3.2.4.9. Identification des produits de la réaction

3.2.4.9.1. En conditions d'hydrolyse

L'identification des produits de la réaction en absence de CoA est réalisée par HPLC. Le mélange réactionnel contient 16 µN de MSDH, 500 µM de MMSA (ou 400 µM de MSA), et

2 mM de NAD^+. La production de NADH est suivie sur un spectrophotomètre SAFAS MONACO à 30 °C dans un tampon KPi 50 mM pH 8,2. Après réaction complète, l'enzyme est précipitée par addition de 0,2 N HCl et éliminée par centrifugation. Une partie du surnageant est injectée sur une colonne IOA2000 (Alltech®) suivie d'une élution isocratique par une solution d'HCl 0,1 N. Les produits sont détectés par réfractométrie en utilisant un détecteur SP 8430 RI (Spectra-Physics®) et le MMSA, le MSA, les acides acétique, propionique, malonique et méthylmalonique sont utilisés comme références.

3.2.4.9.2. En présence de CoA

L'identification des produits de la réaction en présence de CoA est réalisée par HPLC. Le mélange réactionnel contient 0,2 µN de MSDH, 500 µM de MMSA, 2 mM de NAD^+ et 500 µM de CoA. La production de NADH est suivi sur un spectrophotomètre SAFAS MONACO à 30 °C jusqu'à l'équilibre de la réaction dans un tampon KPi 50 mM pH 8,2. Une partie de la réaction est injectée sur colonne source 15Q Pharmacia® dans un tampon 50 mM phosphate de potassium pH 8,2, avec un tampon d'élution 50 mM phosphate de potassium, 1 M KCl pH 8,2. Les produits sont détectés par suivi de l'absorbance à 280, 260 et 205 nm. Le NAD^+, le NADH, le MMSA, le CoA et le PPCoA sont utilisés comme témoins.

4. Techniques d'étude des propriétés enzymatiques des enzymes MSDH de type sauvage et mutées

4.1. Détermination des constantes cinétiques (k_{cat}) et de Michaelis (K_M) à l'état stationnaire

Les paramètres cinétiques pour les différents substrats et cofacteurs sont réalisés dans les conditions de test d'activité en se plaçant à des concentrations saturantes pour deux des substrats et en faisant varier celle du troisième selon une gamme allant de 0,5 à 10 K_M. Les points expérimentaux sont analysés par régression non linéaire selon le modèle de Michaelis-Menten à l'aide du logiciel Sigma plot 6.0.

4.2. Etude de l'étape d'acylation

4.2.1. Titration de site

La vitesse de désacylation étant plus rapide en présence de CoA, on se place en conditions d'hydrolyse pour pouvoir observer le premier cycle de la réaction enzymatique au

spectrophotomètre. La réaction est déclenchée par l'ajout de l'aldéhyde. La concentration en enzyme est choisie pour observer un saut d'apparition de NADH de 0,05 et 0,1 DO_{340nm} (respectivement 8 et 16µN en sites).

4.2.2. Etude de l'étape d'acylation en cinétique rapide

Les conditions expérimentales et l'analyse des résultats sont décrites avec précision dans le chapitre « Experimental Procedures » de l'article 2 page 61. Les conditions expérimentales utilisées pour les mutants R124L, R301L et R124L/R301L sont identiques à celles décrites dans l'article.

4.3. Détermination de la constante de vitesse apparente de relargage (k_{off}) du NADH

Les conditions expérimentales et l'analyse des résultats sont décrites avec précision dans le chapitre « Experimental Procedures » de l'article 2 page 61. Les conditions expérimentales utilisées pour les mutants R124L, R301L et R124L/R301L sont identiques à celles décrites dans l'article.

4.4. Détermination de la constante de vitesse de l'étape de β-décarboxylation

Les conditions expérimentales et l'analyse des résultats sont décrites avec précision dans le chapitre « Experimental Procedures » de l'article 2 page 61.

5. Techniques d'étude de la réactivité de la Cys302 dans les enzymes sauvages et mutées

5.1. Utilisation de la sonde 2,2'- dipyridyl disulfide (2PDS)

La C302 étant très réactive dans le mutant QCys, les cinétiques ont été suivies sur un appareil à cinétique de mélange rapide SX18MV-R (Applied PhotoPhysics) à 30 °C dans des conditions de pseudo-premier-ordre sur une gamme de pH allant de 5 à 9 dans un tampon mixte SID à force ionique constante.

Dans le cas où la réactivité de la C302 est faible, les cinétiques été effectuées sur le spectrophotomètre SAFAS MONACO.

Les constantes de pseudo-premier-ordre k_{obs} sont déterminées à chaque pH en suivant l'absorbance A à 343 nm en fonction du temps t suivant l'équation suivante où a_1 représente l'amplitude du saut, $k = k_{obs}$, et c représente la valeur de l'ordonnée à l'origine.

$$A = a_1(1-e^{-kt}) + c \qquad \text{eq1}$$

La constante de deuxième ordre k_2 est calculée en divisant le k_{obs} par la concentration en 2-PDS et les données sont alors ajustées à l'équation 2 dans laquelle k' représente la constante de deuxième ordre pour la forme thiolate.

$$k_2 = k'(1/(10^{(pK_{app}-pH)}+1)) \qquad \text{eq2}$$

5.2. Utilisation de la sonde iodoacétamide (IAM)

5.2.1. Principe

L'iodoacétamide est un agent alkylant, réagissant essentiellement sur les cystéines accessibles. La modification covalente de la cystéine essentielle conduit à une perte totale d'activité. L'ordre de la réaction, c'est-à-dire le nombre de mole d'IAM réagissant par mole d'enzyme, et la réactivité chimique de la cystéine essentielle sont déterminés en suivant les cinétiques d'inactivation de l'enzyme. Le modèle cinétique de l'inactivation est le suivant :

$$E + nI \xrightarrow{k_2} E\text{-}I_n$$

$$v = -d(E)/dt = k_2\,(E)\,(I)^n$$

Si $(I)>>>(E)$, $(I)^n$ est constant et $k_{obs} = k(I)^n$ est une constante de pseudo-premier ordre.

$$d(E)/dt = -k_{obs} * (E)$$

$$\ln(E_o)/(E) = \ln A_o/A = k_{obs}\, t,$$

A représentant l'activité résiduelle de l'enzyme et A_0 l'activité initiale. Le tracé $\ln (A_o/A)$ en fonction du temps t permet de déterminer k_{obs}.

La représentation de la régression linéaire de l'équation suivante permet de déterminer l'ordre de la réaction :

$$\ln(k_{obs}) = n \ln(I) + \ln(k_2)$$

où k_2 est la constante de vitesse de second ordre indépendante de la concentration en IAM.

L'étude de la variation de la constante k_2 (déduite de la valeur de k_{obs}) en fonction du pH permet de titrer d'une part, le pK apparent et d'autre part, la réactivité chimique des formes thiolates impliquées.

NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

5.2.2. Protocole

L'inactivation par la sonde IAM est réalisée dans le tampon SID pour une étude en fonction du pH, à une température de 30°C, en présence ou en absence de NAD^+ et à une concentration en IAM de 30 à 100 fois supérieure à la concentration en enzyme. Pour une étude en fonction du pH, le rapport IAM-enzyme doit être constant. L'inactivation est suivie par la mesure de l'activité résiduelle dans les conditions de test d'activité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal, D. P., Volkens, T., Hafer, G. et Goedde, H. W. (1987). Erythrocyte aldehyde dehydrogenase: studies of properties and changes in acute and chronic alcohol intoxication. Prog Clin Biol Res., **232**, 85-101.

Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. et Vrielink, A. (2000). Crystal structure of the NADP+-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. Biochem J, **349**, (Pt 3), 853-861.

Allanson, S. et Dickinson, F. M. (1984). The removal of cytosolic-type aldehyde dehydrogenase from preparations of sheep liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase and the unusual properties of the purified mitochondrial enzyme in assays. Biochem J, **224**, (1), 163-169.

Altucci, L. et Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. Nat Rev Cancer, **1**, (3), 181-193.

Ambroziak, W., Kosley, L. L. et Pietruszko, R. (1989). Human aldehyde dehydrogenase: coenzyme binding studies. Biochemistry, **28**, (13), 5367-5373.

Ando, Y., Brannstrom, T., Uchida, K., Nyhlin, N., Nasman, B., Suhr, O., Yamashita, T., Olsson, T., El Salhy, M., Uchino, M. et Ando, M. (1998). Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. J Neurol Sci, **156**, (2), 172-176.

Baddiley, J., Thain, E. M., Novelli, G. D. et Lipmann, F. (1953). Structure of coenzyme A. Nature, **171**, (4341), 76.

Bamberger, E., Ehrlich, B. et Gibbs, M. (1975). The glyceraldehyde-3-phosphate and glycerate-3-phosphate shuttle and carbon dioxyde assimilation in intact spinach chloroplasts. Plant Physiol, **55**, 1023-1030.

Bannerjee, D., Sanders, L. E. et Sokatch, J. R. (1970). Properties of purified methylmalonate semialdehyde dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem, **245**, (7), 1828-1835.

Barski, O. A., Papusha, V. Z., Kunkel, G. R. et Gabbay, K. H. (2004). Regulation of aldehyde reductase expression by STAF and CHOP. Genomics, **83**, (1), 119-129.

Bateman, O. A., Purkiss, A. G., van Montfort, R., Slingsby, C., Graham, C. et Wistow, G. (2003). Crystal structure of eta-crystallin: adaptation of a class 1 aldehyde dehydrogenase for a new role in the eye lens. Biochemistry, **42**, (15), 4349-4556.

Bekri, S., Fossoud, C., Plaza, G., Guenne, A., Salomons, G. S., Jakobs, C. et Van Obberghen, E. (2004). The molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in one family. Mol Genet Metab, **81**, (4), 347-351.

Benedetti, A., Comporti, M. et Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Biochim Biophys Acta, **620**, (2), 281-296.

Benning, M. M., Haller, T., Gerlt, J. A. et Holden H. M. (2000). New reactions in the crotonase superfamily: structure of methylmalonyl CoA decarboxylase from *Escherichia coli*. Biochemistry, **39**, (16), 4630-4639.

Biswal, S., Acquaah-Mensah, G., Datta, K., Wu, X. et Kehrer, J. P. (2002). Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications. Chem Res Toxicol, **15**, (2), 180-186.

Bohren, K. M., Brownlee, J. M., Milne, A. C., Gabbay, K. H. et Harrison, D. H. (2005). The structure of Apo R268A human aldose reductase: hinges and latches that control the kinetic mechanism. Biochim Biophys Acta, **1748**, (2), 201-212.

Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G. et Hamilton, I. R. (1995). Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol, **177**, (10), 2622-2627.

Branden, R. et Reinhammar, B. (1975). EPR studies on the anaerobic reduction of fungal lactase. Evidence for participation of type 2 copper in the reduction mechanism. Biochim Biophys Acta, **405**, (2), 236-242.

Burcham, P. C., Fontaine, F. R., Kaminskas, L. M., Petersen, D. R. et Pyke, S. M. (2004). Protein adduct-trapping by hydrazinophthalazine drugs: mechanisms of cytoprotection against acrolein-mediated toxicity. Mol Pharmacol, **65**, (3), 655-664.

Calingasan, N. Y., Uchida, K. et Gibson, G. E. (1999). Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. J Neurochem, **72**, (2), 751-756.

Casati, D. F., Sesma, J. I. et Iglesias, A. A. (2000). Structural and kinetic characterization of NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. Plant Sci., **154**, 107-115.

Castellani, R., Smith, M. A., Richey, P. L. et Perry, G. (1996). Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. Brain Res, **737**, (1-2), 195-200.

Chambliss, K. L., Gray, R. G., Rylance, G., Pollitt, R. J. et Gibson, K. M. (2000). Molecular characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency [In Process Citation]. J Inherit Metab Dis, **23**, (5), 497-504.

Choudhary, S., Xiao, T., Vergara, L. A., Srivastava, S., Nees, D., Piatigorsky, J. et Ansari, N. H. (2005). Role of aldehyde dehydrogenase isozymes in the defense of rat lens and human lens epithelial cells against oxidative stress. Invest Ophthalmol Vis Sci, **46**, (1), 259-267.

Chuang, D. T. et Shih, V. E. (1995). Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. The metabolic and molecular bases of inherited disease. C. R. Scriver. New York, 1239-1277.

Clout, N. J., Kretschmar, M., Jaenicke, R. et Slingsby, C. (2001). Crystal structure of the calcium-loaded spherulin 3a dimer sheds light on the evolution of the eye lens betagamma-crystallin domain fold. Structure (Camb), **9**, (2), 115-124.

Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. et Aubry, A. (1999). Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J Mol Biol, **290**, (1), 161-173.

Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. et Aubry, A. (2000). Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J Mol Biol, **300**, (1), 141-152.

Craig, S. A. (2004). Betaine in human nutrition. Am J Clin Nutr, **80**, (3), 539-549.

Cravo, M. L. et Camilo, M. E. (2000). Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status. Nutrition, **16**, (4), 296-302.

D'Ambrosio, K., Pailot A., Talfournier, F., Didierjean, C., Benedetti, E., Aubry, A., Branlant, G. et Corbier, C. . The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis. Biochemistry, en révision.

De Laurenzi, V., Rogers, G. R., Hamrock, D. J., Marekov, L. N., Steiner, P. M., Compton, J. G., Markova, N. et Rizzo, W. B. (1996). Sjogren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. Nat. Genet., **12**, 52-57.

Dickinson, F. M. (1996). The purification and some properties of the Mg(2+)-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, **315 (Pt 2)**, 393-399.

Dickinson, F. M. (2003). Conformational changes and activation of yeast aldehyde dehydrogenase by various agents. Chem Biol Interact, **143-144**, 169-174.

Dickinson, F. M. et Hart, G. J. (1982). Effects of Mg2+, Ca2+ and Mn2+ on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. Biochem J, **205**, (2), 443-448.

Dickinson, F. M. et Haywood, G. W. (1987). The role of the metal ion in the mechanism of the K+-activated aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, **247**, (2), 377-384.

Djordjevic, S., Pace, C. P., Stankovich, M. T. et Kim, J. J. (1995). Three-dimensional structure of butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. Biochemistry, **34**, (7), 2163-2171.

Dockham, P. A., Sreerama, L. et Sladek, N. E. (1997). Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorines. Drug Metab. Dispos., **25**, 1436-1441.

Dräger, U. C., Wagner, E. et McCaffery, P. (1998). Aldehyde dehydrogenase in the generation of retinoic acid in the developing vertebrate: a central role of the eye. Symposium: Functional metabolism of vitamin A in embryonic development. 463S-466S

Duester, G., Mic, F. A. et Molotkov, A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. Chem Biol Interact, **143-144**, 201-210.

Dyda, F., Klein, D. C. et Hickman, A. B. (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. Annu Rev Biophys Biomol Struct, **29**, 81-103.

Engel, C. et Wierenga, R. (1996). The diverse world of coenzyme A binding proteins. Curr Opin Struct Biol, **6**, (6), 790-797.

Esterbauer, H., Schaur, R. J. et Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med, **11**, (1), 81-128.

Fait, A., Yellin, A. et Fromm, H. (2005). GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants. FEBS Lett, **579**, (2), 415-20.

Farres, J., Wang, X., Takahashi, K., Cunningham, S. J., Wang, T. T. et Weiner, H. (1994). Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. J Biol Chem, **269**, (19), 13854-13860.

Feldman, R. I. et Weiner, H. (1972). Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. J Biol Chem, **247**, (1), 267-272.

Fenton, W. A. et Rosenberg, L. E. (1995). Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. The metabolic and molecular bases of inherited disease. C. R. Sriver. NewYork, 1423-1449.

Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C. et Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. Annu Rev Physiol, **65**, 851-879.

Frank, R. N. (1994). The aldose reductase controversy. Diabetes, **43**, (2), 169-172.

Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A. et Wolodko, W. T. (1999). A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. J Mol Biol, **285**, (4), 1633-1653.

Garattini, E., Mendel, R., Romao, M. J., Wright, R. et Terao, M. (2003). Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. Biochem J, **372**, (Pt 1), 15-32.

Gibson, K. M., Gupta, M., Pearl, P. L., Tuchman, M., Vezina, L. G., Snead, O. C., Smit, L. M. et Jakobs, C. (2003). Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria). Biol Psychiatry, **54**, (7), 763-768.

Gibson, K. M., Lee, C. F., Bennett, M. J., Holmes, B. et Nyhan, W. L. (1993). Combined malonic, methylmalonic and ethylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase deficiencies: an inborn error of beta-alanine, L-valine and L-alloisoleucine metabolism? J Inherit Metab Dis, **16**, (3), 563-567.

Gibson, K. M., Lee, C. F. et Hoffmann, G. F. (1994). Screening for defects of branched-chain amino acid metabolism. Eur J Pediatr, **153**, (7), S62-67.

Gill, S. C. et Von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem, **182**, 319-326.

Goodwin, G. W., Rougraff, P. M., Davis, E. J. et Harris, R. A. (1989). Purification and characterization of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from rat liver. Identity to malonate-semialdehyde dehydrogenase. J Biol Chem, **264**, (25), 14965-14971.

Gray, R. G., Pollitt, R. J. et Webley, J. (1987). Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: demonstration of defective valine and beta-alanine metabolism and reduced malonic semialdehyde dehydrogenase activity in cultured fibroblasts. Biochem Med Metab Biol, **38**, (1), 121-124.

Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M. et Cambillau, C. (2004). Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. J Mol Biol, **343**, (1), 29-41.

Grun, F., Hirose, Y., Kawauchi, S., Ogura, T. et Umesono, K. (2000). Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. J Biol Chem, **275**, 41210-41218.

Habenicht, A., Hellman, U. et Cerff, R. (1994). Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. J Mol Biol, **237**, 165-171.

Habenicht, A., Quesada, A. et Cerff, R. (1997). Sequence of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana plumbaginifolia* and phylogenetic origin of the gene family. Gene, **198**, (1-2), 237-243.

Hales, C. A., Barkin, P. W., Jung, W., Trautman, E., Lamborghini, D., Herrig, N. et Burke, J. (1988). Synthetic smoke with acrolein but not HCl produces pulmonary edema. J Appl Physiol, **64**, (3), 1121-1133.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med, **91**, (3C), 14S-22S.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol, **166**, 557-580.

Harper, A. E., Miller, R. H. et Block, K. P. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. Annu Rev Nutr, **4**, 409-454.

Harrigan, P. J. et Trentham, D. R. (1974). Kinetic studies on oxidized nicotinamide--adenine dinucleotide-facilitated reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., **143**, 353-363.

Hart, G. J. et Dickinson, F. M. (1978). Kinetic properties of aldehyde dehydrogenase from sheep liver mitochondria. Biochem J, **175**, (3), 899-908.

Haussinger, D. (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. Biochem J, **313 (Pt 3)**, 697-710.

Hille, R. (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. Arch Biochem Biophys, **433**, (1), 107-116.

Horton, N. D., Biswal, S. S., Corrigan, L. L., Bratta, J. et Kehrer, J. P. (1999). Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells. J Biol Chem, **274**, (14), 9200-9206.

Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W. A. et Selvaraj, G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. Plant Physiol, **122**, (3), 747-756.

Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V. et Penning, T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. Chem Biol Interact, **143-144**, 621-631.

Ichihara, K., Noda, Y., Tanaka, C. et Kusunose, M. (1986). Purification of aldehyde dehydrogenase reconstituvely active in fatty alcohol oxidation from rabbit intestinal microsomes. Biochim. Biophys. Acta, **878**, 419-425.

Inoue, H., Nojima, H. et Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, **96**, (1), 23-8.

Jacob, J. L. et D'Auzac, J. (1972). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the latex of *Hevea brasiliensis*. Comparative study with its phosphorylating homologue. Eur J Biochem, **31**, (2), 255-265.

Jacob, U., Mack, M., Clausen, T., Huber, R., Buckel, W. et Messerschmidt, A. (1997). Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. Structure, **5**, (3), 415-426.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. et Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 A resolution. Protein Sci, **7**, (10), 2106-2117.

Johnson, G. R., Jain, R. K. et Spain, J. C. (2002). Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. J Bacteriol, **184**, (15), 4219-4232.

Kaplan, N. O. et Lipmann, F. (1948). The assay and distribution of coenzyme A. J Biol Chem, **174**, 37-44.

Karaolis, D. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B. et Reeves, P. R. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proc Natl Acad Sci U S A, **95**, (6), 3134-3139.

Kathmann, E. C., Naylor, S. et Lipsky, J. J. (2000). Rat liver constitutive and phenobarbital-inducible cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homogenous proteins that function as distinct isozymes. Biochemistry, **39**, 11170-11176.

Kedishvili, N. Y., Popov, K. M., Rougraff, P. M., Zhao, Y., Crabb, D. W. et Harris, R. A. (1992). CoA-dependent methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, a unique member of the aldehyde dehydrogenase superfamily. cDNA cloning, evolutionary relationships, and tissue distribution. J Biol Chem, **267**, (27), 19724-19729.

Kelly, G. J. et Gibbs, A. J. (1973). A mechanism for the indirect transfert of photosynthetically reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate from chloroplast to the cytoplasm. Plant Physiol, **52**, 674-676.

Kern, J. C. et Kehrer, J. P. (2002). Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. Chem Biol Interact, **139**, (1), 79-95.

Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., Yamagishi, S., Makita, Z., Sasaki, N. et Tashiro, K. (2003). Glycation--a sweet tempter for neuronal death. Brain Res Brain Res Rev, **41**, (2-3), 306-323.

Kim, J. J., Wang, M. et Paschke, R. (1993). Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. Proc Natl Acad Sci U S A, **90**, (16), 7523-7527.

Klyosov, A. A. (1996). Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. Biochemistry, **35**, 4457-4467.

Kragelund, B. B., Andersen, K. V., Madsen, J. C., Knudsen, J. et Poulsen, F. M. (1993). Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A. J Mol Biol, **230**, (4), 1260-1277.

Kratzer, R., Kavanagh, K. L., Wilson, D. K. et Nidetzky, B. (2004). Studies of the enzymic mechanism of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR 2B5): X-ray structure and catalytic reaction profile for the H113A mutant. Biochemistry, **43**, (17), 4944-4954.

Kupiecki, F. P. et Coon., M. J. (1960). Methylmalonic semialdehyde. Biochem. Prep., 7, 69-71.

Kurlandsky, S. B., Duell, E. A., Kang, S., Voorhees, J. J. et Fisher, G. J. (1996). Auto-regulation of retinoic acid of biosynthesis through regulation of retinol esterification in human keratinocytes. J Biol Chem., **271**, (26), 15346-15352.

Kurosaki, M., Terao, M., Barzago, M. M., Bastone, A., Bernardinello, D., Salmona, M. et Garattini, E. (2004). The aldehyde oxidase gene cluster in mice and rats. Aldehyde oxidase homologue 3, a novel member of the molybdo-flavoenzyme family with selective expression in the olfactory mucosa. J Biol Chem, **279**, (48), 50482-50498.

Kurtz, A. J. et Lloyd, R. S. (2003). 1,N2-deoxyguanosine adducts of acrolein, crotonaldehyde, and trans-4-hydroxynonenal cross-link to peptides via Schiff base linkage. J Biol Chem, **278**, (8), 5970-5976.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, (259), 680-685.

Lamb, A. L. et Newcomer, M. E. (1999). The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 A resolution: implications for retinal specificity. Biochemistry, **38**, (19), 6003-6011.

Larson, H. N., Weiner, H. et Hurley, T. D. (2005). Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "asian" variant. J Biol Chem, **280**, (34), 30550-30556.

Larson, R. S. et Tallman, M. S. (2003). Retinoic acid syndrome: manifestations, pathogenesis, and treatment. Best Pract Res Clin Haematol, **16**, (3), 453-461.

Leuenberger, M. G., Engeloch-Jarret, C. et Woggon, W. D. (2001). The Reaction Mechanism of the Enzyme-Catalyzed Central Cleavage of beta-Carotene to Retinal. Angew Chem Int Ed Engl, **40**, (14), 2613-2617.

Li, L., Hamilton, R. F., Jr., Taylor, D. E. et Holian, A. (1997). Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. Toxicol Appl Pharmacol, **145**, (2), 331-339.

Lieber, C. S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta, **257**, (1), 59-84.

Lieber, C. S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. Alcohol, **34**, (1), 9-19.

Lindahl, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **27**, 283-335.

Lipmann, F. (1945). Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts. J Biol Chem, **160**, 173-190.

Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. et Wang, B. C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. Nat Struct Biol, **4**, (4), 317-326.

Lovell, M. A., Xie, C. et Markesbery, W. R. (2001). Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. Neurobiol Aging, **22**, (2), 187-194.

Ludeman, S. M. (1999). The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. Curr Pharm Des, **5**, (8), 627-643.

MacGibbon, A. K., Blackwell, L. F. et Buckley, P. D. (1977). Pre-steady-state kinetic studies on cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase. Biochem J, **167**, (2), 469-477.

Mach, H., Middaugh, C. R. et Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. Anal Biochem, **200**, (1), 74-80.

Mancia, F., Smith, G. A. et Evans, P. R. (1999). Crystal structure of substrate complexes of methylmalonyl-CoA mutase. Biochemistry, **38**, (25), 7999-8005.

Manjasetty, B. A., Powlowski, J. et Vrielink, A. (2003). Crystal structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. Proc Natl Acad Sci U S A, **100**, (12), 6992-6997.

Mann, C. J. et Weiner, H. (1999). Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. Protein Sci, **8**, (10), 1922-1929.

Marchal, S. (2001). Caractérisation enzymatique de la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase non-phosphorylante de *Streptococcus mutans*., Henri Poincaré, Nancy I, 201.

Marchal, S. et Branlant, G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Biochemistry, **38**, (39), 12950-12958.

Marchal, S. et Branlant, G. (2002). Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. J Biol Chem, **277**, (42), 39235-39242.

Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tete-Favier, F., Aubry, A. et Branlant, G. (2001). Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Chem Biol Interact, **130-132**, (1-3), 15-28.

Marchal, S., Rahuel-Clermont, S. et Branlant, G. (2000). Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Biochemistry, **39**, (12), 3327-3335.

Marshall, V. D. et Sokatch, J. R. (1972). Regulation of valine catabolism in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol, **110**, (3), 1073-1081.

Martini, R. et Murray, M. (1996). Rat hepatic microsomal aldehyde dehydrogenase. Identification of 3- and 4-substituted aromatic aldehydes as substrates of the enzyme. Chem. Res. Toxicol., **9**, 268-276.

Massey, L. K., Sokatch, J. R. et Conrad, R. S. (1976). Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. Bacteriol Rev, **40**, (1), 42-54.

Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K. H., Westphal, A. H., de Kok, A. et Hol, W. G. (1992). Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. Science, **255**, (5051), 1544-1550.

Michels, S., Scagliarini, S., Della Seta, F., Carles, C., Riva, M., Trost, P. et Branlant, G. (1994). Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. FEBS Lett, **339**, (1-2), 97-100.

Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. et Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. Structure, **6**, (12), 1541-1551.

Myint, T., Hoshi, S., Ookawara, T., Miyazawa, N., Suzuki, K. et Taniguchi, N. (1995). Immunological detection of glycated proteins in normal and streptozotocin-induced diabetic rats using anti hexitol-lysine IgG. Biochim Biophys Acta, **1272**, (2), 73-79.

Napoli, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. Biochim Biophys Acta, **1440**, (2-3), 139-162.

Nawrot, M., West, K., Huang, J., Possin, D. E., Bretscher, A., Crabb, J. W. et Saari, J. C. (2004). Cellular retinaldehyde-binding protein interacts with ERM-binding phosphoprotein 50 in retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, **45**, (2), 393-401.

Ni, L., Zhou, J., Hurley, T. D. et Weiner, H. (1999). Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. Protein Sci, **8**, (12), 2784-2790.

Olson, L. P., Luo, J., Almarsson, O. et Bruice, T. C. (1996). Mechanism of aldehyde oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase. Biochemistry, **35**, (30), 9782-9791.

Oranje, W. A. et Wolffenbuttel, B. H. (1999). Lipid peroxidation and atherosclerosis in type II diabetes. J Lab Clin Med, **134**, (1), 19-32.

Peck, G. L. et DiGiovanna, J. J. (1994). Synthetic retinoids in dermatology. The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. M. B. Sporn, A. B. Roberts and D. S. Goodman. New York, Raven Press, 631-658.

Peralba, J. M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julia, P., Martinez, S. E., Persson, B., Farres, J., Pares, X. et Jornvall, H. (1999). Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)- dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. J Biol Chem, **274**, (37), 26021-26026.

Perez-Miller, S. J. et Hurley, T. D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. Biochemistry, **42**, (23), 7100-7109.

Permana, P. A. et Snapka, R. M. (1994). Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. Carcinogenesis, **15**, (5), 1031-1036.

Piatigorsky, J., Kozmik, Z., Horwitz, J., Ding, L., Carosa, E., Robison, W. G., Steinbach, P. J. et Tamm, E. R. (2000). Omega -crystallin of the scallop lens. A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 enzyme-crystallin. J Biol Chem, **275**, (52), 41064-41073.

Pietruszko, R., Kikonyogo, A., Chern, M. K. et Izaguirre, G. (1997). Human aldehyde dehydrogenase E3. Further characterization. Adv Exp Med Biol., **414**, 243-252.

Pohl, E., Brunner, N., Wilmanns, M. et Hensel, R. (2002). The crystal structure of the allosteric non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. J Biol Chem, **277**, (22), 19938-19945.

Pollitt, R. J., Green, A. et Smith, R. (1985). Excessive excretion of beta-alanine and of 3-hydroxypropionic, R- and S-3-aminoisobutyric, R- and S-3-hydroxyisobutyric and S-2-(hydroxymethyl)butyric acids probably due to a defect in the metabolism of the corresponding malonic semialdehydes. J Inherit Metab Dis, **8**, (2), 75-79.

Reichard, J. F., Vasiliou, V. et Petersen, D. R. (2000). Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver. Biochim Biophys Acta, **1487**, (2-3), 222-232.

Remington, S., Wiegand, G. et Huber, R. (1982). Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 A resolution. J Mol Biol, **158**, (1), 111-152.

Rintala, J., Jaatinen, P., Parkkila, S., Sarviharju, M., Kiianmaa, K., Hervonen, A. et Niemela, O. (2000). Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. Alcohol Alcohol, **35**, (5), 458-463.

Rodriguez-Zavala, J. S. et Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. Biochemistry, **41**, (26), 8229-8237.

Roe, C. R., Struys, E., Kok, R. M., Roe, D. S., Harris, R. A. et Jakobs, C. (1998). Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: psychomotor delay and methylmalonic aciduria without metabolic decompensation. Mol Genet Metab, **65**, (1), 35-43.

Rossmann, M. G., Moras, D. et Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. Nature, **250**, (463), 194-199.

Ryle, C., Leow, C. K. et Donaghy, M. (1997). Nonenzymatic glycation of peripheral and central nervous system proteins in experimental diabetes mellitus. Muscle Nerve, **20**, (5), 577-584.

Saari, J. C., Nawrot, M., Kennedy, B. N., Garwin, G. G., Hurley, J. B., Huang, J., Possin, D. E. et Crabb, J. W. (2001). Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. Neuron, **29**, (3), 739-748.

Sakamoto, A. et Murata, N. (1999). Genetic engineering of glycinebetaïne synthesis in plants : current status and implications for enhancement of stress tolerance. Journal of Experimental Botany, **51**, 81-88.

Schlegel, B. P., Jez, J. M. et Penning, T. M. (1998). Mutagenesis of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase reveals a "push-pull" mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. Biochemistry, **37**, (10), 3538-3348.

BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Schneir, A. B., Ly, B. T. et Clark, R. F. (2001). A case of withdrawal from the GHB precursors gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. J Emerg Med, **21**, (1), 31-33.

Scopes, R. K. (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. Anal Biochem, **59**, 277-282.

She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. et Van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, (14), 7835-7840.

Shearer, G. L., Kim, K., Lee, K. M., Wang, C. K. et Plapp, B. V. (1993). Alternative pathways and reactions of benzyl alcohol and benzaldehyde with horse liver alcohol dehydrogenase. Biochemistry, **32**, (41), 11186-11194.

Shibata, E., Ejima, K., Nanri, H., Toki, N., Koyama, C., Ikeda, M. et Kashimura, M. (2001). Enhanced protein levels of protein thiol/disulphide oxidoreductases in placentae from pre-eclamptic subjects. Placenta, **22**, (6), 566-572.

Shibata, N., Kobayashi, M., Dal Canto, M. C., Gurney, M. E., Ikeda, K. et Horiuchi, S. (1997). Advance glycosylation end products (AGE) deposition in intraneuronal hyaline inckusions (IHIs) of spinal cords from familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients with superoxide dismutase-1 (SOD1) mutation and from transgenic mutant human SOD1. Brain Pathol., **7**, 1073.

Shone, C. C. et Fromm, H. J. (1981). Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. Biochemistry, **20**, (26), 7494-7501.

Söhling, B. et Gottschalk, G. (1993). Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. Eur J Biochem, **212**, (1), 121-127.

Sokatch, J. R., Sanders, L. E. et Marshall, V. P. (1968). Oxidation of methylmalonate semialdehyde to propionyl coenzyme A in *Pseudomonas aeruginosa* grown on valine. J Biol Chem, **243**, (10), 2500-2506.

Sreerama, L. et Sladek, N. E. (1997). Cellular levels of class 1 and class 3 aldehyde dehydrogenases and certain other drug-metabolizing enzymes in human breast malignancies. Clin. Cancer Res., **3**, 1901-1914.

Srivastava, S., Spite, M., Trent, J. O., West, M. B., Ahmed, Y. et Bhatnagar, A. (2004). Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids. J Biol Chem, **279**, (51), 53395-53406.

Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A. et Sokatch, J. R. (1992). Characterization of the mmsAB operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. J Biol Chem, **267**, (19), 13585-13592.

Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. et Hurley, T. D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. Structure, **5**, (5), 701-711.

Svanas, G. W. et Weiner, H. (1985). Aldehyde dehydrogenase activity as the rate-limiting factor for acetaldehyde metabolism in rat liver. Arch Biochem. Biophys., **236**, 36-46.

Sweetman, L. et William, J. C. (1995). Branched chain organic acidurias. The metabolic and molecular bases of inherited disease. C. R. Scriver. NewYork, 1387-1422.

Tabor, S. et Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **84**, 4767-4771.

Takahashi, K. et Weiner, H. (1980). Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. J Biol Chem, **255**, (17), 8206-8209.

Takahashi, K. et Weiner, H. (1981). Nicotinamide adenine dinucleotide activation of the esterase reaction of horse liver aldehyde dehydrogenase. Biochemistry, **20**, (10), 2720-2726.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. et Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment throught sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, **22**, 4673-4680.

Tirumalai, R., Rajesh Kumar, T., Mai, K. H. et Biswal, S. (2002). Acrolein causes transcriptional induction of phase II genes by activation of Nrf2 in human lung type II epithelial (A549) cells. Toxicol Lett, **132**, (1), 27-36.

Tjalkens, R. B., Cook, L. W. et Petersen, D. R. (1999). Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2, 3-E-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. Arch Biochem Biophys, **361**, (1), 113-119.

Tomarev, S. I. et Piatigorsky, J. (1996). Lens crystallins of invertebrates--diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. Eur J Biochem, **235**, (3), 449-465.

Uchida, K. (1999). Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. Trends Cardiovasc Med, **9**, (5), 109-113.

Uchida, K. (2000). Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. Free Radic Res, **33**, (6), 731-737.

Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. Prog Lipid Res, **42**, (4), 318-343.

Uchida, K., Toyokuni, S., Nishikawa, K., Kawakishi, S., Oda, H., Hiai, H. et Stadtman, E. R. (1994). Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. Biochemistry, **33**, (41), 12487-12494.

Uma, L., Hariharan, J., Sharma, Y. et Balasubramanian, D. (1996). Corneal aldehyde dehydrogenase displays antioxydant properties. Exp. Eye Res., **212**, 9-19.

Vasiliou, V., Pappa, A. et Petersen, D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. Chem Biol Interact, **129**, (1-2), 1-19.

Vlassara, H., Striker, L. J., Teichberg, S., Fuh, H., Li, Y. M. et Steffes, M. (1994). Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. Proc Natl Acad Sci U S A, **91**, (24), 11704-11708.

Wang, X., Sheikh, S., Saigal, D., Robinson, L. et Weiner, H. (1996). Heterotetramers of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. A model to study the heterotetramers expected to be found in Oriental people. J Biol Chem, **271**, (49), 31172-31178.

Wang, X. et Weiner, H. (1995). Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site- directed mutagenesis. Biochemistry, **34**, (1), 237-243.

Weiner, H., Hu, J. H. et Sanny, C. G. (1976). Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. J Biol Chem, **251**, (13), 3853-3855.

Weretilnyk, E. A. et Hanson, A. D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proc Natl Acad Sci U S A, **87**, (7), 2745-2749.

Witkowski, A., Joshi, A. K. and Smith, S. (2002). Mechanism of the β-ketoacyl synthase reaction catalyzed by the animal fatty acid synthase. Biochemistry, **41**, 10877-10887.

Wolf, D. A. et Akers, H. A. (1986). Uncertainties remain in the catabolism of valine. TIBS, **11**, 390-392.

Wolff, S. P., Jiang, Z. Y. et Hunt, J. V. (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. Free Radic Biol Med, **10**, 339-352.

Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. et Bridger, W. A. (1994). The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-A resolution. J Biol Chem, **269**, (14), 10883-10890.

Xia, M., Dempski, R. et Hille, R. (1999). The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. J Biol Chem, **274**, (6), 3323-3330.

Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E. R. et Mizuno, M. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A, **93**, 2696-2701.

Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T. et Fujita, Y. (1997). Organization and transcription of the myo-inositol operon, iol, of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, **179**, (14), 4591-4598.

Zhang, Y. X., Tang, L. et Hutchinson, C. R. (1996). Cloning and characterization of a gene (msdA) encoding methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, **178**, (2), 490-495.

Zhou, J. et Weiner, H. (2000). Basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Biochemistry, **39**, (39), 12019-12024.

BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Madame **CHAUMEIL – STINES Claire**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1

en ENZYMOLOGIE MOLECULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1113

Nancy, le 21 Novembre 2005

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I
LE PRÉSIDENT,
FRANCE

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY Cédex
Tél. : 03 83 68 20 00 - Fax : 03 83 68 21 00

Résumé

Les Aldéhyde Déshydrogénases (ALDH) non phosphorylantes non Coenzyme A (CoA) dépendantes ou CoA dépendantes forment une famille d'enzymes structuralement et phylogénétiquement apparentées. Ces enzymes $NAD(P)^+$-dépendantes interviennent au niveau du métabolisme cellulaire et dans des processus de détoxication. Elles catalysent la conversion d'aldéhydes en leurs acides correspondants (activés ou non par le CoA) par un mécanisme à deux étapes : une étape d'acylation incluant un processus d'oxydoréduction à transfert d'hydrure suivie d'une étape de désacylation. Alors que les ALDH non CoA dépendantes ont été bien caractérisées au niveau structural et de leur mécanisme, très peu d'informations sont disponibles pour les ALDH CoA dépendantes. C'est dans ce cadre que la caractérisation des facteurs structuraux et moléculaires intervenant dans la catalyse chimique et la spécificité structurale de la Méthylmalonate Semialdéhyde Déshydrogénase (MSDH) tétramérique de *Bacillus subtilis* a été entreprise. Les MSDH sont impliquées dans les voies du catabolisme de la valine et des bases pyrimidiques. Elles catalysent l'oxydation du malonate semialdéhyde (MSA) et du méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) respectivement en acétyl-CoA et en propionyl-CoA. La réaction catalysée par la MSDH présente deux différences majeures par rapport au mécanisme catalytique des ALDH non CoA dépendantes, à savoir une étape de β-décarboxylation et une étape de transthioestérification.

L'utilisation combinée de sondes spécifiques des Cys, de la spectroscopie de fluorescence, des techniques de cinétique rapide et classique et de génie génétique, nous ont permis de proposer un mécanisme catalytique de la MSDH de *B. subtilis*. Nos études ont ainsi montré que l'étape limitante pour la réaction globale est associée à la réaction de β-décarboxylation, qui se produit sur l'intermédiaire thioacylenzyme après le relargage du NADH et avant l'étape de transthioestérification. Nos résultats indiquent également que le bicarbonate, dont la formation est catalysée par la MSDH, est un des produits de la réaction. L'ensemble de nos résultats est donc en faveur d'un mécanisme cinétique de type ping-pong. L'étape d'acylation est très efficace avec seulement deux sous-unités sur quatre qui sont actives. Ce résultat démontre que la MSDH présente des propriétés de réactivité de demi-site qui restent à être expliquées au niveau structural. Une étape préalable d'activation NAD^+-dépendante est observée qui se traduit par l'existence d'une phase de latence lors des tests d'activité. Ce processus d'activation est accompagné d'une réorganisation conformationnelle de l'interface monomère/monomère d'un même dimère comme le suggère la modification des propriétés de fluorescence du résidu W468 qui est proche de cette interface. Il conduit également à un abaissement du pK_{app} de la C302 catalytique d'environ 8,7 à 7,9. La formation du complexe ternaire MSDH/NAD/substrat conduit à une diminution du pK_{app} de la C302 de 7,9 à environ 5,5 ce qui suggère une réorganisation structurale supplémentaire du site actif lors de la formation du complexe ternaire. Le mode d'activation de la C302 est donc séquentiel avec un abaissement progressif du pK_{app} d'environ 8,7 dans l'apoenzyme à 7,9 dans la forme holo puis à ~ 5,5 dans le complexe ternaire. Nous avons également montré qu'au sein du complexe ternaire, les résidus invariants R124 et R301 interagissent avec le carboxylate du substrat. Ils participent au positionnement efficace de la fonction aldéhyde du substrat vis-à-vis de la C302 et à la stabilisation du carboxylate.

Mots clés : ALDH CoA dépendante, mécanisme catalytique, β-décarboxylation, réactivité de demi-site, sites de spécificité structurale, transthioestérification.