



## 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](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

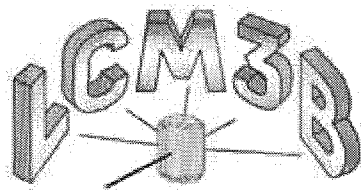
## LIENS

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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



SCD UHP NANCY 1  
Bibliothèque des Sciences  
Rue du Jardin Botanique - CS 20148  
54501 VILLERS LES NANCY CEDEX

**Nancy-Université**  
Université  
Henri Poincaré

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

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

## **Thèse**

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1**

en Enzymologie Moléculaire et Biologie Structurale

par Hélène DUBOURG-GERECKE

**Etude originale par diffraction des rayons X  
d'une aldéhyde déshydrogénase non-phosphorylante,  
décarboxylante et CoA-dépendante :  
la méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis*.**

Soutenue le 29 septembre 2006

Rapporteurs :

Monsieur Didier ROGNAN

Directeur de Recherche CNRS, Faculté de pharmacie,  
ULP-Strasbourg

Monsieur Vincent VILLERET

Directeur de Recherche CNRS, Institut de Biologie,  
Institut Pasteur, Lille 2

Examineurs :

Monsieur Maurice ARNAUD

Directeur de Recherche, Nestlé SA, Vevey (Suisse)

Monsieur André AUBRY

Directeur de Recherche CNRS, UHP-Nancy 1

Monsieur Guy BRANLANT

Professeur des Universités, FST, UHP-Nancy 1

Monsieur Claude DIDIERJEAN

Maître de conférences, FST, UHP-Nancy 1

Monsieur Alexander OURJOUNTSEV

Professeur des Universités, FST, UHP-Nancy 1

SCD URP NANCY 1  
Bibliothèque des Sciences  
Rue du Jardin Botanique - CS 20149  
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

**A mes Parents**

**A mon Mari et ma Fille**

Je remercie vivement Monsieur Didier ROGNAN, Directeur de Recherches CNRS, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur Vincent VILLERET, Directeur de Recherches CNRS, d'avoir pris la responsabilité de juger mon travail.

Je remercie Messieurs Guy BRANLANT et Sacha OURJOUMTSEV, Professeurs des Universités de l'UHP, pour avoir accepté de prendre part au jury.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Maurice ARNAUD, Directeur de Recherches Nestlé, pour m'avoir fait confiance durant mes stages à l'Institut de l'Eau Perrier-Vittel et pour sa participation au jury.

Je tiens à remercier le Professeur Claude LECOMTE, directeur du LCM3B, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie messieurs André AUBRY, Guillermo MULLIERT, Bernard VITOUX et Madame Frédérique FAVIER pour leur disponibilité et leur soutien.

Je remercie tout particulièrement Claude DIDIERJEAN qui m'a accompagnée durant toutes ces années passées au LCM3B.

J'associe à ces remerciements tous les membres, passés et présents, du LCM3B pour les agréables moments partagés ainsi que les membres du laboratoire d'enzymologie moléculaire du MAEM.



# *Abréviations*

Å	angström
ALDH	aldéhyde deshydrogénase
BADH	bétaine aldéhyde deshydrogénase
CoA	coenzymeA
Ct	extrémité carboxy-terminale
C $\alpha$	atome de carbone en position alpha
DO	densité optique
DTT	dithiotréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
$f_c, F_{calc}$	facteurs de structure calculés
$f_o, F_{obs}$	facteurs de structure observés
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GAPN	glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase non phosphorylante
$k_{cat}$	constante de vitesse
$K_M$	constante de Michaëlis
KPi	phosphate inorganique de potassium
M	molaire (mol.L <sup>-1</sup> )
mM	millimolaire (mmol.L <sup>-1</sup> )
MMSA	méthylmalonate semialdéhyde
MSA	malonate semialdéhyde
MSDH	méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase
NAD(P)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
Nt	extrémité amino-terminale
PDB	« protein data banque »
PEG	polyéthylèneglycol
rms	écart quadratique moyen
rmsd	écart quadratique moyen par rapport aux valeurs standards
RX	rayon X
SA	sulfate d'ammonium
V/V	volume à volume

Ala	A	alanine
Arg	R	arginine
Asn	N	asparagine
Asp	D	acide aspartique
Cys	C	cystéine
Gln	Q	glutamine
Glu	E	acide glutamique
Gly	G	glycine
His	H	histidine
Ile	I	isoleucine
Leu	L	leucine
Lys	K	lysine
Met	M	méthionine
Phe	F	phénylalanine
Pro	P	proline
Ser	S	sérine
Thr	T	thréonine
Trp	W	tryptophane
Tyr	Y	tyrosine
Val	V	valine

*Plan*

Introduction .....	1
Objectifs de thèse .....	48
Matériel et Méthodes.....	49
Résultats .....	66
Discussion.....	106
Conclusions et Perspectives .....	115
Bibliographies .....	118
Annexes	
Publication	

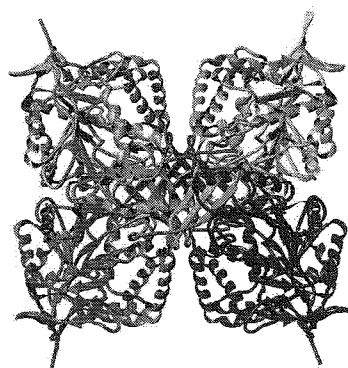
# *Introduction*

# Sommaire

<b>1. LES ALDEHYDE DESHYDROGENASES.....</b>	<b>2</b>
1.1. LA PHYSIOLOGIE DES ALDHs.....	2
1.1.1. Généralités.....	2
1.1.1.1. L'expression et la localisation des ALDHs chez les eucaryotes.....	2
1.1.2. Implication des ALDHs humaines dans le métabolisme.....	5
1.1.2.1. Métabolisme de l'éthanol.....	5
1.1.2.2. Métabolisme et biosynthèse de GABA.....	5
1.1.2.3. Métabolisme des aldéhydes gras.....	6
1.1.2.4. Métabolisme des acides aminés.....	7
1.1.2.5. Métabolisme des aldéhydes issus de la peroxydation des lipides.....	8
1.1.2.6. Métabolisme du cyclophosphamide.....	9
1.1.2.7. Métabolisme du folate.....	9
1.1.2.8. Biosynthèse de l'acide rétinolique.....	9
1.1.3. Exemples d'implication des ALDHs.....	10
1.1.3.1. Les ALDHs et la détoxification des aldéhydes de sources exogènes.....	10
1.1.3.2. Les ALDHs et le fonctionnement cellulaire.....	10
1.1.3.3. Les ALDHs et la « matière première ».....	12
1.1.3.4. Les ALDHs et la production d'équivalents réducteurs.....	12
1.1.3.5. Les ALDHs et les protéines de structures.....	12
1.2. L'AVANCEE DES CONNAISSANCES SUR LES ALDHs.....	14
1.2.1. Préambule.....	14
1.2.2. Les ALDHs avant la connaissance de la structure tridimensionnelle.....	15
1.2.2.1. Les ALDHs cofacteur-dépendantes.....	15
1.2.2.1.1. <i>Présentation</i> .....	15
1.2.2.1.2. <i>Le mécanisme catalytique</i> .....	16
1.2.2.1.3. <i>Les résidus aminoacyls impliqués</i> .....	19
1.2.2.2. Les ALDHs cations-dépendantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
1.2.2.2.1. <i>Présentation</i> .....	20
1.2.2.2.2. <i>ALDHs K<sup>+</sup>-dépendantes</i> .....	20
Description.....	20
Rôle du cation monovalent (K <sup>+</sup> ).....	21
1.2.2.2.3. <i>ALDH Mg<sup>2+</sup>-dépendante (Dickinson, 1996)</i> .....	21
1.2.3. La structure tridimensionnelle des ALDHs.....	21
1.2.3.1. Structure de l'ALDH2 bovine (Steinmetz <i>et al.</i> , 1997).....	22
1.2.3.1.1. <i>Structure du domaine de fixation du cofacteur</i> .....	25
Présentation.....	25
Description du mode de fixation du NAD <sup>+</sup> (Figure 1.2.3.1-c).....	25
Description du site de fixation du cofacteur.....	26
1.2.3.1.2. <i>Description du site actif</i> .....	27
1.2.3.1.3. <i>Oligomérisation de l'homotétramère</i> .....	28
1.2.3.2. Les structures connues d'ALDHs.....	30
1.2.4. Retour sur le mécanisme enzymatique des ALDHs.....	33
1.2.4.1. Description du mécanisme enzymatique des ALDHs.....	33
1.2.4.1.1. <i>La première étape : l'acylation</i> .....	34
1.2.4.1.2. <i>La seconde étape : la désacylation</i> .....	35
1.2.4.1.3. <i>La spécificité de substrat</i> .....	35
<b>2. LES ALDEHYDE DESHYDROGENASES COA-DEPENDANTES (COA-ALDH).....</b>	<b>36</b>
2.1. PREAMBULE.....	36
2.2. MECANISME ENZYMATIQUE DES COA-ALDHs NON DECARBOXYLANTES.....	38
2.2.1. Présentation des CoA-ALDHs non décarboxylantes.....	38
2.2.2. Mécanisme enzymatique des CoA-ALDHs non décarboxylantes.....	38
2.3. LES COA-ALDHs.....	40
2.3.1. Présentation.....	40
2.3.2. Implications des CoA-ALDHs.....	41
2.3.2.1. Les CoA-ALDHs et le métabolisme des acides aminés.....	41
2.3.2.1.1. <i>Métabolisme de la β-alanine</i> .....	41
2.3.2.1.2. <i>Métabolisme de la valine</i> .....	41
2.3.2.2. Les CoA-ALDHs et le métabolisme de la thymine.....	42
2.3.2.3. Les CoA-ALDHs et la « matière première ».....	42
2.3.2.4. Les CoA-ALDHs et les plantes.....	42
2.3.3. Mécanisme enzymatique des CoA-ALDHs.....	43
2.3.3.1. Mécanisme enzymatique de la méthylmalonate semialdéhyde et de la malonate semialdéhyde déshydrogénases.....	43

## Sommaire

2.3.3.2.	Mécanisme enzymatique de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de <i>Bacillus subtilis</i> (Stines-Chaumeil, 2005 ; Stines-Chaumeil <i>et al.</i> , 2006).....	44
2.3.3.2.1.	<i>L'étape d'acylation</i> .....	44
2.3.3.2.2.	<i>La <math>\beta</math>-décarboxylation</i> .....	45
2.3.3.2.3.	<i>L'étape de désacylation</i> .....	47



Les aldéhyde déshydrogénases catalysent l'oxydation d'aldéhydes en leurs acides correspondants.

La super-famille des aldéhyde déshydrogénases se décompose en deux classes d'enzymes : les phosphorylantes et les non phosphorylantes. Cette dernière est subdivisée en deux sous-classes. Au sein de la famille des aldéhyde déshydrogénases, la répartition des enzymes est conditionnée par la nature du produit final de la réaction catalysée :

Classes d'ALDHs	Sous-Classes d'ALDHs	Nature des produits	Produits
Phosphorylantes		Phosphorylé	R-COOPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
Non Phosphorylantes	Non CoA-dépendantes	non phosphorylé	R-COOH
	CoA-dépendantes	acylé par le CoA	R-COCoA

Commentaires : CoA pour coenzymeA - Non CoA-dépendantes pour les enzymes qui ne nécessitent pas le CoA comme cofacteur - CoA-dépendantes pour les enzymes qui nécessitent le CoA comme cofacteur.

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, GAPDH, est le représentant emblématique de la famille des aldéhyde déshydrogénases. Jusque dans les années 90, les propriétés enzymatiques et structurales de la GAPDH (phosphorylante) ont été transposées aux aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes (Feldman *et Weiner*, 1972b ; Weiner *et al.*, 1976 ; Takahashi *et al.*, 1981 ; Hempel *et al.*, 1993).

Ce chapitre introductif\* a pour vocation de présenter l'état des connaissances sur la classe des aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes. Les termes ALDH(s) et CoA-ALDH(s) désignent respectivement les aldéhyde déshydrogénases non CoA-dépendantes et les aldéhyde déshydrogénases CoA-dépendantes. La première partie de l'introduction s'attachera, dans un premier temps, à présenter les aldéhyde déshydrogénases (ALDHs), à l'exception des CoA-ALDHs, et à les replacer dans un contexte physiologique. Dans un second temps, cette partie se focalisera sur le fonctionnement enzymatique et la structure des aldéhyde déshydrogénases non CoA-dépendantes (ALDHs). Bien que les aldéhyde déshydrogénases CoA-dépendantes appartiennent à la famille des aldéhyde déshydrogénases, elles feront l'objet de la seconde partie de ce chapitre introductif. Cette dernière partie se compose de deux sous-parties, dont la première fait part des CoA-ALDH non décarboxylantes. La seconde sous-partie fait mention des CoA-ALDH carboxylantes et plus particulièrement de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de *Bacillus subtilis*, enzyme sur laquelle porte ce travail de thèse.

\* Toutes ces enzymes présentent également une activité estérasique qui est occultée pour plus de clarté.



# 1. Les aldéhyde déshydrogénases

## 1.1. La physiologie des ALDHs

### 1.1.1. Généralités

Les aldéhydes sont des composés ubiquitaires dans l'environnement. Ils correspondent à des intermédiaires ou à des produits impliqués dans de très divers processus physiologiques et pharmacologiques (Lindahl, 1992). Le caractère électrophile du carbone de la fonction aldéhydique leur confère une forte réactivité (Arnaud, 2004). Les aldéhydes peuvent ainsi établir de façon spécifique ou aspécifique, des liaisons covalentes avec un grand nombre de molécules telles que l'ADN, les phospholipides et les protéines (Guichardant *et al.*, 1998 ; Uchida, 2000 ; Brooks et Theruvathu, 2005 ; DelRio *et al.*, 2005). Par conséquent, la formation de molécules aldéhydiques peut avoir des incidences aussi bien sur la vie cellulaire et le génome que sur l'homéostasie et les traitements thérapeutiques. L'oxydation des aldéhydes par les ALDHs est un des moyens employés pour détoxifier les cellules.

#### 1.1.1.1. L'expression et la localisation des ALDHs chez les eucaryotes

Des ALDHs ont été caractérisées chez divers organismes : vertébrés (mammifères), invertébrés (poulpe, insectes, ...), végétaux, levures, champignons, bactéries et *archae*. Leur expression est constitutive ou induite (Lindahl *et Evces*, 1984a,b ; Bunting *et al.*, 1994). L'induction peut être déclenchée par des molécules endogènes ou exogènes (Antonenkov *et al.*, 1985). Par exemple, le phénobarbital, médicament de la famille des barbituriques, induit la production d'ALDH dans le foie de rat (Dunn *et al.*, 1989 ; Damon *et al.*, 1996).

Au sein d'un même organisme eucaryotique, la localisation subcellulaire est un des critères de distinction des ALDHs. En général, elles se répartissent entre le cytosol, les mitochondries et le microsomes (Eckfeld *et al.*, 1976 ; Lindahl, 1979). Les ALDHs sont également présentes

dans les péroxisomes (Turteltaub *et* Murphy, 1987) et les chloroplastes (O'Connell *et* Kelly, 1989). Les ALDHs mitochondriales possèdent un peptide signal d'importation du côté N-terminal (Braun *et al.*, 1987 ; Wang *et* Weiner, 1994).

Chez les mammifères, les ALDHs sont exprimées dans tous les organes et plus particulièrement dans le foie, les reins et le cerveau (Rothschild *et* Guzman Barron, 1954 ; Erwin *et* Deitrich, 1966). La répartition subcellulaire est conditionnée par le type cellulaire et l'état de la cellule. Dans les hépatocytes de rat, l'activité ALDH se concentre au niveau des mitochondries. Par opposition, une cellule hépatique tumorale présente une forte activité ALDH au niveau du cytosol (Huang *et* Lindahl, 1990).

### 1.1.1.2. Classification des ALDHs

Les enzymes de la super-famille des aldéhyde déshydrogénases (non phosphorylantes) métabolisent une grande variété d'aldéhydes endogènes et exogènes. La présence des gènes codant pour les ALDHs dans la grande majorité des génomes d'*archae*, d'eubacteries et d'eucaryotes soutient la notion que ces enzymes sont des composants importants des processus métaboliques dans les organismes vivants (Sophos *et* Vasiliou, 2003). Les aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes qui appartiennent à cette superfamille peuvent être classées selon leurs spécificités de substrats (Tableau I.1).

Classes d'ALDHs	Dénomination des enzymes	Numéro EC
ALDHs non spécifiques	Aldéhyde déshydrogénases (1,2 et 3)	EC 1.2.1.3
Semialdéhydes déshydrogénases	Semialdéhyde déshydrogénase	EC 1.2.1.32
	Succinate-semialdéhyde déshydrogénase	EC 1.2.1.16(24)
	Methylmalonate-semialdehyde déshydrogénase*	EC 1.2.1.27
	Aspartate semialdehyde déshydrogénase	EC 1.2.1.31
	2-amino-adipate-6-semialdehyde déshydrogénase	EC 1.2.1.32
	Glutamate semialdehyde déshydrogénase	EC 1.2.1.41
Les autres ALDHs	Bétaïne déshydrogénase	EC 1.2.1.8
	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante	EC 1.2.1.9
	Phénylacétaldéhyde déshydrogénase	EC 1.2.1.39
	Lactaldéhyde déshydrogénase	EC 1.2.1.22
Protéines « ALDH-like »	10-formyltetrahydrofolate déshydrogénase	EC 1.5.1.6
	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase	EC 1.5.1.12
	Antiquitine	
	Protéine humaine de liaison aux androgènes de 56kDa	
	Les cristallines	

**Tableau I.1 :** Enzymes de la famille des aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes classées selon la spécificité de substrat (Vasiliou *et al.*, <http://www.aldh.org/>, 2005).

\* cette enzyme fera ultérieurement l'objet d'une attention particulière (voir partie 2.2)

Dans cette famille d'aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes, les protéines sont classées en familles et sous-familles en fonction du pourcentage d'identité de séquences. Des enzymes qui présentent une identité de séquence inférieure à 40 % sont considérées comme appartenant à des familles distinctes tandis que celles qui présentent une identité de séquence

supérieure à 60 % sont considérées comme appartenant à une même sous-famille (Vasiliou *et al.*, 1999). Cette classification est mise en exergue au travers de la notation employée pour désigner les ALDHs (Tableau I.2).

<p style="text-align: center;"><b>ALDH1A1</b></p> <p>Symbole principal Famille Sous-famille Gène</p>	<b>Symbole principal</b>	<u>aldéhyde déshydrogénase</u>
	<b>Famille</b>	Identité de séquences ≤ 40 %
	<b>Sous-famille</b>	Identité de séquences ≥ 60 %
	<b>Gène</b>	Distinction des gènes d'une même sous-famille

**Tableau I.2 :** Nomenclature de classification et de désignation des aldéhyde déshydrogénases non phosphorylantes (Vasiliou *et al.*, <http://www.aldh.org/>, 2005).

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour des ALDHs ont été classés en 20 familles (Sophos *et Vasiliou*, 2003 ; Tableau I.3)

Familles	Enzymes concernées	Distributions des enzymes
ALDH1	ALDHs de classe 1	Humains
	10-formyltetrahydrofolate déshydrogénase	Humains
	ALDH activée par le magnésium	Humains
	Indole-3-acétaldéhyde déshydrogénase	Animaux, Champignons
ALDH2	ALDHs de classe 2	Humains, Plantes
ALDH3	ALDHs de classe 3	Mammifères, Poissons, Insectes, Plantes
ALDH4	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase	Animaux, Plantes, Champignons
ALDH5	succinate-semialdéhyde déshydrogénase	Animaux, Plantes, Champignons
ALDH6	Méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase	Animaux, Plantes
ALDH7	Protéines Antiquitine	Mammifères, Poissons, Plantes
ALDH8	Rétinaldéhyde déshydrogénase	Humains
ALDH9	$\gamma$ -aminobutyraldéhyde déshydrogénase	Mammifères, Poissons
ALDH10	Bétaïne aldéhyde déshydrogénase	Plantes, Levures
ALDH11	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante	Plantes
ALDH12	<i>Inconnue*</i>	Plantes
ALDH13	Proche ALDH3 mammifères	Protozoaires
ALDH14	<i>Inconnue*</i>	Levures
ALDH15	<i>Inconnue*</i>	Levures
ALDH16	<i>Inconnue*</i>	Levures
ALDH17	<i>Inconnue*</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ALDH18	Glutamyl- $\gamma$ -semialdéhyde déshydrogénase	Animaux, Plantes, Champignons
ALDH19	$\gamma$ -glutamyl phosphate reductase	Plantes
ALDH20	Protéines à domaines multiples	Diplomonadida (Protozoaire) Entamoebidae (Protozoaire)

**Tableau I.3 :** Liste des 20 familles d'aldéhyde déshydrogénases chez les eucaryotes et des enzymes appartenant à ces familles (Sophos *et Vasiliou*, 2003).

\* *Inconnue* pour des ALDHs identifiées par alignement de structures primaires, mais dont la fonction est inconnue.

## 1.1.2. Implication des ALDHs humaines dans le métabolisme

En 2004, le génome humain contenait 17 gènes qui appartiennent à la famille des aldéhydes déshydrogénases non phosphorylantes. Ces gènes sont répartis en 10 familles et 13 sous-familles. Les mutations dans plusieurs gènes d'ALDHs sont à l'origine moléculaire des erreurs innées du métabolisme et sont généralement associées à des maladies (Vasiliou *et al.*, 2004).

### 1.1.2.1. Métabolisme de l'éthanol

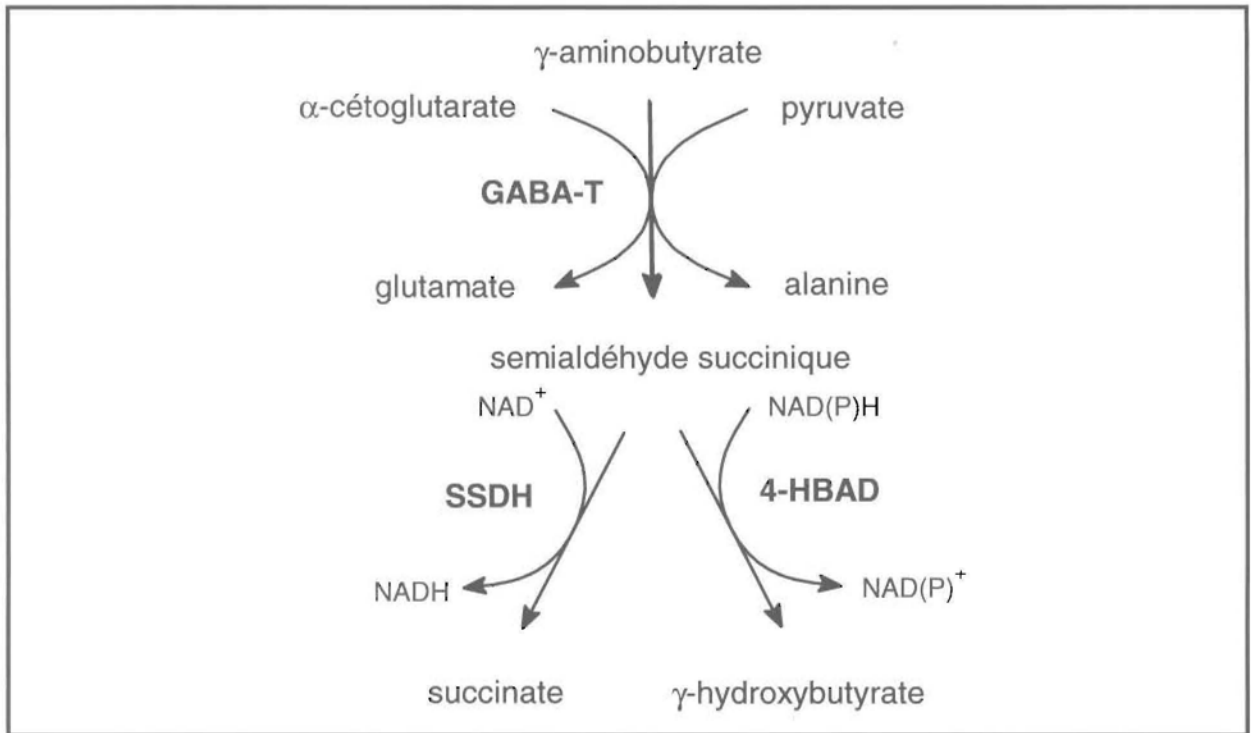
Dans un premier temps, l'attention s'est focalisée sur les ALDHs capables de convertir l'acétaldéhyde en acide acétique. Toutes les ALDHs » sont capables d'effectuer cette conversion avec une efficacité catalytique plus ou moins grande. L'acétaldéhyde est un intermédiaire extrêmement toxique du métabolisme de l'éthanol. L'accumulation d'acétaldéhyde dans l'organisme a des effets secondaires désagréables telles que des nausées et des arythmies cardiaques (Crabb *et al.*, 1989).

Chez l'Homme, 90% de l'éthanol ingéré est éliminé par dégradation métabolique au niveau hépatique. L'ALDH2, mitochondriale, joue un rôle prépondérant dans cette détoxification (Goedde *et Agarwal*, 1990). L'ALDH1A1 cytosolique et l'ALDH1B1 mitochondriale participent également à l'oxydation de l'acétaldéhyde (Ueshima *et al.*, 1993 ; Yoshida *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1995).

Chez 50 % de la population orientale, une déficience de l'ALDH mitochondriale, l'ALDH2, est à l'origine de l'intoxication déclenchée par la consommation d'alcool (Yoshida *et al.*, 1984). Le disulfirame, inhibiteur de l'ALDH2, est une des molécules employées dans le traitement de l'alcoolisme (MacKerell *et al.*, 1985).

### 1.1.2.2. Métabolisme et biosynthèse de GABA

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur majeur qui inhibe le système nerveux central (Olsen, 2002). Il est généré principalement à partir de l'acide glutamique par l'acide glutamique décarboxylase (Olsen, 2002). Le succinique semialdéhyde est un intermédiaire du métabolisme de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (Bessman *et al.*, 1953). Le succinique semialdéhyde est soit métabolisé en acide succinique par succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSDH), l'ALDH5A1 (Chambliss *et Gibson*, 1992) ou soit en 4-hydroxybutyrate par la 4-hydroxybutyrate déshydrogénase (EC 1.1.1.61), 4-HBAD (Nirenberg *et Jakoby*, 1960 ; Breitzkreuz *et al.*, 2003).



**Figure I.4 :** Mécanisme de dégradation de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.  
 GABA-T pour GABA transaminase ; SSDH (ALDH5A1) pour succinate semialdéhyde déshydrogénase et 4-HBAD pour 4-hydroxybutyrate déshydrogénase.

Une perte d'activité de l'ALDH5A1 engendre une acidurie  $\gamma$ -hydroxybutyrique qui est associée à une accumulation de GABA et de 4-hydroxybutyrate dans le sérum sanguin (Pearl *et al.*, 2003). Cette acidurie a un impact grave sur le développement neurologique (Gibson *et al.*, 1998).

Une voie alternative de biosynthèse du GABA implique une déamine oxydase qui catalyse la désamination du 1,4-diaminobutyrate en acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique. Ce dernier est oxydé en GABA par l'ALDH9A1 cytosolique (Ambroziak *et Pietruszko*, 1987). L'ALDH9A1 catalyse l'oxydation d'autres aldéhydes biogéniques qui dérivent de mono-, di- et polyamines comme la bêtaïne aldéhyde (Chern *et Pietruszko*, 1995).

### 1.1.2.3. Métabolisme des aldéhydes gras

Le métabolisme des alcools gras, de l'acide phytanique, des glycérolipides et du leucotriène B4 conduit à la formation de composés aldéhydiques appelés aldéhydes gras. L'ALDH3A2, microsomale et exprimée constitutivement, oxyde tous ces aldéhydes gras (Kelson *et al.*, 1997). Une déficience en ALDH3A2 serait à l'origine de l'accumulation d'alcools gras à longues chaînes, d'aldéhydes gras à longues chaînes et de métabolites en relation (Lin *et al.*, 2000 ; Lossos *et al.*, 2006). La perte de l'activité de l'ALDH3A2 par diverses mutations est à l'origine d'une maladie génétique autosomale récessive, le syndrome de Sjögren-Larsson SLS (De Laurenzi *et al.*, 1996 ; Willensem *et al.*, 2001).

1.1.2.4. Métabolisme des acides aminés

Le catabolisme des acides aminés génère de nombreux intermédiaires métaboliques aldéhydiques. Le glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde est l'intermédiaire commun au métabolisme de la proline (ornithine) et à celui de l'arginine (Figure I.5). Le glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde est en équilibre avec le  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate et est oxydé par l'ALDH4A1 en glutamate (Farrés *et al.*, 1988). Une perte d'activité de l'ALDH4A1 cause une maladie autosomale récessive, l'hyper-prolonémie de type II, qui se manifeste par des troubles neurologiques (Valle *et al.*, 1976 ; Geraghty *et al.*, 1998).

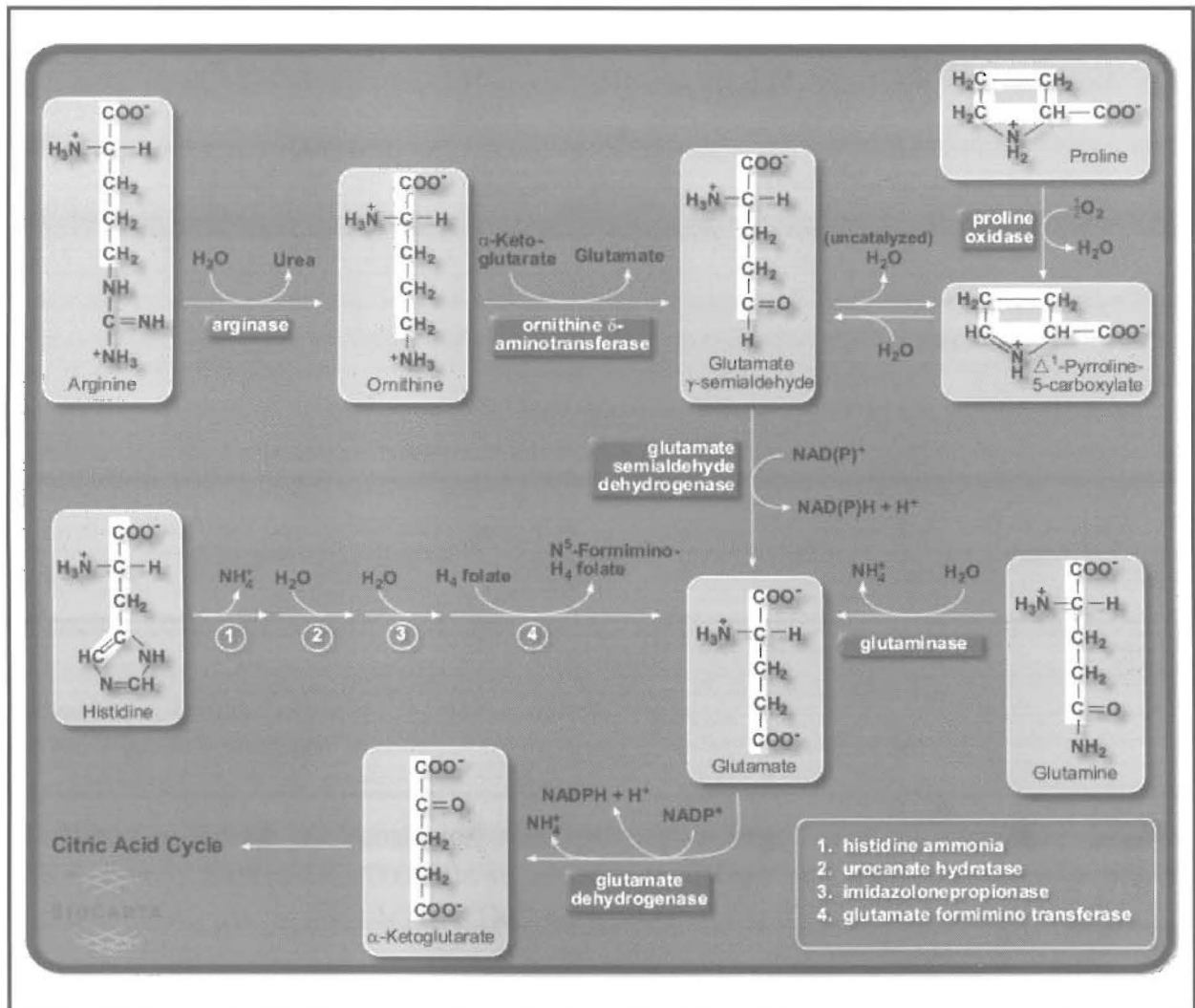


Figure I.5 : Voie de dégradation commune des résidus arginyl et prolyl via le glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde.  
[http://www.biocarta.com/pathfiles/m\\_argininecPathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/m_argininecPathway.asp)

### 1.1.2.5. Métabolisme des aldéhydes issus de la peroxydation des lipides

Plus de 200 aldéhydes ont été identifiés comme des produits résultant de la peroxydation des lipides dont principalement le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et la malondialdéhyde (MDA) (Esterbauer *et al.*, 1991). Plusieurs voies permettent la détoxification du 4-HNE en divers composés dont deux qui utilisent une aldéhyde déshydrogénase :

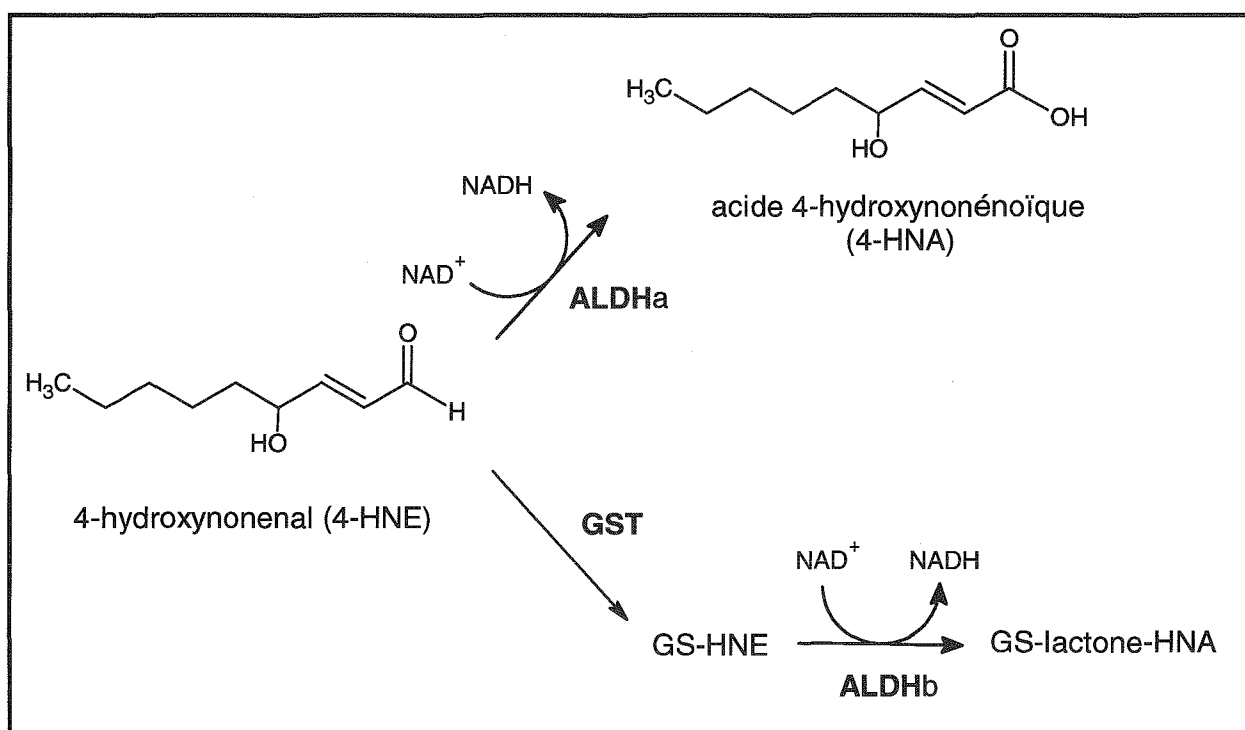


Figure I.6 :

#### Métabolisme du 4-hydroxynonéal (4-HNE).

GST pour glutathione-S-transférase et GS- pour glutathion conjugué.

Le terme ALDHa désignent toutes les ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH2 et ALDH5A1 capables d'oxyder le 4-hydroxynonéal (4-HNE) en acide 4-hydroxynonénoïque (4-HNA), tandis que le terme ALDHb désigne l'ALDH, non identifiée, qui catalyse l'oxydation

Quatre ALDHs, au minimum, jouent un rôle dans l'oxydation du 4-HNE en acide 4-hydroxynonénoïque (4-HNA) : ALDH1A1 (Manzer *et al.*, 2003), ALDH3A1 (Pappa *et al.*, 2003), ALDH2 (Mitchell *et Peterson*, 1987) et ALDH5A1 (Murphy *et al.*, 2003). Aucune ALDH n'a été identifiée pour l'oxydation du GS-HNE en GS-lactone-HNA. A titre d'exemple, lors d'un stress oxydatif, comme une exposition aux ultraviolets, du 4-HNE est produit dans les cellules épithéliales du cristallin de l'œil. L'accumulation de cet aldéhyde induit une cataractogénèse chez l'homme, le rat et la souris. Dans ce cas, la détoxification du 4-HNE par l'ALDH1A1 est à l'origine du maintien de la clarté du cristallin de l'œil (Choudhary *et al.*, 2005).

L'ALDH1A1 est également capable de métaboliser le MDA (Manzer *et al.*, 2003 ; Townsend *et al.*, 2001). L'accumulation du MDA semble être impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Dib *et al.*, 2002). Aujourd'hui, aucune relation n'a pu être démontrée entre l'accumulation de MDA et une déficience en ALDH1A1.

### 1.1.2.6. Métabolisme du cyclophosphamide

Le cyclophosphamide (CP) est un agent alkylant fréquemment employé dans le traitement des maladies hématologiques malignes ou non malignes. Cette prodrogue est activée en 4-hydroxycyclophosphamide (4-hydroxy-CP) par les cytochromes P450 hépatiques. Dans les cellules, le 4-hydroxy-CP est  $\beta$ -éliminé, sous sa forme tautomérique l'aldophosphamide, en « moutarde phosphoramidée » et acroléine actifs. Ces produits inhibent la synthèse d'ADN et induisent la mort cellulaire par alkylation de l'ADN. L'oxydation par une ALDH est une des deux autres voies d'élimination de l'aldophosphamide (Sladek, 1999). L'ALDH1A1, l'ALDH3A1 et l'ALDH5A1 catalysent l'oxydation de l'aldophosphamide en carboxy-phosphamide (Sladek, 1999).

### 1.1.2.7. Métabolisme du folate

L'acide folique (vitamine B9), appelé aussi tétrahydrofolate ou encore folate, est indispensable à toute division cellulaire car il est à la base de réactions intervenant dans la synthèse des acides nucléiques et de certains acides aminés. La 10-formyltétrahydrofolate déshydrogénase (FDH) catalyse la conversion du 10-formyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate et dioxyde de carbone. La FDH est une enzyme bifonctionnelle qui résulte de la fusion de deux gènes. La partie carboxy-terminale de cette enzyme présente jusqu'à 50% d'homologie de séquence avec les membres de la famille des ALDHs et possède une activité aldéhyde déshydrogénase (Cook *et al.*, 1991). L'ALDH1L1 est l'ALDH qui représente les FDH (Cook *et al.*, 1991 ; Vasiliou *et al.*, 2004).

### 1.1.2.8. Biosynthèse de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque (RA) est un facteur critique dans de nombreux processus de développement. L'acide rétinoïque agit directement sur l'expression des gènes en se liant à des récepteurs, les récepteurs d'acide rétinoïque (RAR) qui sont impliqués dans des voies de signalisation (Duester, 2000). La biosynthèse du RA à partir du rétinol procède en deux étapes par l'intermédiaire du rétinol (rétinaldéhyde). Chez l'homme, quatre ALDHs catalysent l'oxydation du rétinol en RA : ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 et ALDH8A1 (Tableau I.7).

ALDHs	Nature du substrat	Rôles potentiels dans le développement	Références
ALDH1A1	all- <i>trans</i> -rétinal* 9- <i>cis</i> -rétinal*	Synthèse de RA	Dockham <i>et al.</i> , 1992 El Akawi et Napoli, 1994
ALDH1A2	all- <i>trans</i> -rétinal* 9- <i>cis</i> -rétinal	Régulateur de la synthèse de RA lors de l'embryogénèse	Wang <i>et al.</i> , 1996 Niederreither <i>et al.</i> , 1997
ALDH1A3	all- <i>trans</i> -rétinal*	Production RA pour la « nasal formation »	Grun <i>et al.</i> , 2000
ALDH8A1	9- <i>cis</i> -rétinal* all- <i>trans</i> -rétinal	Synthèse de RA	Lin <i>et al.</i> , 2003

**Tableau I.7 :** Aldéhyde déshydrogénases impliquées dans l'oxydation du rétinol en RA.  
\* substrat utilisé pour lequel l'enzyme a la meilleure efficacité catalytique.



### 1.1.3. Exemples d'implication des ALDHs

#### 1.1.3.1. Les ALDHs et la détoxification des aldéhydes de sources exogènes

La voie de détoxification la plus connue est celle qui permet d'éliminer l'éthanol exogène via l'acétaldéhyde. Toutes les ALDHs sont capables d'effectuer la conversion de l'acétaldéhyde en acide acétique avec une efficacité catalytique plus ou moins grande. Ce rôle, chez l'Homme, a été discuté dans le paragraphe 1.1.2.1. L'acétaldéhyde déshydrogénase accomplit également cette fonction de détoxification chez *Drosophila melanogaster* qui se développe à proximité de fruits endommagés, sources d'éthanol (Fry *et* Saweikis, 2006).

A l'exception des ALDHs à spécificité de substrat, comme la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase, les ALDHs ont une grande latitude d'action, des aldéhydes aliphatiques aux aldéhydes aromatiques. A titre d'exemple dans les hépatocytes et les érythrocytes humaines, l'ALDH1 (cytosolique) est capable de prendre en charge la détoxification de l'aldophosphamide issu de la biotransformation d'un médicament anti-cancéreux et d'oxyder le rétinaldéhyde en acide rétinoïque (Dockham *et al.*, 1992 ; Dockham *et al.*, 1997).

#### 1.1.3.2. Les ALDHs et le fonctionnement cellulaire

Un stress osmotique (forte salinité, sécheresse par exemple) induit la biosynthèse ou l'intégration de solutés organiques dans le but de créer une force osmotique interne et d'empêcher l'eau de diffuser en dehors de la cellule (Kempf *et* Bremer, 1998). La bêtaïne, avec son ammonium quaternaire N-méthylé, est l'un des osmoprotecteurs employés par les mammifères, les microorganismes et les plantes (LeRudulier *et* Bouillard, 1983 ; Landfald *et* Strøm, 1986 ; Craig, 2004). La bêtaïne ou glycine bêtaïne (Figure I.9) résulte le plus fréquemment de l'oxydation à deux étapes de la choline (Csonka *et* Hanson, 1991). La bêtaïne aldéhyde correspond au métabolite intermédiaire qui est oxydé en bêtaïne par la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (Figure I.9), BADH (Rothschild *et* Guzman Barron, 1954).

Dans les chloroplastes des feuilles d'amarante, plante de la famille des amaranthacées, la BADH (Figure I.8) produit un autre osmoprotecteur puissant, le 3-diméthylsulfoniopropionate, par oxydoréduction du 3-diméthylsulfoniopropionaldéhyde (Vojtěchová *et al.*, 1997).

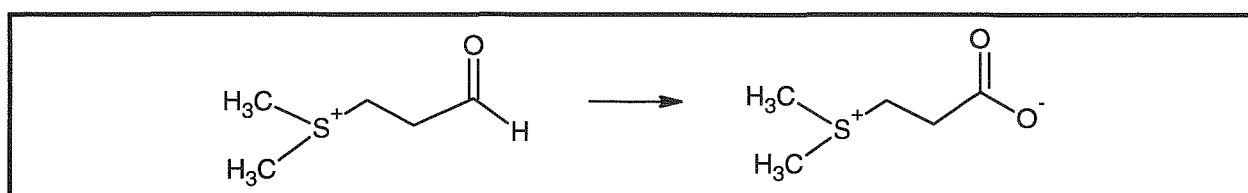
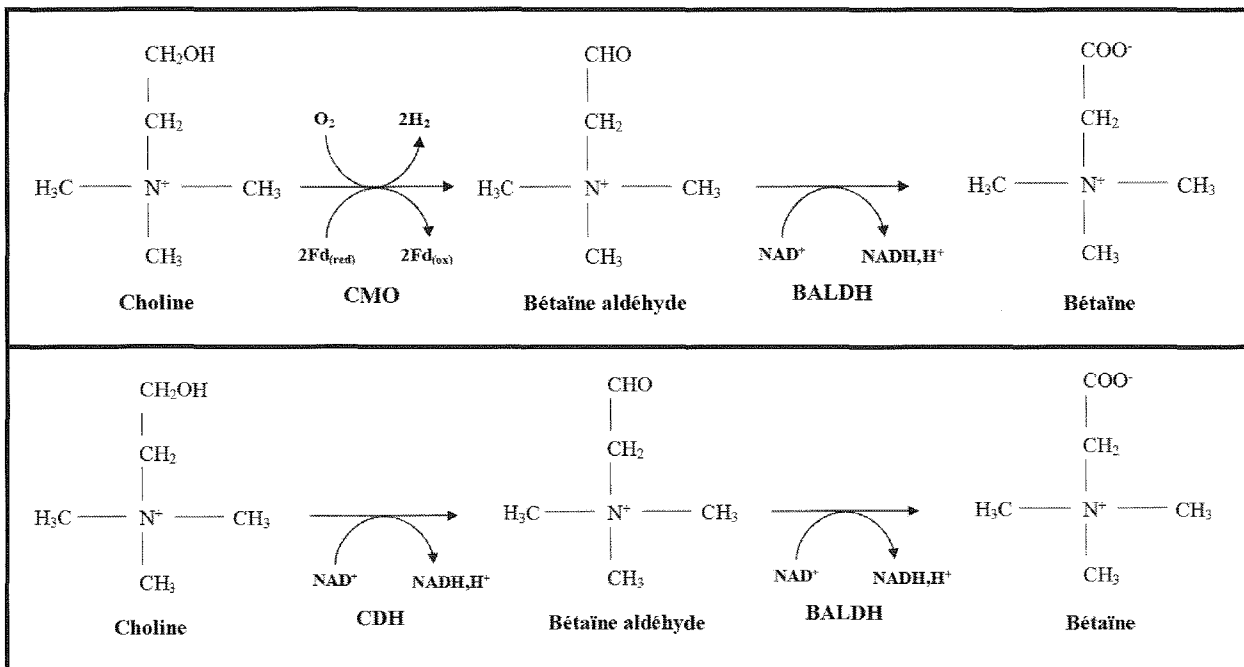


Figure I.8 : Oxydoréduction par la BADH du 3-diméthylsulfoniopropionaldéhyde en 3-diméthylsulfoniopropionate de feuilles d'amarante (Vojtechova *et al.*, 1997).



**Figure I.9 :** Voies de biosynthèse de la bétaine ou glycine bétaine chez les mammifères, les microorganismes et les plantes.

Partie supérieure : Choline monoxygénase (CMO) chez les plantes (Brouquisse *et al.*, 1989 ; Zeigel *et al.*, 1986). Partie inférieure : Choline déshydrogénase (CDH) chez les mammifères et les microorganismes (Barrett *et Dawson*, 1975 ; Zeisel *et Wurtman*, 1981). BALDH pour bétaine aldéhyde déshydrogénase chez les mammifères, les microorganismes et les plantes.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène de plus en plus insensible aux antibiotiques classiques. De plus, elle est capable de croître malgré la forte osmolarité du milieu qui est la conséquence de l'infection des tissus. Dernièrement, des travaux ont montré que la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* est à l'origine de la survie des bactéries lors d'infections de patients. Dans ce cas, cette enzyme permet d'assimiler le carbone et l'azote provenant de la choline et de ses précurseurs et également de produire de la glycine-bétaine. La BADH de *P. aeruginosa* est alors proposée comme cible pour un nouveau traitement antibiotique (Velasco-García *et al.*, 2006).

La bétaine est également un donneur de groupement méthyle comme par exemple dans la réaction de transméthylation de l'homocystéine en méthionine chez l'homme (Rao *et al.*, 1998).

La BADH de *Escherichia coli* présente 75 à 77% et 80 % d'homologie de séquence avec les BADH cytoplasmique du rat et chloroplastique de feuille d'épinards respectivement (Boyd *et al.*, 1991). Chez l'homme, l'oxydation en deux étapes, de la choline en bétaine s'effectue dans la mitochondrie (Chern *et Pietruszko*, 1999).

### 1.1.3.3. Les ALDHs et la « matière première »

Les bactéries et champignons adaptent leurs métabolismes en fonction de leurs milieux de croissance. Les ALDHs permettent à ces organismes d'utiliser un grand nombre de molécules exogènes comme source de carbone et d'énergie (la « matière première »).

Chez *E. coli*, la lactaldéhyde déshydrogénase serait à l'origine de cette adaptation en permettant l'incorporation de L-fucose, du L-ramnose et du L-galactose (Sridhara *et al.*, 1969 ; Chen *et al.*, 1987 ; Zhu *et al.*, 1989).

Chez *Ustilago maydis*, champignon parasite du maïs, l'incorporation du tryptophane et du L-arabinose pourrait s'effectuer par l'intermédiaire de l'indole-3-acétaldéhyde oxydé par une ALDH non spécifique (Basse *et al.*, 1996).

### 1.1.3.4. Les ALDHs et la production d'équivalents réducteurs

Le NADH intervient dans le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP, tandis que le NADPH intervient au niveau cytoplasmique dans la biosynthèse des acides gras et des stérols (Weil, 2005).

Chez les bactéries et les archéons, le NADPH provient essentiellement de la phase oxydative de la voie de pentoses phosphates ou voie d'Entner-Doudoroff (glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase) (Weil, 2005 ; Ahmed *et al.*, 2004).

Un mécanisme alternatif à cette voie (figure 1.1.3.4.a) qui utilise une ALDH, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPN), permet également de produire du NADPH (Boyd *et al.*, 1995 ; Ahmed *et al.*, 2005 ; Iddar *et al.*, 2005). La GAPN catalyse la conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en 3-phosphoglycérate en présence de  $\text{NADP}^+$  (sans molécule de phosphate inorganique).

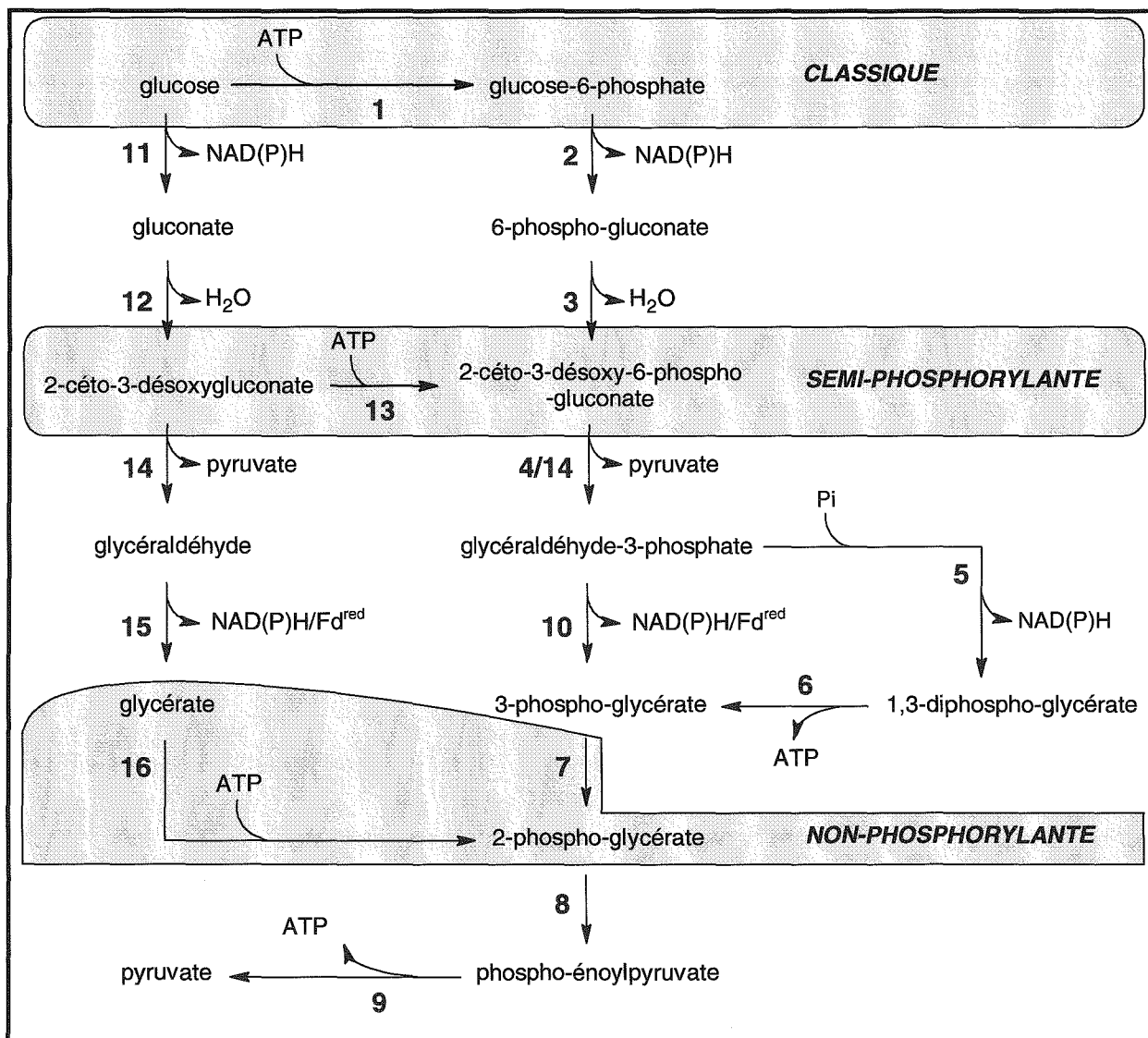
GAPN est également à l'origine de la production de NADPH chez les plantes supérieures photosynthétiques (Habenicht *et al.*, 1994 et 1997) et les algues vertes (Iglesias *et al.*, 1987 ; Bustos *et al.*, 2003).

### 1.1.3.5. Les ALDHs et les protéines de structures

Le cristallin de l'œil est composé à 80-90% de protéines solubles appelées cristallines. Ces protéines sont responsables des propriétés optiques du cristallin et sont également impliquées dans le métabolisme.

Les ALDHs sont les seules cristallines connues qui sont communes aux vertébrés et invertébrés (Wistow *et al.*, 1991 ; Tomarev *et al.*, 1991 ; Tomarev *et al.*, 1996). L' $\Omega$ -cristalline des invertébrés est un homologue de la première classe des ALDH (Zinovieva *et al.*, 1993 ; Piatigorsky, 2003). Chez les mollusques bivalves, l' $\Omega$ -cristalline est désignée par le terme ALDH1A9 (Piatigorsky *et al.*, 2000). L' $\Omega$ -cristalline est généralement un constituant minoritaire du cristallin (Zinovieva *et al.*, 1993). Par opposition, la L-cristalline du calmar (céphalopode décapode) représente 70% des protéines solubles du cristallin (Montgomery *et al.*, 1992). Cette L-cristalline présente environ 50% d'identité de séquence avec

l'ALDH1 humaine. Toutes ces ALDHs du cristallin sont inactives et semble être à l'origine de la transparence du cristallin.



**Figure I.10 :** Catabolisme du glucose par différentes voies d'Entner-Doudoroff (Ahmed *et al.*, 2005).

Les intermédiaires non-phosphorylés sont placés à gauche, tandis que les intermédiaires phosphorylés sont à droite. La réaction essentielle pour les différentes voies d'Entner-Doudoroff (ED) surlignées en vert (glucokinase/hexokinase pour la voie ED classique, KDG kinase pour la voie ED semi-phosphorylante et glycérate kinase pour la voie ED non-phosphorylante ED). Les enzymes impliquées : 1, glucokinase/hexokinase; 2, glucose-6-phosphate déshydrogénase; 3, 6-phosphogluconate deshydratase; 4-, KDPG aldolase; 5, GAPDH; 6, 3-phosphoglycérate kinase; 7, phosphoglycérate mutase; 8, énoïase; 9, pyruvate kinase; 10, GAPN/GAP oxydoréductase; 11, glucose déshydrogénase GDH; 12, gluconate deshydratase GAD; 13, 2-céto-3-désoxygluconate (KDG) kinase; 14, KD(P)G aldolase; 15, aldéhyde déshydrogénase/aldéhyde oxydoréductase et 16, glycérate kinase.

Chez les rats à trompe (vertébrés), l' $\eta$ -cristalline est la protéine majoritaire du cristallin. L' $\eta$ -cristalline appartient à la classe première classe des ALDHs (ALDH1A2) (Graham *et al.*, 1996; Bateman *et al.*, 2003). *In vitro*, cette ALDH convertit le rétinaldéhyde en acide rétinique. *In vivo*, l' $\eta$ -cristalline aurait uniquement un rôle structural dans le cristallin.

Dans la cornée de lapin, l'ALDH1 présente des propriétés comparables à celles des ALDHs du cristallin (Evces *et* Lindahl, 1989 ; Jester *et al.*, 1999 ; Piatigorsky *et al.*, 2001).

## 1.2. L'avancée des connaissances sur les ALDHs

### 1.2.1. Préambule

Dans les milieux biologiques, chaque constituant est présent en faible concentration. Par conséquent, une réaction organique a une probabilité très faible de se produire. En rassemblant les partenaires de la réaction chimique, les enzymes ont pour fonction d'augmenter cette probabilité. Une fois complexés aux enzymes, les réactifs se trouvent dans un nouvel environnement qui est propre à chaque enzyme. Les enzymes participent fréquemment à la réaction chimique par l'intermédiaire de certaines de ses fonctions chimiques. L'addition de toutes ces fonctions conduit à abaisser les barrières énergétiques des réactions catalysées permettant ainsi à celles-ci de se produire dans les conditions physiologiques. Les enzymes sont qualifiées de catalyseurs biologiques.

L'étude d'une réaction enzymatique débute après caractérisation des principaux intervenants : le réactif (appelé substrat) et le produit final. La littérature a rapidement montré qu'une majorité d'enzyme nécessite l'intervention de partenaires : cofacteurs ou coenzymes. L'enzyme dépourvue de ses cofacteurs est qualifiée d'apoenzyme par opposition au terme holoenzyme qui correspond à l'association enzyme/cofacteur(s).

A ce stade de l'étude, l'enzyme peut être classée en fonction de la réaction catalysée (oxydoréduction, transfert de groupement, ...), de la fonction chimique mise en jeu (alcool, cétones, ...), des cofacteurs (NAD(P)<sup>+</sup>, cytochrome, ... ) ou des groupements échangés (méthyl, acétyl-CoA, ...). A la suite de la réaction catalysée, l'enzyme se retrouve dans son état initial ou est modifiée de façon covalente (intra- ou intermoléculaire) ou non covalente. Dans ce dernier cas, elle devra être régénérée. Cette régénération nécessite fréquemment l'intervention d'une autre enzyme.

Une réaction catalysée par une enzyme est caractérisée par le nombre d'étapes, l'ordre d'intervention des molécules, par les états intermédiaires de l'enzyme et par sa réversibilité ou irréversibilité. Au cours de la réaction, les enzymes peuvent se trouver dans différents états conformationnels et être modifiées de façon covalente. Avant d'aboutir au produit final, le substrat peut passer par différents états intermédiaires (isolables) et/ou transitoires (non isolables).

Au niveau structural, les enzymes présentent des états oligomériques variés. Les contacts inter-monomérique sont de natures variées : liaisons covalentes, électrostatiques, hydrogène et/ou de van der Waals. Lorsque ces contacts sont concentrés sur une petite zone du monomère, celle-ci est appelée domaine d'oligomérisation. Chez les enzymes oligomériques, soit chaque monomère est actif, soit l'activité chimique est répartie sur l'ensemble du

multimère. Un monomère en activité peut influencer, positivement ou négativement, l'activité de ses associés : c'est la coopérativité.

L'acte catalytique nécessite généralement l'intervention de résidus aminoacyls spécifiques qui sont qualifiés de résidus aminoacyls catalytiques.

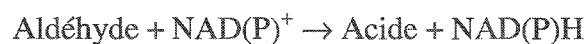
## 1.2.2. Les ALDHs avant la connaissance de la structure tridimensionnelle

Ce paragraphe rapporte toutes les hypothèses qui ont été émises au sujet du fonctionnement enzymatique des ALDHs et qui s'avèrent être proches des hypothèses actuelles.

### 1.2.2.1. Les ALDHs cofacteur-dépendantes

#### 1.2.2.1.1. Présentation

L'activité aldéhyde déshydrogénase a été révélée en 1949 par les travaux de Racker sur la « dismutation » de l'acétaldéhyde en éthanol et acide acétique. L'activité déshydrogénase s'effectue indépendamment de la réaction de conversion de l'acétaldéhyde en éthanol. Les ALDHs sont capables de convertir des aldéhydes à chaînes aliphatiques de longueurs variables et des aldéhydes aromatiques, en leurs acides correspondants (Racker 1949 ; Kraemer et Deitrich, 1968). Certaines d'entre elles présentent une spécificité de substrat comme la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (Rothschild et Guzman Barron, 1954). L'activité aldéhyde déshydrogénase nécessite la présence d'un cofacteur de type dinucléotide diphosphate (Racker, 1949 ; Erwin et Deitrich, 1966). La majorité des ALDHs sont NAD<sup>+</sup>-dépendantes à l'exception de quelques unes qui sont NADP<sup>+</sup>-dépendantes (Guerrillot et Vandcasteele, 1977 ; Byers et Meighen, 1984). L'activité enzymatique est suivie par la mesure de l'absorbance à 340 nm du cofacteur réduit (Racker, 1949) :

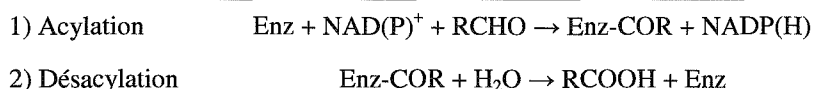


La conversion des aldéhydes en acides correspondants par les ALDHs est irréversible (Rothschild et Guzman Barron, 1954 ; Kraemer et Dietrich, 1968 ; Feldman et Weiner ; 1972). Les aldéhyde déshydrogénases sont classées dans la famille des oxydoréductases car elles agissent sur les fonctions aldéhydiques et transfèrent un hydrure (H<sup>-</sup>) sur un cofacteur de type NAD(P)<sup>+</sup> : EC 1.2.1.3 (Enzyme Nomenclature Committee, 1992).

Les ALDHs existent sous deux formes oligomériques : le tétramère (Feldman *et* Weiner, 1972a) ou le dimère (von Tigerström *et* Razzell, 1968b). Cette association oligomérique est régie par tous les types de liaisons à l'exception de la liaison covalente (Loomes *et* Jörnvall, 1991). Chaque monomère a une taille moyenne de 50 à 60 kDa (Eckfeld *et al.*, 1976 ; Weretilnyk *et* Hanson, 1989 Archiv). En 1954, Rothschild et Guzman Barron supposent que d'un point de vue tridimensionnel, le site d'oxydation est situé à proximité de celui de la réduction. Cette hypothèse est réitérée en 1981 par Bahr-Lindström et ses collaborateurs puis en 1989 par Kitson.

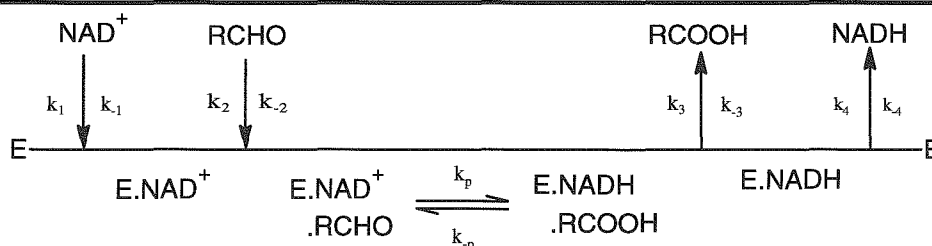
## 1.2.2.1.2. Le mécanisme catalytique

L'oxydoréduction des aldéhydes en acides correspondant par les ALDHs est effectuée en deux étapes (Schéma I.11 ; Rothschild *et* Guzman Barron, 1954 ; Ting *et* Crabbe, 1983) et dans un ordre établi (von Tigerström *et* Razzell, 1968a ; Ting *et* Crabbe, 1983). Le mécanisme est qualifié de Bi Bi ordonné selon la nomenclature de Cleland (Cleland, 1967 ; Vallari *et* Pietruzsko, 1984b). Il s'agit d'un système à deux substrats et deux produits (Bi Bi), la fixation des substrats et la libération des produits s'effectuent dans un ordre établi (ordonné) et la réaction débute après la fixation séquentielle des deux substrats (Schéma I.12).

**Schéma I.11 : Mécanisme réactionnel à deux étapes des aldéhyde déshydrogénases.**

L'enzyme est symbolisée par « Enz », RCHO désigne un aldéhyde où « R » permet de distinguer les aldéhydes. L'acylenzyme est représenté par Enz-COR et le produit par RCOOH.

L'établissement du complexe binaire par fixation  $\text{NAD(P)}^+$  sur l'enzyme précède nécessairement la fixation du substrat en vue de former un complexe ternaire compétent (Duncan *et* Tipton, 1970 ; Eckfeld *et* Yonetani, 1976). La première étape correspond à la formation de l'acylenzyme et du cofacteur réduit  $\text{NAD(P)H}$  (Feldman *et* Weiner, 1972) : c'est l'étape d'acylation. La seconde étape aboutit à la libération de l'acide formé puis relâche du  $\text{NAD(P)H}$  (Vallari *et* Pietruzsko, 1984b) : c'est l'étape de désacylation.

**Schéma I.12 : Mécanisme catalytique séquentiel ordonné de l'aldéhyde déshydrogénase de foie humain (Vallari *et* Pietruzsko, 1984b).**

La lettre « E » est utilisée pour représenter l'enzyme. RCHO et RCOOH sont utilisés pour désigner respectivement aldéhyde et un acide. Le « . » signifie que les éléments  $\text{NAD}^+$ , RCHO,  $\text{NADH}$  et RCOOH sont complexés à l'enzyme.

L'acylenzyme est formé par attaque d'un groupement nucléophile sur le carbone électrophile de la fonction aldéhydique (Deitrich *et al.*, 1962). L'attaque nucléophile est assurée par un groupement sulfhydryle ( $-\text{SH}$ ) qui appartient à la chaîne latérale d'une cystéine de l'enzyme (Feldman *et* Weiner, 1972b, von Bahr-Lindström *et al.*, 1985). Sur la base du mécanisme catalytique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Feldman *et* Weiner (1972) ont montré que la formation de l'acylenzyme est précédée par la formation d'un intermédiaire réactionnel tétraédrique, de type hémithioacétal (Schéma I.13).

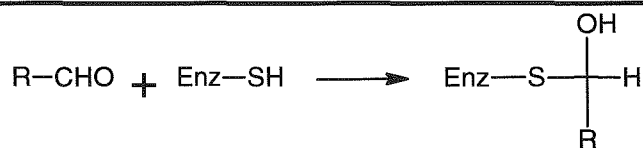
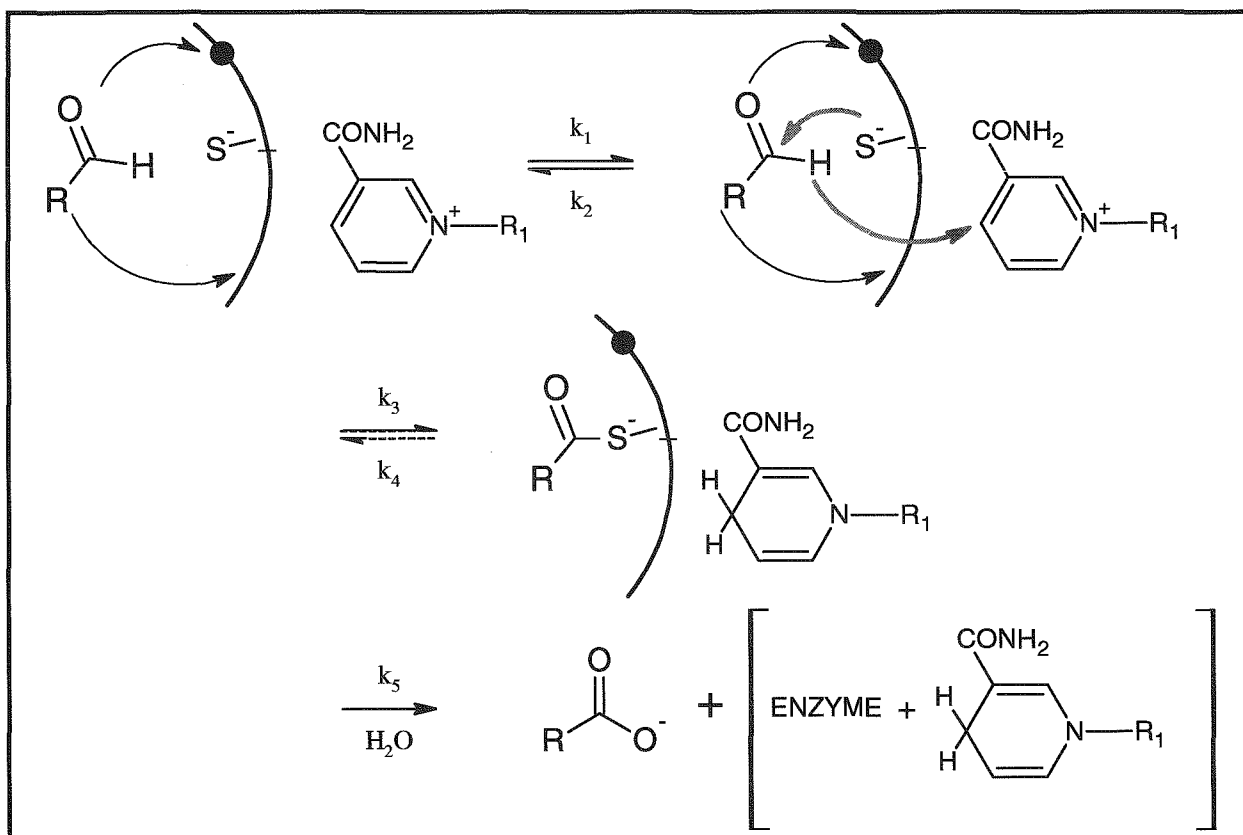


Schéma I.13 : Intermédiaire hémithioacétal proposé par Feldman et Weiner (1972).

L'enzyme est symbolisée par « Enz ». Le fonction sulfhydryle réactive de l'enzyme est représentée sous -SH. R-CHO désigne un aldéhyde quelconque.

L'hydrure, issu de la fonction aldéhydique, est transféré de façon stéréospécifique sur le quatrième carbone (voir nomenclature  $\text{NAD}^+$  en annexe) du cycle nicotinamide du  $\text{NAD(P)}^+$  (Levy et Vennessland, 1957). Jones et ses collaborateurs (1987) ont montré une stéréospécificité de type pro-*R* pour les aldéhyde déshydrogénases de foie de rat. Cette première étape est conditionnée par la fixation et l'orientation du substrat et du cofacteur dans l'enzyme. Deitrich et ses collaborateurs (1962) ont supposé que l'orientation et la stabilisation du substrat sont nécessaires pour une efficacité catalytique optimale. Ils ont alors proposé un mécanisme catalytique où apparaissent des points d'ancrage, non covalents, entre le substrat et l'enzyme (Schéma I.14).

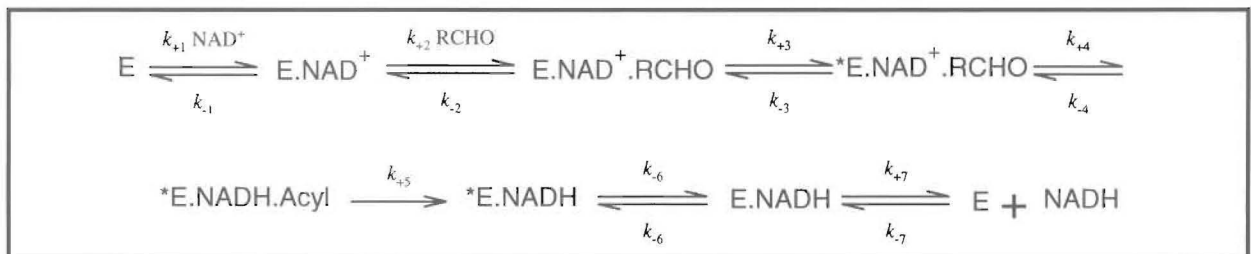
Schéma I.14 : Mécanisme catalytique de l'aldéhyde déshydrogénase de foie de bovin (Dietrich *et al.*, 1962).

RCHO désigne un aldéhyde quelconque.  $\text{R}_1$  désigne les parties ribose + pyrophosphate + adénosine du cofacteur dinucléotidique.  $\text{S}^-$  correspond à l'atome de soufre de la chaîne latérale du résidu cystéyl impliqué dans la réaction. Les flèches en noire représente les interactions supposées entre le substrat et l'enzyme, tandis que les flèches rouges indiquent le processus réactionnel.



L'ordre de la réaction est à mettre en relation avec la flexibilité conformationnelle des ALDHs. Les enzymes sont dites plus réactives à la suite de la fixation du  $\text{NAD(P)}^+$  (von Tigerström *et Razzell*, 1968a ; Hart *et Dickinson*, 1978). Cette fixation engendre un changement conformationnel qui rend les fonctions thiol ( $-\text{SH}$ ) plus accessibles et donc plus aptes à attaquer la fonction aldéhydique (Wiseman *et al.*, 1980 ; Kitson, 1981). Cette augmentation de la réactivité des ALDHs est également montrée par le changement de la valeur du pKa d'une fonction chimique réactive titrée : de 8,5 à 5 (Bennett *et al.*, 1983). Le NADH est libéré suite à un changement de conformation de l'enzyme (MacGibbon *et al.*, 1977a ; Bennett *et al.*, 1982 ; Blackwell *et al.*, 1987). Par conséquent, la conformation des ALDHs évolue tout au long de la réaction.

Blackwell et ses collaborateurs (1987) présentent un mécanisme catalytique pour les aldéhyde déshydrogénases où chaque étape est définie par ses constantes de vitesses  $k_x$  et  $k_{-x}$ . La constante de vitesse globale de la réaction d'oxydoréduction est conditionnée par la vitesse de réaction la plus lente (Schéma I.15).



**Schéma I.15 :** Mécanisme catalytique des aldéhyde déshydrogénases (Blackwell *et al.*, 1987).

« E » et « E\* » correspondent respectivement à l'enzyme sous sa forme native et non native. RCHO et RCOOH sont utilisés pour désignés respectivement aldéhyde et un acide.

Le « . » signifie que les éléments  $\text{NAD}^+$ , RCHO, NADH et RCOOH sont complexés à l'enzyme.

En fonction des ALDHs, l'acylation (Dietrich *et al.*, 1962 ; Mann *et Weiner*, 1999) ou la désacylation limite la vitesse de la réaction. Lors de l'étape de désacylation, soit l'attaque nucléophile (Feldman *et Weiner*, 1972) ou soit la libération du  $\text{NAD(P)H}$  (Eckfeld *et Yonetani*, 1976 ; Hill *et al.*, 1991) est limitante.

Certaines ALDHs tétramériques présentent une réactivité de demi-site : deux sous-unités actives par tétramère (Hart *et Dickinson*, 1977 ; Ambroziak *et al.*, 1989). Dans ce cas, deux molécules de  $\text{NAD(P)H}$  sont titrées par tétramère.

L'activité catalytique est influencée par des éléments chimiques extérieurs. Etant donnée la nature des fonctions réactives ( $-\text{SH}$ ), l'étude *in vitro* de l'activité des ALDHs nécessite de se placer en condition réductrice (Jakoby, 1958a,b ; von Tigerström *et Razzell*, 1968a). L'activité des ALDHs tétramériques de mammifères est modulée par la présence de cations divalents (Takahashi *et Weiner*, 1980). Le cation  $\text{Mg}^{2+}$  inhibe l'activité des ALDHs du cytosol (Takahashi *et al.*, 1980 ; Vallari *et Pietruszko*, 1984a) et augmente l'efficacité catalytique des ALDHs mitochondriales (Dickinson *et Hart*, 1982 ; Vallari *et Pietruszko*, 1984b).

Etant donné le pKa de la fonction sulfhydryle (-SH) d'une cystéine (environ 8,7), la cystéine catalytique doit être activée sous forme de thiolate (-S<sup>-</sup>). Deux hypothèses ont été proposées quant à l'origine de cette activation. La première hypothèse fait intervenir une base, un glutamate, qui activerait la cystéine en prenant l'hydrogène de la fonction thiol (Kitson *et* Kitson, 1994). Dans le cas de la deuxième hypothèse, la charge positive portée par le nicotinamide du NAD<sup>+</sup> serait à l'origine du changement de pKa de la fonction thiol de la cystéine de telle sorte qu'elle soit sous forme de thiolate (Farres *et al.*, 1994).

#### 1.2.2.1.3. Les résidus aminoacyls impliqués

Un monomère d'aldéhyde déshydrogénase est composé de 500 résidus aminoacyls en moyenne (Farres *et al.*, 1989 ; Guan *et* Weiner, 1990).

La majorité des résidus aminoacyls impliqués dans la catalyse ont été identifiés par l'étude des ALDHs de mammifères. De plus, la numérotation de ces résidus essentiels est basée sur la numérotation de la séquence des aldéhyde déshydrogénases cytosolique et mitochondriale humaines (Hempel *et al.*, 1993).

L'attaque nucléophile du substrat est réalisée par le groupement thiol d'une cystéine du site actif (Hempel *et al.*, 1982). L'alignement de seize structures primaires d'ALDH (Hempel *et al.*, 1993) ainsi que des titrations par l'iodoacétamide (Farres *et al.*, 1995) ont permis d'identifier avec précision la « cystéine catalytique » du site actif : le résidu **cystéinyl 302**.

Chez les GAPDH, le rôle de résidu aminoacyl nucléophile est également tenu par une cystéine. La fonction thiol de ce dernier est activée par une histidine (Polgar, 1975). Sur ces connaissances, Takahashi et ses collaborateurs ont imputé un mécanisme similaire aux ALDHs (1981) avec deux résidus cystéinyl et histidyl catalytique. Cette hypothèse a été réfutée par les travaux d'Abriola et de ses collaborateurs (1987). En fait, le résidu **glutamyl 268** est le second résidu aminoacyl essentiel du site actif (Hempel *et al.*, 1989 ; Abriola *et al.*, 1990 ; Wang *et* Weiner, 1995).

Un troisième résidu aminoacyl a été révélé par l'étude d'une ALDH mitochondriale humaine inactive (Yoshida *et al.*, 1984). La mutation du résidu **glutamyl 487** en résidus lysinyl suffit à rendre cette ALDH inactive (Hempel *et al.*, 1984). Par contre, les mutations en résidus glutaminyl, asparaginylyl ou histidyl sont conservatives (Kurys *et al.*, 1993 ; Farres *et al.*, 1994). L'affinité de l'enzyme pour son cofacteur est diminuée chez les mutants Glu487Lys (Farres *et al.*, 1994). Ainsi, le résidu glutamyl 487 participe à la fixation du NAD(P)<sup>+</sup>.

Un autre résidu aminoacyl, séryl 74, participe à la fixation du NAD(P)<sup>+</sup> et plus particulièrement à la fixation de son motif pyrophosphate (Loomes *et al.*, 1990 ; Rout *et* Weiner, 1994).

La Cys302, le Glu268 et le Glu487 sont strictement conservés (Hempel *et al.*, 1993). Seule la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase ne présente pas de Glu268 (Hempel *et al.*, 1993). La particularité catalytique de cette enzyme à coenzyme-A pourrait expliquer cette absence (Kedishvili *et al.*, 1992).

L'avènement des séquençages et des alignements de séquences, a permis d'identifier une séquence signature de la fixation du NAD(P)<sup>+</sup> (Hempel *et al.*, 1993). Cette séquence est comparable à celle du repliement de Rossmann, GxGxxG où « x » désigne un résidu

aminoacyls quelconque (Rossman *et al.*, 1974). Les résidus glycylys 245 et 250 représentent la séquence signature de la fixation du cofacteur (Hempel *et al.*, 1984 ; Loomes *et Jörnvall*, 1991 ; Vedadi *et al.*, 1995). Le second résidu glycylyl est le plus souvent remplacée par un résidu thréonyl en position 247 (Hempel *et al.*, 1993). Ainsi, le site de fixation du NAD(P)<sup>+</sup> a une topologie de repliement de type  $\alpha/\beta$  plan.

### 1.2.2.2. Les ALDHs cations-dépendantes de *Saccharomyces cerevisiae*

#### 1.2.2.2.1. Présentation

En 1951, Black découvrit la première ALDH de *Saccharomyces cerevisiae*, activée par K<sup>+</sup> et NAD(P)<sup>+</sup>-dépendante (Black, 1951 ; Seegmiller, 1953 ; Bostian et Betts, 1978a,b). Elle a été qualifiée « d'ALDH de Black ». Cette enzyme mitochondriale (Jacobson et Bernofsky 1974) se présente sous la forme d'un homotétramère de 200 kDa de masse moléculaire (Steinman et Jakoby, 1967 et 1968 ; Clark et Jakoby, 1970a, b). En condition aérobie, elle est impliquée dans le métabolisme oxydatif de l'éthanol via l'oxydo-réduction de l'acétaldéhyde.

En 1953, Seegmiller mit en évidence une seconde ALDH dans le cytosol de la levure de boulanger, activée par Mg<sup>2+</sup> et NADP<sup>+</sup>-dépendante. Cette dernière est un homotétramère d'environ 190 kDa de masse moléculaire (Dickinson, 1996). Bien que présente en condition aérobie, l'ALDH cytosolique de levure participe principalement à l'oxydation du pyruvate en acétaldéhyde spécifique de la fermentation.

#### 1.2.2.2.2. ALDHs K<sup>+</sup>-dépendantes

##### Description

L'étude du mécanisme catalytique de « l'ALDH de Black » a mis en évidence deux ALDHs K<sup>+</sup>-dépendantes. Dans un premier temps, les travaux de Bradbury et des ses collaborateurs ont montré que l'ALDH de levure de boulanger présente un mécanisme catalytique propre. En effet, le cofacteur NAD(P)<sup>+</sup> se fixe uniquement sur le complexe binaire enzyme-substrat (Bradbury et Jakoby, 1971a-b et 1972). L'acide (le produit) serait relâché avant le cofacteur réduit selon un mécanisme bi-bi ordonné (Cleland, 1963).

Dans un second temps, en 1978b, une autre ALDH K<sup>+</sup>-dépendante a été révélée par les études de Bostian et Betts. Elle se distingue de la précédente ALDH à K<sup>+</sup> par son mécanisme catalytique. Les études enzymatiques ont montré que cette nouvelle ALDH, stimulée par K<sup>+</sup>, présente un mécanisme semblable à celui des ALDHs de mammifères où le complexe binaire correspond à la fixation du cofacteur sur l'enzyme. Dans ce cas, la fixation du NAD<sup>+</sup> induirait un changement de conformation qui augmenterait la constante d'association pour le substrat et qui rendrait les groupements sulfhydryles plus accessibles et par conséquent plus réactifs (Wiseman *et al.*, 1980).

Rôle du cation monovalent ( $K^+$ )

La fixation d'ions  $K^+$  induit un nouvel état conformationnel de l'enzyme qui est stable dans le temps (Betts *et al.*, 1979 ; Bostian *et al.*, 1982 ; Dickinson *et al.*, 1987). Selon Bostian et ses collaborateurs (1982), l'ALDH  $K^+$ -dépendante de *S. cerevisiae* a deux types de sites de fixation de l'ion  $K^+$ .

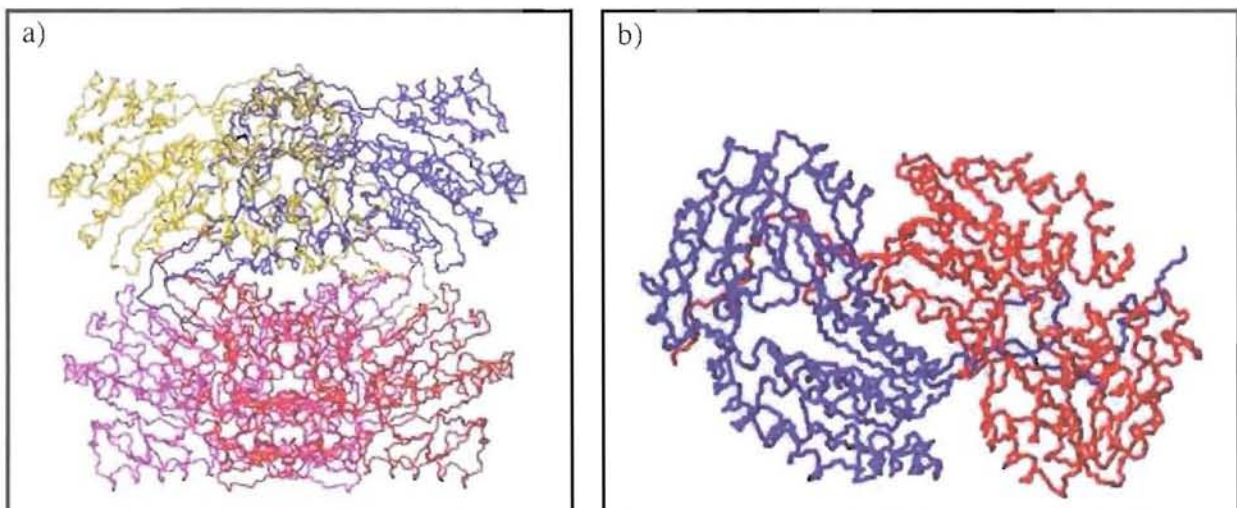
1.2.2.2.3. ALDH  $Mg^{2+}$ -dépendante (Dickinson, 1996)

L'étude enzymatique de l'ALDH cytosolique de *S. cerevisiae* révèle un temps de latence. Celui-ci est supprimé par pré-incubation de l'enzyme avec son cofacteur, le  $NADP^+$ . La fixation de ce dernier induit un changement de conformation lent de l'enzyme. Ainsi, l'enzyme passe d'un état faiblement actif à un état complètement actif. L'addition de  $Mg^{2+}$  augmente l'affinité de l'enzyme pour son cofacteur  $NADP^+$  et stabilise également le complexe binaire enzyme/ $NADP^+$ .

**1.2.3. La structure tridimensionnelle des ALDHs**

En 1997, une structure d'ALDH dimérique de rat (ALDH3) et une structure d'ALDH tétramérique de bovin (ALDH2) ont été publiées (Liu *et al.*, 1997 ; Steinmetz *et al.*, 1997). Mises à part quelques ALDHs, comme l'ALDH3 (Figure 1.16), les ALDHs sont composées de quatre sous-unités identiques : ce sont des homotétramères (Figure 1.16). C'est pour cette raison que la première structure d'ALDH tétramérique, l'ALDH2 bovine, est la structure de référence pour les ALDHs (Steinmetz *et al.*, 1997).

Qu'elles soient dimériques ou tétramériques, les ALDHs présentent un repliement identique de leurs sous-unités. Chaque monomère se subdivise en trois domaines structuraux distincts : le domaine de fixation du cofacteur, le domaine catalytique et le domaine d'oligomérisation.



**Figure 1.16 :** a) Tétramère de l'ALDH mitochondriale de bovin (ALDH2) (Steinmetz *et al.*, 1997).  
b) Dimère de l'ALDH3 de rat (Liu *et al.*, 1997).



### 1.2.3.1. Structure de l'ALDH2 bovine (Steinmetz *et al.*, 1997)

L'ALDH2 de foie de bovin est un homotétramère qui présente une masse moléculaire de 218 kDa. Les quatre monomères sont superposables entre eux. L'enchaînement des structures secondaires d'un monomère est détaillé dans le Schéma , tandis que la structure et la topologie du monomère sont respectivement présentées dans la Figure et Figure I.20.

$\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_1\alpha_2\alpha_3$	$\beta_5\beta_6$	$\beta_A\alpha_6\beta_B\alpha_C\beta_C\alpha_D\beta_D\alpha_E\beta_E$	$\beta_A'\alpha_B'\beta_B'\alpha_C'\alpha_4\beta_7\beta_8\alpha_5\beta_C'\alpha_D'\beta_D'\alpha_E'\beta_E'$	$\beta_9\alpha_6$	$\beta_{10}$
DFC 1 <sup>ère</sup> partie	DO	DFC 2 <sup>ème</sup> partie	DC	DFC 3 <sup>ème</sup> partie	DO

Schéma I.17 :

#### Enchaînement des structures secondaires de l'ALDH2 de foie de bovin.

Le brin  $\beta_1$  est situé à l'extrémité amino-terminale tandis que le brin  $\beta_{10}$  est à l'extrémité carboxy-terminale. DFC pour domaine de fixation du cofacteur, DO pour domaine d'oligomérisation et DC pour domaine catalytique.

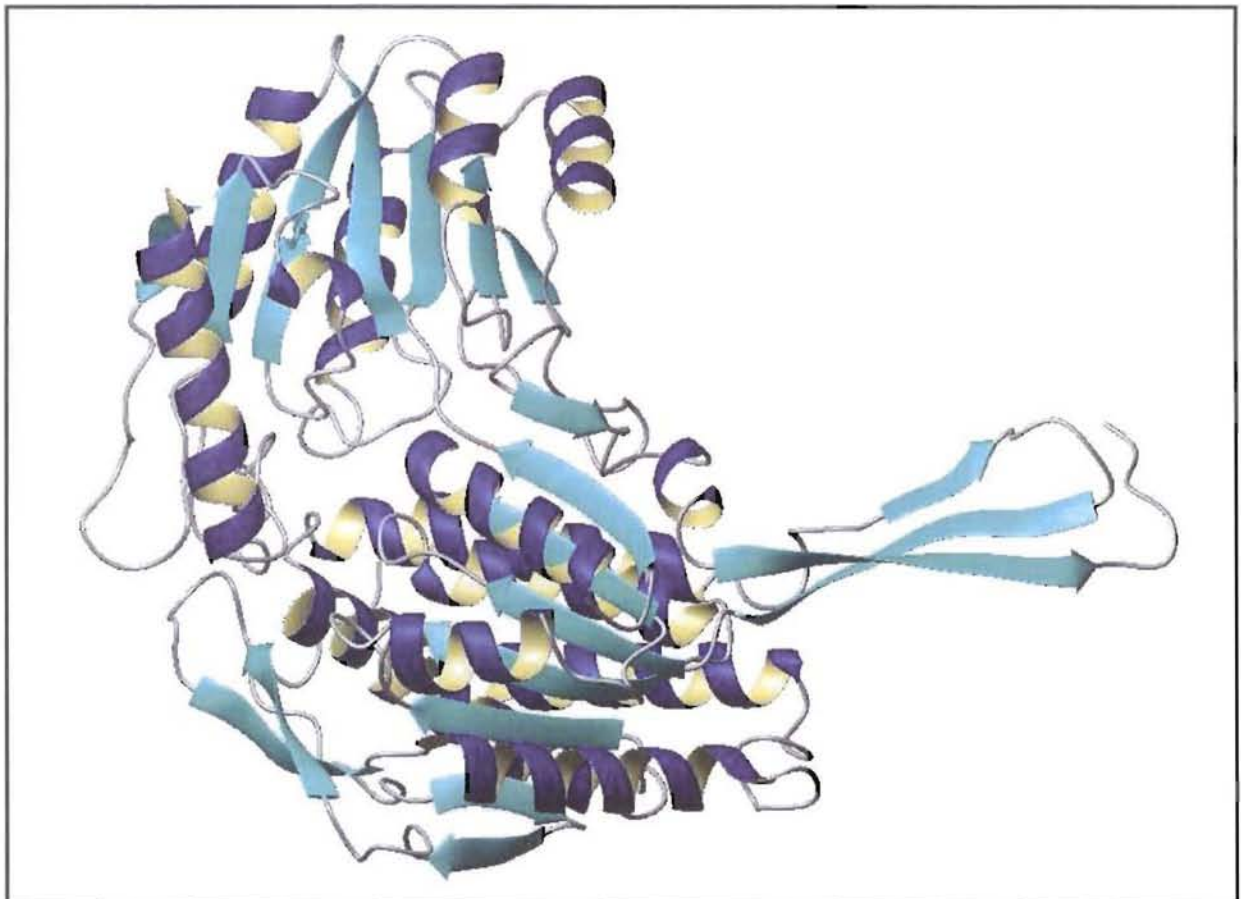
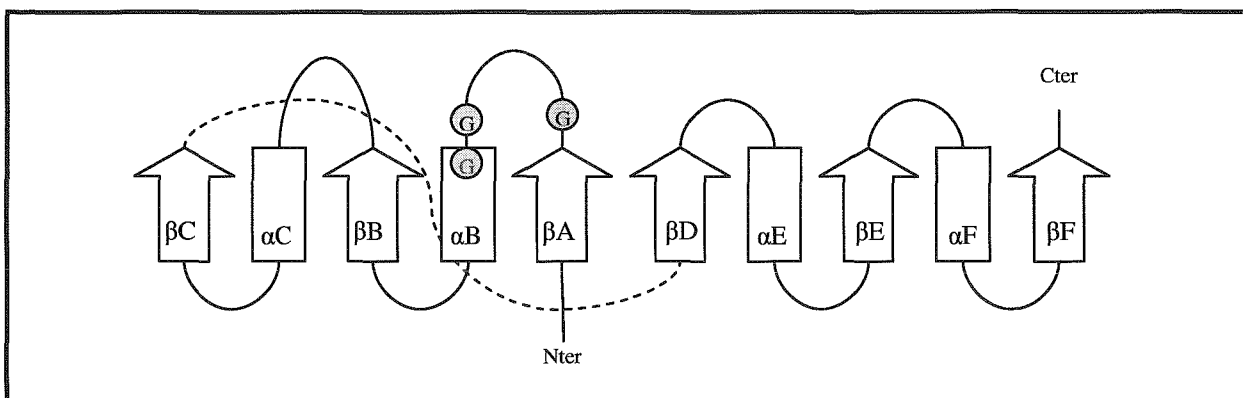


Figure I.18 :

#### Réprésentation en rubans du monomère de l'ALDH2 humaine.

Les hélices et les brins sont respectivement colorés en bleus indigo et bleu turquoise.

Le domaine d'oligomérisation est structuré en feuillet  $\beta$  anti-parallèle à trois brins. Le domaine de fixation du cofacteur et le domaine catalytique sont repliés sur la base du même motif, le repliement canonique de Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974). Ce dernier correspond à une topologie de repliement de type  $\alpha/\beta$  plane qui est caractéristique du site de fixation des cofacteurs dinucléotidiques comme le  $\text{NAD}^+$  et le  $\text{NADP}^+$  (Ohlsson *et al.*, 1974 ; Rossmann *et al.*, 1975). Le repliement de Rossmann\* est constitué de deux motifs identiques qui sont chacun composés de trois brins disposés en feuillet  $\beta$  parallèle et de deux hélices  $\alpha$  qui connectent les brins entre eux :  $\beta_A\alpha_B\beta_C$  et  $\beta_D\alpha_E\beta_F$  respectivement (Figure ). Ces deux motifs sont juxtaposés par le premier brin de chaque motif ( $\beta_A$  et  $\beta_D$ ). Le repliement canonique de Rossmann possède la séquence signature suivante : GxGxxG. Les deux premiers résidus glycine de cette séquence sont localisés sur la boucle qui relie le brin  $\beta_A$  et l'hélice  $\alpha_B$  tandis que la troisième est contenue dans la partie amino-terminale de l'hélice  $\alpha_B$ . Ce sous-site du repliement de Rossmann caractérise le site de fixation du groupement pyrophosphate du  $\text{NAD(P)}^+$  (Carugo & Argos, 1997).



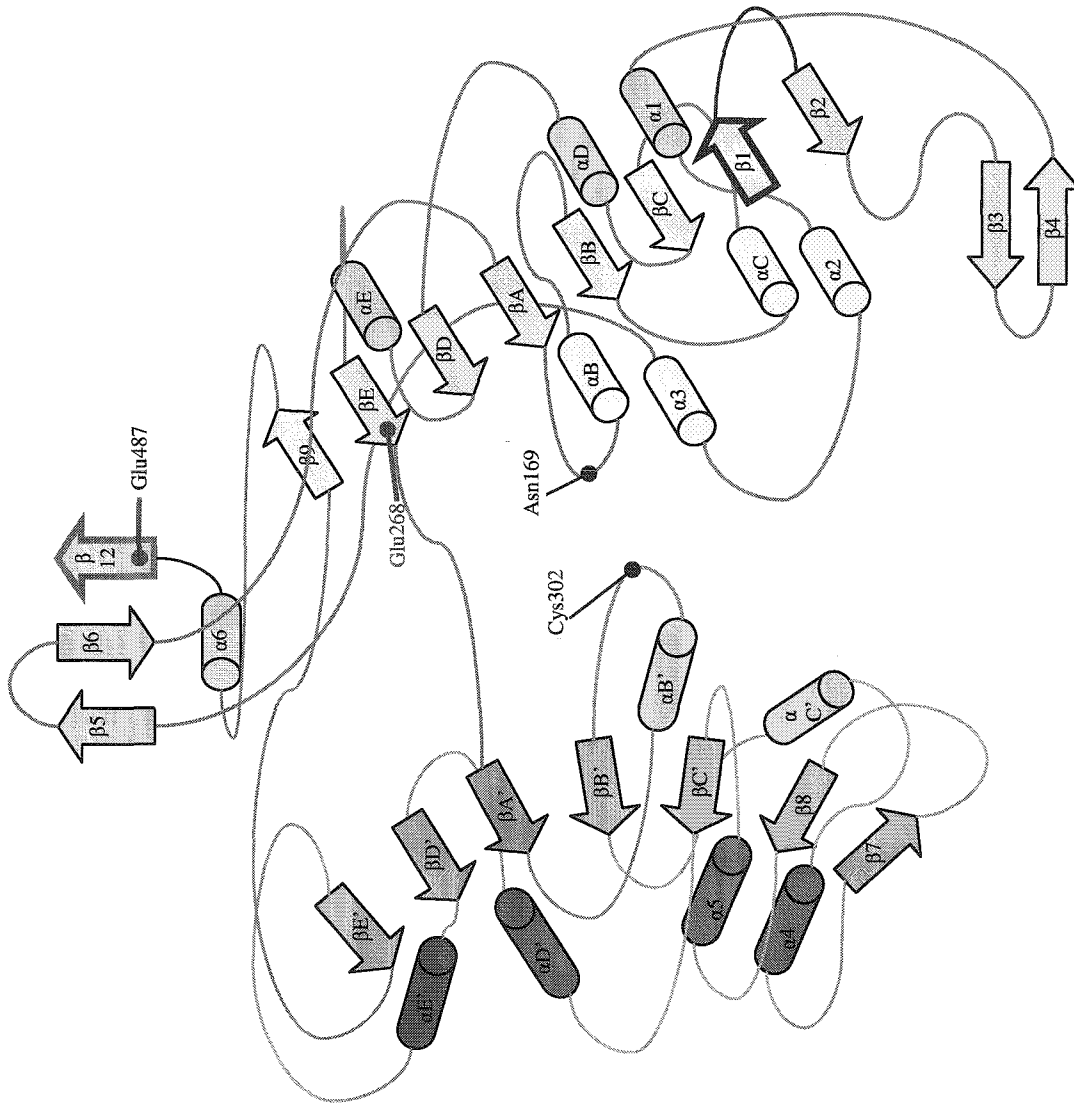
**Figure I.19 :** Topologie du Rossmann fold et localisation de la séquence signature GxGxxG du site de fixation du  $\text{NAD(P)}^+$ .

Steinmetz et ses collaborateurs (1997) ont déterminé deux structures de l'ALDH2 : 1) l'ALDH2 sous forme apo et 2) l'ALDH2 sous forme holo (complexe binaire avec le  $\text{NAD}^+$ ). Ces deux structures sont entièrement superposables ( $\text{C}\alpha$ ). Par conséquent, la fixation du cofacteur n'engendre pas de changement conformationnel drastique. Chez l'holoenzyme, les quatre sites sont occupés par une molécule de  $\text{NAD}^+$ , et ce, de façon équivalente (même taux d'occupation).

**Figure I.20 :** Topologie du monomère de l'ALDH2 (ci-dessous). Les brins sont représentés par des flèches et les hélices par des cylindres. Le sens de la flèche indique le sens de la structure primaire. Les contours de la structure secondaire de l'extrémité N-terminale sont surlignés en bleu et ceux de l'extrémité C-terminale en rouge.

\* La notation par des lettres majuscules des brins et des hélices est propre au repliement canonique de Rossmann tandis que la notation par des chiffres (employée ci-dessous) désigne les brins et les hélices qui n'appartiennent pas au repliement canonique de Rossmann. Pour le domaine catalytique, les brins et les hélices sont également désignés par des lettres et des chiffres qui sont agrémentés de « ' » pour les distinguer de ceux du domaine de fixation du cofacteur.

1. Les aldéhyde déshydrogénases (Figure I.20)



## 1.2.3.1.1. Structure du domaine de fixation du cofacteur

Présentation

Par analogie avec le repliement Rossmann canonique, le domaine de fixation se compose d'un feuillet  $\beta$  parallèle principal à cinq brins ( $\beta_A$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_C$ ,  $\beta_D$  et  $\beta_E$ ) qui est complété en amont par un feuillet  $\beta$  anti-parallèle à deux brins ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) et en aval par un brin ( $\beta_9$ ) positionné de façon antiparallèle. Les brins  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_9$  sont spécifiques aux domaines de fixation du cofacteur des ALDHs. Deux groupes d'hélices  $\alpha$  entourent ce feuillet central à huit brins. Le premier groupe est constitué par les hélices  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$  et  $\alpha_1$  tandis que les hélices  $\alpha_B$ ,  $\alpha_C$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  forment le second groupe. Le domaine présente une extension du côté amino-terminal par rapport au repliement de Rossmann : un feuillet  $\beta$  antiparallèle à deux brins ( $\beta_3$  et  $\beta_4$ ). Chez les ALDHs, le sous-site de fixation du motif pyrophosphate diffère de celui du repliement canonique de Rossmann. Premièrement, la séquence signature des ALDHs est du type GxxxxG où le troisième résidu aminoacyl est le plus souvent une thréonine, et non une glycine. Deuxièmement, cette séquence est délocalisée sur la boucle qui relie le brin  $\beta_D$  et l'hélice  $\alpha_E$ .

Description du mode de fixation du NAD<sup>+</sup> (Figure )

Le cycle adénine s'insère entre les hélices  $\alpha_D$  et  $\alpha_E$ . La position du cycle est stabilisée par des contacts de van der Waals établis avec des résidus aminoacyls de ces hélices (Gly225, Pro226, Val249 et Leu252).

Le ribose de l'adénosine est principalement stabilisé par des liaisons hydrogène formées par ses fonctions hydroxyles ( $-OH$ ) en positions 2' et 3'. La fonction amine de la chaîne latérale du résidu Lys192, incluse dans le brin  $\beta_B$ , établit une liaison hydrogène avec les deux fonctions hydroxyles. La fonction hydroxyle en position 2' établit une seconde liaison hydrogène avec la fonction carboxylique de la chaîne latérale du résidu Glu195 tandis que celle en position 3' forme une seconde liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle du résidu Ile166.

Un des atomes d'oxygène du groupement phosphate lié à l'adénosine établit deux liaisons hydrogène avec le résidu Ser246 ; une avec l'azote de la fonction amide de la chaîne principale et l'autre avec la fonction hydroxyle de la chaîne latérale.

Le groupement phosphate du côté du nicotinamide est stabilisé par la formation de deux liaisons hydrogène avec le résidu Trp168. La fonction amine du noyau indole de la chaîne latérale du résidu Trp168 forme une liaison hydrogène avec un des atomes d'oxygène du groupement phosphate et l'azote de la fonction amide de la chaîne principale établit une liaison hydrogène avec l'autre atome d'oxygène du groupement phosphate.

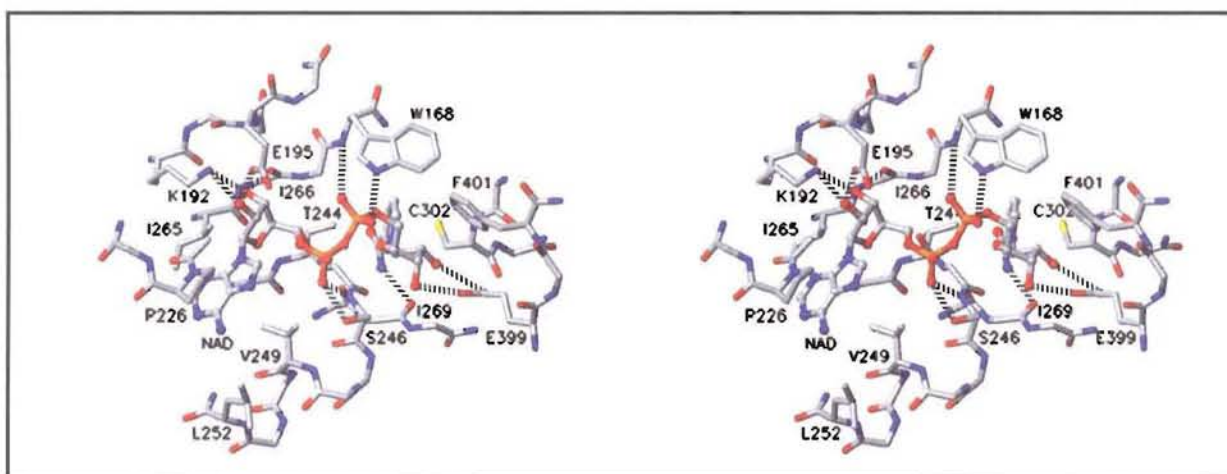
La position et l'orientation du ribose du nicotinamide sont stabilisées par des contacts de van der Waals effectués avec le cycle aromatique de la chaîne latérale du résidu Phe401. Les



fonctions hydroxyles en position 2' et 3' forment chacune une liaison hydrogène avec la fonction carboxylique de la chaîne latérale du résidu Glu399.

Les résidus aminoacyls de la poche de fixation du cycle nicotinamide contribuent à l'orientation de ce dernier. Le cycle nicotinamide établit des contacts de van der Waals avec les chaînes latérales des résidus Asn169, Thr244 et Cys302. L'azote de la fonction carboxamide positionnée sur le carbone 5 du cycle effectue une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle du résidu Ile269. Sur tous les résidus impliqués dans la fixation du NAD<sup>+</sup>, seuls les résidus Lys192 et Glu399 sont strictement conservés chez les ALDHs (Hempel *et al.*, 1993).

La structure de l'holoenzyme montre que la cystéine (Cys302) et le glutamate (Glu268) catalytiques sont situés de part et d'autre du nicotinamide. Cette structure a permis de révéler un nouvel résidu aminoacyl, l'Asn169 qui est positionné à proximité de la cystéine catalytique et qui s'avère être l'un des résidus aminoacyls strictement conservés chez les ALDHs (Hempel *et al.*, 1993). Ce résidu, à la fois proche du site de fixation du cofacteur et de la cystéine catalytique est impliqué dans le mécanisme enzymatique (voir paragraphe 1.2.4.1).



**Figure I.21 :** Vue stéréoscopique du site de fixation du NAD<sup>+</sup> de l'ALDH2 bovine.

Les traits en pointillés représentent les liaisons hydrogènes établis entre les NAD<sup>+</sup> et l'enzyme. Les atomes de carbone sont en gris, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu indigo, de soufre en jaune et de phosphore en orange.

### Description du site de fixation du cofacteur

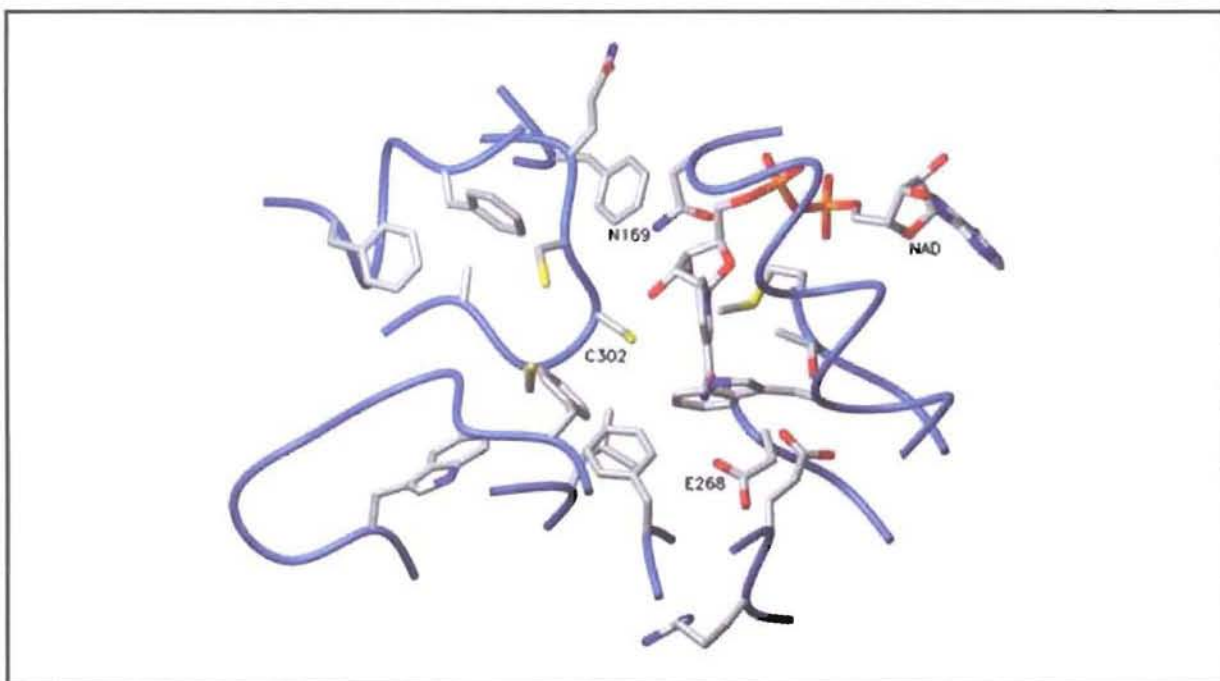
Par analogie avec le domaine de fixation du cofacteur, le domaine catalytique présente une topologie de type  $\alpha/\beta$  plane. Il se compose d'un feuillet  $\beta$  parallèle principal à cinq brins ( $\beta_A'$ ,  $\beta_B'$ ,  $\beta_C'$ ,  $\beta_D'$  et  $\beta_E'$ ) qui est complété par un feuillet  $\beta$  anti-parallèle à deux brins ( $\beta_7$  et  $\beta_8$ ). Au niveau de la structure primaire (la séquence), ces deux brins s'insèrent entre les brins  $\beta_B'$  et  $\beta_C'$ . Les brins  $\beta_A'$ ,  $\beta_B'$ ,  $\beta_C'$ ,  $\beta_D'$  et  $\beta_E'$  correspondent aux brins du repliement de Rossmann canonique\*. Deux groupes d'hélices  $\alpha$  entourent le feuillet central à sept brins. Le premier

\* L'annotation par un « ' » de la lettre en indice permet de distinguer les structures secondaires du domaine catalytique et du domaine de fixation du cofacteur qui correspondent à celle du repliement de Rossmann canonique.

groupe est constitué par les hélices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_{D'}$  et  $\alpha_{E'}$  tandis que les hélices  $\alpha_{B'}$  et  $\alpha_{C'}$  forment le second groupe. La cystéine catalytique, Cys302 appartient à la boucle qui joint l'hélice  $\alpha_{B'}$  au brin  $\beta_{B'}$ .

#### 1.2.3.1.2. Description du site actif (Figure I.22)

Un tunnel hydrophobe de 12 Å de longueur s'étend de la cystéine catalytique à la surface du tétramère. Ce tunnel correspond au site de fixation du substrat et est situé à l'opposé du site de fixation du cofacteur. Le cycle nicotinamide divise la base de ce tunnel en deux parties. La dénomination de ces deux parties est fondée sur la stéréospécificité de l'attaque nucléophile du carbone en position 4 du nicotinamide. Les parties A et B (également les faces A et B du nicotinamide) correspondent respectivement à une attaque de type pro-*R* ou de type pro-*S*. Le groupe de trois résidus aminoacyls cystéines, en position 301-303 (spécifique de l'ALDH2 humaine) est représentatif de la partie A, tandis que les chaînes latérales des aminoacyls Thr244, Glu268 et Glu476 constituent la partie B. Le tunnel du site actif est essentiellement composé de résidus aminoacyls hydrophobes. L'entrée du site actif est délimité par l'extrémité amino-terminale de l'hélice  $\alpha_3$ , par l'extrémité carboxy-terminale de l'hélice  $\alpha_{B'}$  et par la boucle qui relie  $\beta_{B'}$  et l'hélice  $\alpha_6$ .



**Figure I.22 :**

**Site actif de l'ALDH2 bovin.**

La chaîne principale est représentée sous forme de lacet bleu. Les chaînes latérales des résidus qui composent le site sont détaillées. Les atomes de carbone sont en gris, d'oxygène en rouge, d'azote en bleu indigo, de soufre en jaune et de phosphore en orange.

## 1.2.3.1.3. Oligomérisation de l'homotétramère

Les ALDHs tétramériques résultent de l'association de deux dimères ; d'où la qualification de dimère de dimères (Schéma ). Les quatre monomères sont désignés par les lettres A, B, C et D. Deux monomères s'associent en dimère par l'intermédiaire des brins  $\beta_E$ ,  $\beta_{10}$  et de l'hélice  $\alpha_E$ . Le brin  $\beta_{10}$  du domaine d'oligomérisation d'un monomère établit des contacts avec le brin  $\beta_E$  du domaine catalytique de l'autre monomère et inversement, tandis que les hélices  $\alpha_E$  du domaine de fixation du cofacteur interagissent entre elles. Cette dimérisation engendre la formation deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles à dix brins (( $\beta_7\beta_8\beta_C\beta_B\beta_A\beta_D\beta_E$ )( $\beta_{10}\beta_6\beta_5$ )) chacun (voir la Figure ). Les dimères forment un tétramère par contacts entre les brins  $\beta_5$  des domaines d'oligomérisation. Le tétramère est alors composé de deux feuillets  $\beta$  antiparallèle principaux à vingt brins chacun. Chacun de ces deux feuillets  $\beta$  réunis deux domaines catalytiques de dimères différents par l'intermédiaire de deux domaines d'oligomérisation appartenant aux deux autres monomères.

Contacts à l'origine de la dimérisation *	Contacts à l'origine de la tétramérisation
$\beta_{10}A$ avec $\beta_E B$ et $\beta_{10}B$ avec $\beta_E A$	$\beta_5 A$ avec $\beta_5 D$ et $\beta_5 B$ avec $\beta_5 C$
$\alpha_E A$ avec $\alpha_E B$	

**Schéma I.23 :** Structures secondaires en contact lors de l'association oligomérique chez l'ALDH2 humaine.  
Les lettres A, B, C et D désignent les monomères.  
\* : ces contacts sont transposables au dimère CD.

En remarque, le résidu Glu487 de l'ALDH2, résidu aminoacyl clé dans l'intolérance à l'alcool, est inclus dans le brin amino-terminal  $\beta_{10}$  du domaine d'oligomérisation.



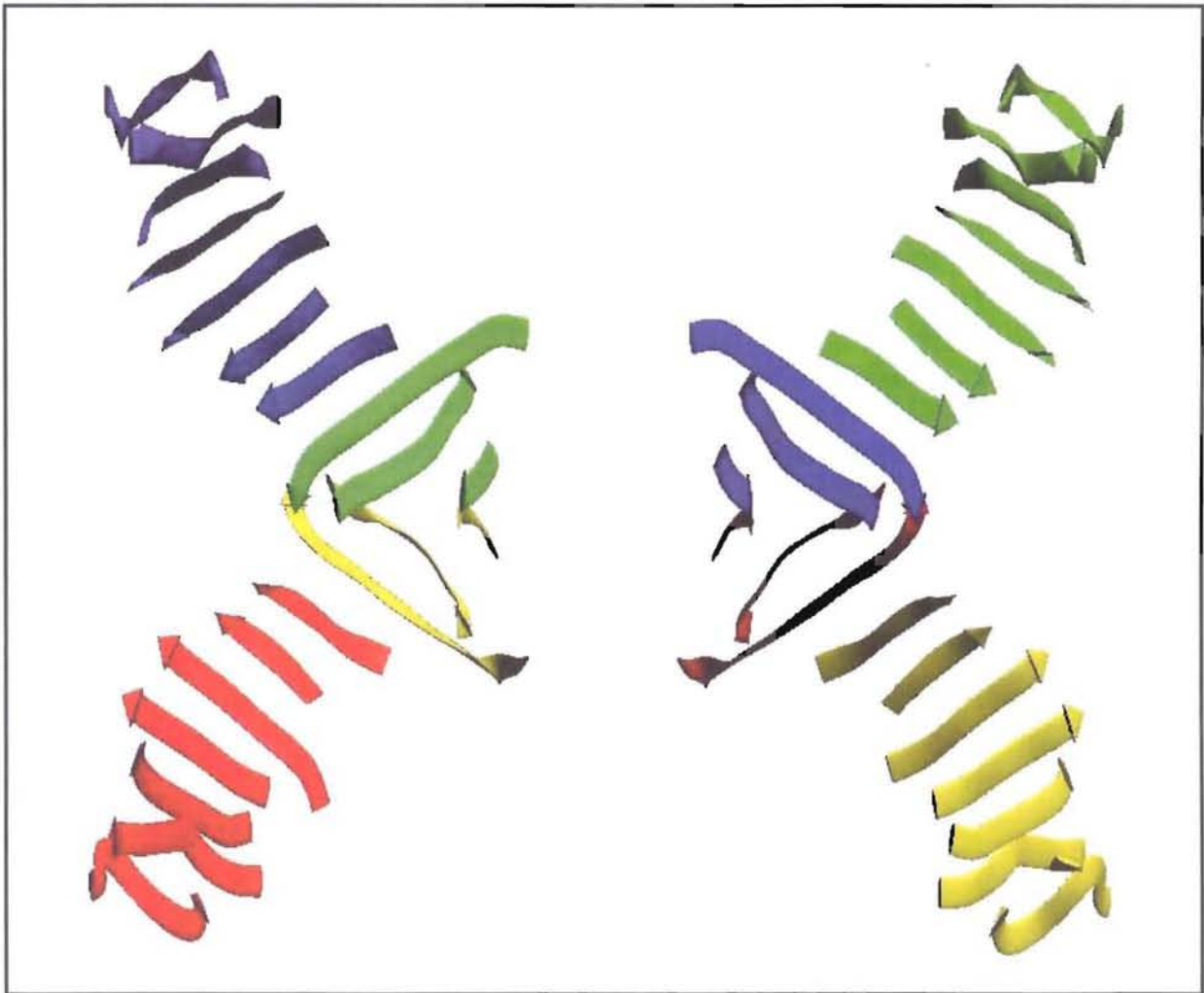


Figure I.24 :

**Les deux feuillets  $\beta$  antiparallèles à l'origine de la tétramérisation.**

Les brins du monomère A sont en bleus, ceux du monomère B sont en vert, ceux du monomère C sont en jaune et les brins du monomère D sont en rouge.

A gauche et du haut vers le bas de la figure, c'est-à-dire de A à B à C puis D, les brins sont les suivants :  $(\beta_7\beta_8\beta_C\beta_B\beta_A\beta_D\beta_E)_A$ ,  $(\beta_{10}\beta_6\beta_3)_B$ ,  $(\beta_5\beta_6\beta_{10})_C$  et  $(\beta_E\beta_D\beta_A\beta_B\beta_C\beta_8\beta_7)_D$ .

A droite et du haut vers le bas de la figure, c'est-à-dire de A à B à C puis D, les brins sont les suivants :  $(\beta_7\beta_8\beta_C\beta_B\beta_A\beta_D\beta_E)_B$ ,  $(\beta_{10}\beta_6\beta_3)_A$ ,  $(\beta_5\beta_6\beta_{10})_D$  et  $(\beta_E\beta_D\beta_A\beta_B\beta_C\beta_8\beta_7)_C$ .

### 1.2.3.2. Les structures connues d'ALDHs

Il est important de rappeler qu'un formalisme s'est instauré pour la dénomination des ALDHs de mammifères de telle sorte que les ALDHs du cytosol sont appelées ALDH1, que celles des mitochondries sont qualifiées d'ALDH2 et que le terme ALDH3 désigne les ALDHs dimériques associées aux cellules tumorales (Lindahl, 1992).

Les structures de douze ALDHs distinctes ont été déterminées et déposées dans la « Protein Data Bank (PDB) » depuis 1997 : l'ALDH3 de rat, l'ALDH2 de bovin, la rétinaldéhyde déshydrogénase de rat (RALDH), l'ALDH1 de mouton, l'ALDH2 humaine, la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) de morue, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante (GAPN) de *Streptococcus mutans*, la GAPN de *Vibrio harveyi*, l' $\eta$ -cristalline du rat à trompe, l'ALDH d'*Escherichia coli*, la GAPN de *Thermoproteus tenax* et la  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase (P5CDH) de *Thermus thermophilus*. Plusieurs structures ont parfois été déterminées pour une même ALDH. Dans ce cas, les structures correspondent à différents états (complexes, mutants, salinité, ...) de l'ALDH (Tableau ). Le constat est que toutes ces structures sont identiques et globalement superposables entre-elles.

Dans un premier temps, la détermination de ces structures a permis de discuter les résultats obtenus au préalable sur le fonctionnement des ALDHs. Dans un second temps, les structures ont mis à jour des facteurs moléculaires impliqués dans l'oligomérisation, le mécanisme catalytique et l'allostérie.

Toutes les structures d'holoenzyme (enzyme/NAD(P)<sup>+</sup>) présentent un point commun important pour la compréhension du mécanisme enzymatique des ALDHs. Le motif nicotinamide mononucléotide (nicotinamide + ribose + phosphate) n'a pu être modélisé avec exactitude par manque d'informations (peu de densité électronique). Ceci signifie que le motif nicotinamide mononucléotide effectue des interactions faibles avec le site de fixation du cofacteur, contrairement au motif adénosine mononucléotide (adénosine + phosphate). Seule la structure de l' $\eta$ -cristalline de rat à trompe présente un NAD<sup>+</sup> bien défini sur toute sa longueur (Bateman *et al.*, 2003). Cette exception s'explique par le rôle structural et non fonctionnel de cette ALDH dans le cristallin de l'œil. Les protéines solubles du cristallin (les cristallines) fixent des chromophores qui servent de filtre comme par exemple la vitamine A (Wistow et Kim, 1991). Dans le cas de l' $\eta$ -cristalline, naturellement complexée au cofacteur, la fixation de ce dernier (plutôt sous forme réduite) pourrait jouer le rôle de filtre contre les ultraviolets proches (Bateman *et al.*, 2003).

Enzymes	Organismes	Localisation cellulaire (organe)	Codes PDB	Dates*	Etat de l'enzyme	Etat oligomérique	Ligands	Expériences	Rés. (Å)	Références	
ALDH3	rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	cytoplasme (foie)	1ad3	1996	native	dimérique	NAD <sup>+</sup>	SIRAS	2,6	Liu <i>et al.</i> , 1997	
ALDH2	bovin ( <i>Bos taurus</i> )	mitochondries (foie)	1ag8	1997	native	tétramérique		MIR	2,65	Steinmetz <i>et al.</i> , 1997	
			1a4z	1998	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Sm <sup>3+</sup>		2,75		
RALDH	rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	cytoplasme (embryon)	1bi9	1998	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	MR	2,7	Lamb <i>et Newcomer</i> , 1999	
ALDH1	mouton ( <i>Ovis aries</i> )	cytoplasme (foie)	1bxs	1998	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup>	MR	2,35	Moore <i>et al.</i> , 1998	
ALDH2	humain ( <i>Homo sapiens</i> )	mitochondrie (foie)	1cw3	1999	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	MR	2,58	Ni <i>et al.</i> , 1999	
			1o00	2003	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>		2,6	Perez-Miller <i>et Hurley</i> , 2003	
			1o01	2003	native	tétramérique	NADH Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> guanidine 1,2-éthanediol crotonaldehyde		2,15		
			1o02	2003	native	tétramérique	NADH Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> guanidine 1,2-éthanediol		1,9		
			1o04	2003	C302S	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> guanidine 1,2-éthanediol		1,42		
			1nzw	2003	C302S	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>		2,65		
			1nzx	2003	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>		2,45		
			1nzz	2003	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> Mg <sup>2+</sup> (faible concentration)		2,45		
			1o05	2003	native	tétramérique	Na <sup>+</sup>		2,25		Hurley <i>et al.</i> , 2001
			1of7	2003	native	tétramérique	daidzin		2,4		Lowe <i>et al.</i> , NP
			1zum	2005	E487K	tétramérique	Na <sup>+</sup> guanidine 1,2 éthanediol		2,1		Larson <i>et al.</i> , 2005
			BADH (bétaine)	morue ( <i>Gadus Calliaras</i> )	cytoplasme (foie)	1a4s	1998	native	tétramérique		MR
1bpw	1998	native				tétramérique	NAD <sup>+</sup>		2,8		
GAPN	<i>Streptococcus mutans</i>	cytoplasme	1euh	1998	native	tétramérique	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	MR	1,82	Cobessi <i>et al.</i> , 1999	
			2euh	1998	native	tétramérique	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> NADP <sup>+</sup>		2,6		
			1qi1	1999	C284S	tétramérique	NADP <sup>+</sup> G3P		3,0	Cobessi <i>et al.</i> , 2000	
			1qi6	1999	native	tétramérique	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		2,5		
			2esd	2005	E250A	tétramérique	NADP <sup>+</sup> G3P		2,55	D'Ambrosio <i>et al.</i> , 2006	
ALDH	<i>Vibrio harveyi</i>	cytoplasme	1eyy	2000	native	dimérique	NADP ½	MIR et MAD	2,5	Ahvazi <i>et al.</i> , 2000	
			1ez0	2000	native	dimérique	NADP <sup>+</sup>		2,1		
η-cristalline	Rat à trompe ( <i>Elephantulus edwardii</i> )	cytoplasme (cristallin)	1o9j	2002	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> DTT	MR	2,4	Bateman <i>et al.</i> , 2003	
ALDH	<i>Escherichia coli</i>	cytoplasme	1wnb	2004	native	tétramérique	NAD <sup>+</sup> bétaine aldéhyde	MR	2,2	Gruez <i>et al.</i> , 2004	
			1wnd	2004	native	tétramérique	Ca <sup>2+</sup>		2,1		

Enzymes	Organismes	Localisation cellulaire (organe)	Codes PDB	Dates*	Etat de l'enzyme	Etat oligomérique	Ligands	Expériences	Rés. (Å)	Références
GAPN	<i>Thermoproteus tenax</i>	cytoplasme	1ky8	2002	native	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	MAD	2,4	Pohl <i>et al.</i> , 2002
			1uxn	2004	L378F	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> AMP		2,3	Lorentzen <i>et al.</i> , 2004
			1uxp	2004	L378F	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> ADP		2,55	
			1uxq	2004	L378F	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> α-D-Glucose-1-phosphate		2,4	Lorentzen <i>et al.</i> , 2004
			1uxr	2004	L378F	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> Fructose-6-phosphate		2,3	
			1uxt	2004	L378F	tétramérique	NAD <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> α-D-Glucose-1-phosphate		2,2	
			1uxu	2004	L378F	tétramérique	NADP <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> Glycéraldéhyde-3-phosphate AMP		2,25	
			1uxv	2004	native	tétramérique	NADPH Na <sup>+</sup> AMP		2,35	
Δ <sup>1</sup> -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase	<i>Thermus thermophilus</i>	cytoplasme	1uzb	2004	native	dodécamérique	MRD	MR	1,4	Inagaki <i>et Tahirov</i> , NP
			2bhp	2005	native	dodécamérique	NAD <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> MRD, MPD ion acétate		1,8	
			2bhq	2005	native	dodécamérique	MRD, MPD ion acetate		1,4	
			2bja	2005	native	dodécamérique	NADH, Cl <sup>-</sup> MRD, MPD, S-Hydrocystéine**		1,9	
			2bjk	2005	native	dodécamérique	NAD <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> MRD, MPD anion citrate		1,4	

**Tableau I.25 :** Description des structures d'ALDH déposées dans la PDB.

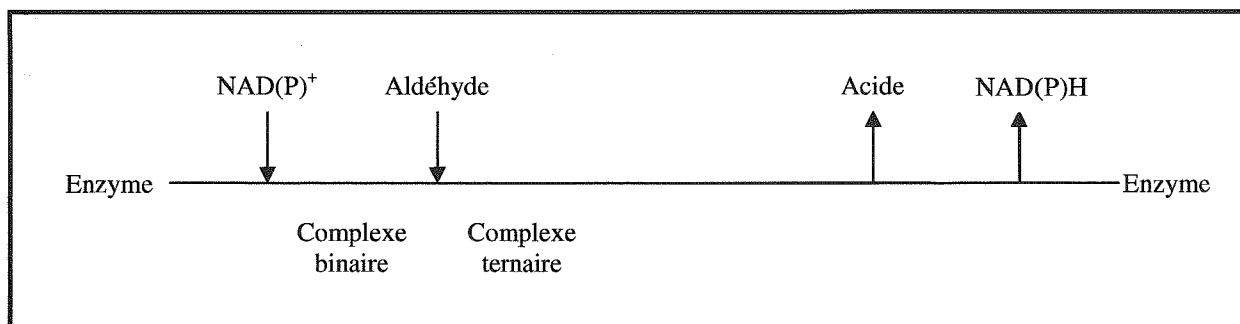
« NP » : non publié ; « Rés. » : résolution ; « PDB » : « Protein Data Bank » ; MRD : ((4R)-2-Méthylpentane-2,4-diol) ; \* : date de dépôt de la structure dans la PDB ; \*\* : pour oxyder la Cys322

## 1.2.4. Retour sur le mécanisme enzymatique des ALDHs

Toutes les ALDHs, à l'exception de celles de levure, semblent présenter un mécanisme enzymatique commun (Marchal *et al.*, 2001). En 1993, l'étude des séquences primaires de seize ALDHs a révélé vingt-trois résidus aminoacyls invariants (Hempel *et al.*, 1993). Onze de ces résidus correspondent à des résidus aminoacyls glycine et trois à des prolines qui doivent être des résidus aminoacyls clés dans la conservation de l'intégrité des structures secondaires au cours de l'évolution (Hempel *et al.*, 1993). Les neuf autres correspondent aux résidus aminoacyls suivants : Cys, Lys, Arg, Glu, Thr, Ser, Phe et deux Asn. La détermination des structures d'ALDHs ainsi que des études enzymatiques ont été employées pour établir le rôle de tous ces résidus invariants.

### 1.2.4.1. Description du mécanisme enzymatique des ALDHs

Les ALDHs appartiennent à la classe des oxydoréductases (EC 1) qui convertissent de façon irréversible un aldéhyde en un acide carboxylique (EC 1.2) au cours d'une réaction à deux étapes. Elles utilisent un cofacteur dinucléotidique de type  $\text{NAD(P)}^+$  ; les ALDHs sont dites  $\text{NAD(P)}^+$ -dépendantes (EC 1.2.1). Le mécanisme catalysé par ces enzymes est de type Bi Bi séquentiel ordonné (Schéma ).



**Schéma I.26 : Mécanisme Bi Bi séquentiel ordonné des ALDHs**

Généralement, l'étape de désacylation représente l'étape limitante de la réaction (MacGibbon *et al.*, 1977b ; Weiner *et al.*, 1976 ; Marchal *et al.*, 2000), à l'exception de l'ALDH3 dimérique de rat où le transfert d'hydrure lors de l'étape d'acylation limite la réaction (Mann et Weiner, 1999).



## 1.2.4.1.1. La première étape : l'acylation

L'étape d'acylation correspond à l'attaque nucléophile de la cystéine catalytique sur le carbone électrophile de la fonction aldéhydique et au transfert d'hydrure ( $H^-$ ) de cette même fonction sur le quatrième carbone NC4 du nicotinamide. L'acylenzyme et le cofacteur réduit sont formés au terme de cette étape.

L'attaque nucléophile par la cystéine n'est possible qu'avec une fonction thiol ( $-SH$ ) activée en thiolate ( $-S^-$ ). Les dernières avancées concernant cette activation ont été réalisées par Branlant et collaborateurs en 2001. L'activation de la cystéine catalytique (Cys302) est multiparamétrique. La fixation du cofacteur  $NAD(P)^+$  puis du substrat sur l'enzyme sont à l'origine d'un réarrangement local qui implique uniquement des chaînes latérales environnantes, le cofacteur et le substrat. A la suite de ce réarrangement, la charge positive du nicotinamide du cofacteur se situe à proximité de la chaîne latérale de la cystéine catalytique qui change également d'orientation. La cystéine est alors dans un environnement qui favorise son activation. L'activation de la cystéine catalytique serait différente pour l'ALDH de *Vibrio harveyi* (Ahvazi *et al.*, 2000) et la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) de *Pseudomonas aeruginosa* (González-Segura *et al.*, 2002). La cystéine de l'ALDH de *V. harveyi* serait activée par un résidu histidyl du site actif qui lui est propre (Histidine en position 450 dans cette structure). Ce résidu histidyl jouerait le rôle de base comme chez la GAPDH (Soukri *et al.*, 1989). Chez la BADH de *P. aeruginosa* sous forme apo, la cystéine catalytique existerait déjà sous forme activée et établirait une liaison électrostatique avec une chaîne latérale chargée positivement. Dans ce cas, la fixation du cofacteur et du substrat induirait des réarrangements locaux qui libèrerait la cystéine pour la rendre plus réactive vis-à-vis du substrat.

La formation de l'acylenzyme est précédée par la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal (Feldman *et Weiner*, 1972). Contrairement au mécanisme de la GAPDH, l'hydroxylate de cet intermédiaire réactionnel n'est pas protoné par une base. La charge négative est stabilisée par un environnement particulier appelé site de reconnaissance oxyanion. Ce site a été révélé par les structures de l'ALDH2 de bovin (Steinmetz *et al.*, 1997) ainsi que par les structures de GAPN de *S. mutans* (Cobessi *et al.*, 1999). La chaîne latérale du résidu Asn169 est le résidu aminoacyl représentatif de ce site. L'azote de la chaîne principale de la cystéine catalytique intervient dans une moindre mesure dans la stabilisation de l'intermédiaire thiohémiacétal (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1998 ; Cobessi *et al.*, 2000).

Le transfert d'hydrure sur le carbone NC4 du nicotinamide s'effectue de façon stéréospécifique, il est de type pro-*R* (face A) (Jones *et al.*, 1987 ; Hammen *et al.*, 2002). Ce transfert est uniquement possible si le carbone NC4 du nicotinamide est à une distance, de la cystéine catalytique, compatible avec le transfert d'hydrure. Lorsque le nicotinamide du cofacteur est bien orienté et bien positionné, il est dit en position de « transfert d'hydrure » (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Moore *et al.*, 1998). Dans les structures d'holoenzymes où le cofacteur est modélisé en position de transfert d'hydrure, le carbone NC4 du nicotinamide et l'atome de soufre de la chaîne latérale de la cystéine catalytique sont alors distants d'environ 3,5 Å (Hammen *et al.*, 2002 ; Perez-Miller *et Hurlley*, 2003 ; Bateman *et al.*, 2003).

## 1.2.4.1.2. La seconde étape : la désacylation

L'acide puis le cofacteur réduit sont libérés au cours de l'étape de désacylation. L'acide est formé par attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la fonction carbonyle de l'acylenzyme. La molécule d'eau doit être activée en hydroxylate ( $\text{HO}^-$ ) et orientée pour être un bon nucléophile. Le rôle de base activatrice primordial pour la réaction enzymatique, a été attribué au résidu glutamyl 268 qui est conservé (Marchal *et al.*, 2000). Les structures des complexes binaires, avec le nicotinamide en position de transfert d'hydrure révèlent que le nicotinamide du  $\text{NAD(P)}^+$  est interposé entre les chaînes latérales des résidus Cys302 et Glu268 (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1998 ; Cobessi *et al.* ; 1999 ; Ahvazi, 2000 ; Pohl *et al.*, 2002 ; Bateman *et al.*, 2003). Dans cette condition, le résidu Glu268 ne peut jouer son rôle de base. Les structures ont également révélé une certaine flexibilité de la conformation du cofacteur oxydé ( $\text{NAD(P)}^+$ ) où seul le motif nicotinamide du cofacteur adopte plusieurs conformations et où le pyrophosphate joue le rôle de charnière (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Moore *et al.*, 1998 ; Johansson *et al.*, 1998 ; Lamb *et al.* Newcomer, 1999 ; Hurley *et al.*, 2001). Le complexe ALDH2 humaine / NADH montre que sous forme réduite, le nicotinamide libère l'espace entre les résidus Cys302 et Glu268 par une simple rotation de la liaison phosphodiester (Moore *et al.*, 1998). Dans ce cas, le cofacteur adopte une conformation étendue (13,3 Å entre le centre des cycles de l'adénine et du nicotinamide contre 11,2 Å lors du transfert d'hydrure ; Hammen *et al.*, 2002) et le nicotinamide est dit en position « d'hydrolyse » (Moore *et al.*, 1998). La structure récente du complexe ternaire de la GAPN de *S. mutans* (D'Ambrosio *et al.*, 2006), seule structure d'acylenzyme d'ALDH, confirme que le nicotinamide réduit n'est plus dans sa position initiale après formation de l'acylenzyme. Dans ce cas, le NADPH est soit dans son site de fixation avec la conformation permettant la désacylation ou soit dans un autre site non loin du site actif. Dans cette structure, l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle établit des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Asn169 et l'atome d'azote de la chaîne principale de la cystéine catalytique. La structure de l'acylenzyme de GAPN de *S. mutans* révèle que le site oxyanion, formé par ces deux résidus aminoacyls, est également impliqué dans la stabilisation de l'acylenzyme et dans le processus de désacylation.

## 1.2.4.1.3. La spécificité de substrat

La comparaison des ALDH1 à rétinaldéhyde et des ALDH2 à acétaldéhyde montre que l'entrée du site actif de ces ALDHs leur est propre. L'entrée du site actif des ALDH1 est plus large que celle des ALDH2. A la suite de cette comparaison, la boucle de l'entrée du site actif, qui connecte le brin  $\beta_9$  à l'hélice  $\alpha_6$ , est proposée pour être le facteur structural à l'origine de la spécificité de substrat. Les structures du complexe ternaire et de l'acylenzyme de la GAPN de *S. mutans* montrent que l'un des résidus aminoacyls qui participent à la stabilisation du substrat, une arginine, appartient à la boucle de spécificité de substrat (Cobessi *et al.*, 2000 ; D'Ambrosio *et al.*, 2006).

## 2. Les aldéhyde déshydrogénases CoA-dépendantes (CoA-ALDH)

### 2.1. Préambule

Le NC-IUBMB\* mentionne plusieurs enzymes qui sont cofacteur dinucléotidique dépendantes et qui oxydent une fonction aldéhydique en acyl-CoA par transthioestérification du coenzymeA (Tableau ). Seule la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase est classée dans la famille des aldéhyde déshydrogénases (Kedishvili *et al.*, 1992 ; Vasiliou *et al.*, <http://www.aldh.org/>, 2005). Cette enzyme se distingue doublement des ALDHs par l'utilisation du CoA et par la décarboxylation enzymatique de substrat. Bien que l'acétaldéhyde déshydrogénase, la butyraldéhyde déshydrogénase et la glyoxalate déshydrogénase n'appartiennent pas à la super-famille des aldéhyde déshydrogénases, leur mécanisme enzymatique est présenté dans ce chapitre, car il a servi de base pour l'étude de celui des malonate semialdéhyde et méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénases. D'après la littérature, les autres enzymes du Tableau n'ont pas un mécanisme enzymatique comparable à celui des aldéhyde déshydrogénases et c'est pourquoi elles ne sont pas présentées dans ce second chapitre. Pour plus de clarté, les méthylmalonate semialdéhyde et malonate semialdéhyde déshydrogénases sont regroupées sous le terme CoA-ALDHs tandis que l'acétaldéhyde, la butyraldéhyde et la glyoxalate déshydrogénases sont rassemblées sous la dénomination CoA-ALDHs non décarboxylante.

---

\* NC-IUBMB : " Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology ".

Numéro EC	Dénomination des enzymes	Organismes	Références
EC 1.2.1.10	Acétaldéhyde déshydrogénase	<i>Clostridium kluyveri</i>	Burton <i>et</i> Stadtman, 1953 Smith <i>et</i> Kaplan, 1980
		<i>Escherichia. coli</i>	Shone <i>et</i> Fromm, 1981
		<i>Clostridium beijerinckii</i>	Yan <i>et</i> Chen, 1990
EC 1.2.1.17	Glyoxalate déshydrogénase	<i>Pseudomonas oxalaticus</i>	Quayle <i>et</i> Taylor, 1961
EC 1.2.1.18	Malonate-semialdéhyde déshydrogénase	<i>Rattus norvegicus</i>	Goodwin <i>et al.</i> , 1989
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Waters <i>et</i> Venables, 1986
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Yamada <i>et</i> Jakoby, 1960 Hayaishi <i>et al.</i> , 1961
		<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Strauss <i>et</i> Fuchs, 1993
EC 1.2.1.27	Méthylmalonate-semialdéhyde déshydrogénase	<i>Oryza sativa</i>	Oguchi <i>et al.</i> , 2004
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sokatch <i>et al.</i> , 1968 Bannerjee <i>et al.</i> , 1970 Hatter <i>et</i> Sokatch, 1988
		<i>Rattus norvegicus</i>	Goodwin <i>et al.</i> , 1989 Kedishvili <i>et al.</i> , 2000
EC 1.2.1.42	Héxadécanal déshydrogénase	<i>Bos taurus</i>	Johnson <i>et</i> Gilbertson, 1972
		Canard	Wang <i>et</i> Kolattukudy, 1995
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	Lee <i>et</i> Meighen, 1997
		<i>Pinus sativum</i>	Vioque <i>et</i> Kolattukudy, 1997
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Reiser <i>et</i> Somerville, 1997
		<i>Acinetobacter</i>	Ishige <i>et al.</i> , 2002
EC 1.2.1.44	Cinnamoyl-CoA réductase	<i>Populus euramericana</i>	Sarni <i>et al.</i> , 1984
		<i>Zea mays</i>	Pichon <i>et al.</i> , 1998
		<i>Picea abies</i>	Luderitz <i>et</i> Grisebach, 1981
		<i>Glycine max L.</i>	Wengenmayer <i>et al.</i> , 1976 Luderitz <i>et</i> Grisebach, 1981
		<i>Forsythia suspensa</i>	Gross <i>et</i> Kreiten, 1975
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lauvergeat <i>et al.</i> , 2001
		<i>Phaseolus mungo</i>	Grima-Pettanati <i>et al.</i> , 1989
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Ralph <i>et al.</i> , 1998
		<i>Brassica napobrassica</i>	Rhodes <i>et</i> Wooltorton, 1975
EC 1.2.1.50	Acyls gras à longues chaînes CoA réductase	<i>Pisum sativum</i>	Vioque <i>et</i> Kolattukudy, 1997
		<i>Acinetobacter</i> sp.	Ishige <i>et al.</i> , 2002
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	Lee <i>et</i> Meighen, 1997
		<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Riendeau <i>et al.</i> , 1982 Rodriguez <i>et al.</i> , 1983 Wall <i>et</i> Meighen, 1986 Wall <i>et al.</i> , 1986 Rodriguez <i>et al.</i> , 1986 Wall <i>et</i> Meighen, 1989
		<i>Simmondsia chinensis</i>	Metz <i>et al.</i> , 2000
		<i>Mus musculus</i>	Cheng <i>et</i> Russell, 2004
EC 1.2.1.51	Pyruvate déshydrogénase	<i>Euglena gracilis</i>	Inui <i>et al.</i> , 1984, 1985, 1987, 1989, 1990 <i>et</i> 1991 Nakazawa <i>et al.</i> , 2000 <i>et</i> 2003
EC 1.2.1.57	Butyraldéhyde déshydrogénase	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Palosaari <i>et</i> Rogers, 1988

**Tableau I.27 :** Enzymes à NAD(P)<sup>+</sup> qui oxydent une fonction aldéhydique en présence de CoA.

## 2.2. Mécanisme enzymatique des CoA-ALDHs non décarboxylantes

### 2.2.1. Présentation des CoA-ALDHs non décarboxylantes

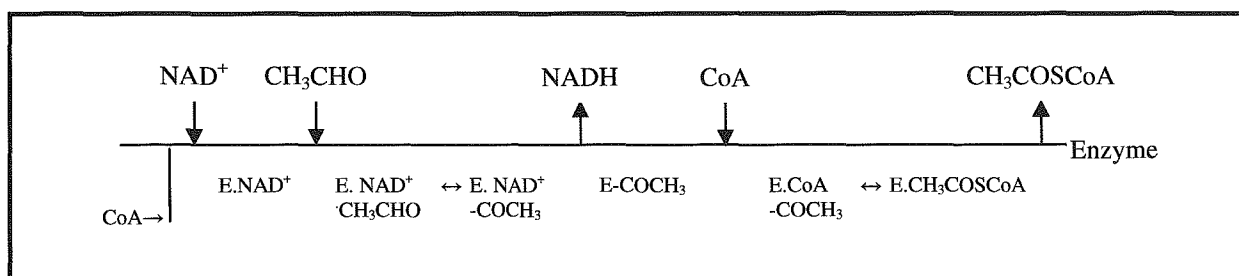
Les CoA-ALDHs non décarboxylantes interviennent principalement dans les voies d'incorporation de molécules qui sont sources de carbone et d'énergie. A titre d'exemple, lors de la fermentation, la butyraldéhyde déshydrogénase est impliquée dans les voies de transformation des sucres du sol en butanol chez *Clostridium acetobutylicum* (Palosaari et Rogers, 1988).

Les dénominations d'acétaldéhyde déshydrogénase et de butyraldéhyde déshydrogénase sont quelque peu restrictifs. En effet, ces deux enzymes sont capables d'oxyder, en présence de NAD<sup>+</sup> et de CoA, plusieurs substrats aldéhydiques en acyl-CoA comme l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde et le butyraldéhyde (Polisaari et Rogers, 1988 ; Yan et Chen, 1990). La glyoxalate déshydrogénase de *Pseudomonas oxalaticus* se distingue des deux enzymes précédentes du fait de sa spécificité de substrat et de cofacteur, à savoir uniquement le glyoxalate et NADP<sup>+</sup> (Quayle et Taylor, 1961 ; Quayle, 1966).

### 2.2.2. Mécanisme enzymatique des CoA-ALDHs non décarboxylantes

Le mécanisme enzymatique a été étudié chez les CoA-ALDHs non décarboxylantes des organismes suivants : *Clostridium kluyveri* (Burton et Stadtman, 1953 ; Smith et Kaplan, 1980), *Escherichia coli* (Rudolph et al., 1968 ; Clark et Cronan, 1980 ; Shone et Fromm, 1981) et *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 (Yan et Chen, 1990).

La CoA-ALDH non décarboxylante catalyse l'oxydation d'un aldéhyde en acyl-CoA en présence de NAD<sup>+</sup> (Burton et Stadtman, 1953 ; Smith et Kaplan, 1980). D'après les études de Clark et Cronan (1980) chez *E. coli*, la réaction catalysée est réversible. Tout comme les ALDHs, cette CoA-ALDH non décarboxylante catalyse une réaction à deux étapes, l'acylation et la désacylation, et procède via le groupement thiol d'une cystéine (Rudolph et al., 1968). L'étape d'acylation aboutit à la formation de l'acylenzyme et du cofacteur réduit. Le produit transthioestérifié par le CoA est formé puis libéré au cours de l'étape de désacylation (Rudolph et al., 1968). La cinétique enzymatique de type ping-pong proposée en 1968 par Rudolph et ses collaborateurs, a été validée par les travaux de Smith et Kaplan en 1980 (Schéma).



**Schéma I.28 :** Mécanisme enzymatique de cinétique ping-pong de la CoA-ALDH non décarboxylante de *Clostridium kluveri* (Smith et Kaplan, 1980).  
Le mécanisme appliqué à l'acétaldéhyde (CH<sub>3</sub>CHO) est tout à fait transposable au propionaldéhyde et au butyraldéhyde.

En 1981, l'étude de la CoA-ALDH non décarboxylante de *E. coli* (Shone et Fromm, 1981), apporte des précisions sur le type de mécanisme : bi uni uni uni ping-pong. Le cofacteur se fixe en premier sur l'enzyme libre, puis le substrat se lie en second. L'acylenzyme et le NADH sont ensuite formés et le cofacteur est libéré par l'enzyme avant que le CoA ne s'y fixe. L'arrivée du CoA déclenche l'étape de désacylation qui aboutit au produit final, un acyl-CoA.

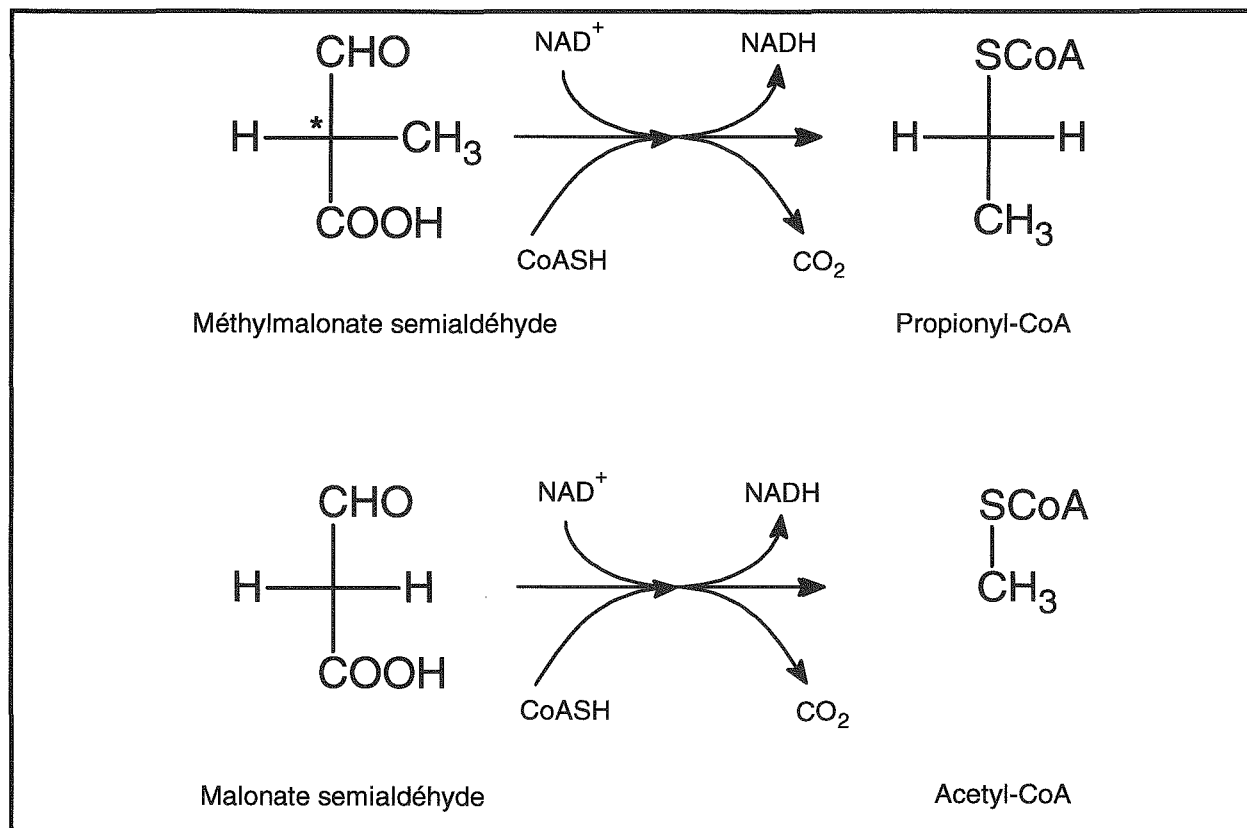
L'étude du mécanisme enzymatique de la CoA-ALDH non décarboxylante de *E. coli* a apporté des précisions sur le fonctionnement de l'enzyme (Rudolph *et al.*, 1968 ; Shone et Fromm, 1981). Cette CoA-ALDH non décarboxylante présente un temps de latence qui est levé par incubation de l'enzyme dans un milieu réducteur (dithiothréitol (DTT), β-mercaptoéthanol) enrichi en cofacteur. L'incubation en présence de NAD<sup>+</sup> aurait pour effet de faire passer l'enzyme d'un état inactif à un état actif par un possible changement de conformation. La fixation du cofacteur et du substrat contribue à augmenter la réactivité de la fonction thiol de la cystéine catalytique. La présence de molécules réductrices telles que le DTT permettrait d'activer le CoA lors de l'étape de désacylation.

Toutes les études portant sur les CoA-ALDH non décarboxylantes de *E. coli* et *C. kluveri*, révèlent, en plus d'une activité aldéhyde déshydrogénase, une activité alcool déshydrogénase qui tend à montrer que les deux activités sont réunies en un complexe multienzymatique. La CoA-ALDH non décarboxylante de *Clostridium acetobutylicum* est capable d'oxyder, de façon réversible, l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde et le butyraldéhyde avec une meilleure affinité pour ce dernier (Polisaari et Rogers, 1988). Chez ce microorganisme ainsi que chez *Clostridium beijerinckii* NRRL B592, l'activité aldéhyde déshydrogénase est indépendante de l'activité alcool déshydrogénase (Polisaari et Rogers, 1988 ; Yan et Chen, 1990).

## 2.3. Les CoA-ALDHs

### 2.3.1. Présentation

Les méthylmalonate semialdéhyde (Yamada *et al.*, 1960) et malonate semialdéhyde (Sokatch *et al.*, 1968) déshydrogénases catalysent respectivement l'oxydation du méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et du malonate semialdéhyde (MSA) en propionyl-CoA (PPCoA) et acétyl-CoA (AcCoA) (Figure ).



**Figure I.29 :** Réactions catalysées par la méthylmalonate semialdéhyde et la malonate semialdéhyde déshydrogénases.

«\* » signifie que le carbone est asymétrique : *R*-méthylmalonate semialdéhyde et *S*-méthylmalonate semialdéhyde.

En 1993, Hempel et ses collaborateurs distinguent la MSDH de foie de rat des autres ALDHs. Elle est l'unique aldéhyde déshydrogénase non-phosphorylante qui ne présente pas de glutamate catalytique (Glu268). Diverses études sur le mécanisme enzymatique des ALDHs montre que ce résidu a un rôle majeur dans la seconde étape du mécanisme, l'étape de désacylation. En effet, le Glu268 active, positionne et oriente la molécule d'eau qui attaque le carbone électrophile de l'intermédiaire réactionnel acylenzyme (se référer au paragraphe 1.2.4.1.2). L'absence de ce résidu chez la MSDH serait en accord avec son mécanisme enzymatique particulier qui nécessite une molécule de coenzymeA (Hempel *et al.*, 1993). Dans ce cas, le CoA joue le rôle de nucléophile lors de cette seconde étape et transthioestérifie l'acylenzyme.

De plus, ces deux enzymes (EC 1.2.1.27 et EC 1.2.1.18) catalysent la  $\beta$ -décarboxylation de leurs substrats (Figure ). A ce jour, elles sont les seules CoA-ALDHs à posséder cette propriété.

## 2.3.2. Implications des CoA-ALDHs

### 2.3.2.1. Les CoA-ALDHs et le métabolisme des acides aminés

#### 2.3.2.1.1. Métabolisme de la $\beta$ -alanine

La  $\beta$ -alanine est le seul acide aminé  $\beta$  naturel, mais elle ne participe pas à l'élaboration des protéines (Weil, 2005). Chez *Pseudomonas fluorescens* (Hayaishi *et al.*, 1961) et *P. aeruginosa* (Waters et Venables, 1986), la  $\beta$ -alanine et le pyruvate sont métabolisés sous l'action d'une transaminase en L- $\alpha$ -alanine et en malonate semialdéhyde. Ce dernier composé est ensuite oxydé en acétyl-CoA et CO<sub>2</sub> par une enzyme qui s'est révélée être la malonate semialdéhyde déshydrogénase (Hayaishi *et al.*, 1961). Cette enzyme est également un intermédiaire du catabolisme de la  $\beta$ -alanine chez les mammifères (Politt *et al.*, 1985). En 1987, Gray et ses collaborateurs montrent qu'une déficience de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase est à l'origine de l'accumulation de  $\beta$ -alanine dans des fibroblastes d'enfants. De ce fait, la malonate semialdéhyde déshydrogénase intervient dans tous les métabolismes qui s'effectuent *via* la  $\beta$ -alanine telle que la voie de dégradation des bases pyrimidiques cytosine et uracile chez les mammifères (Fink *et al.*, 1953), les plantes (Walsh *et al.*, 2001), les levures (Gojković *et al.*, 2001) et les bactéries (Vogels *et van der Drift*, 1976).

#### 2.3.2.1.2. Métabolisme de la valine

Chez les bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Sokatch *et al.*, 1968), *Pseudomonas putida* (Marshall et Sokatch, 1972) et *Streptomyces coelicolor* (Zhang *et al.*, 1996), la méthylmalonate semialdéhyde dehydrogenase est impliquée dans le catabolisme de la valine (Massey *et al.*, 1976). Dans ce cas, elle catalyse la conversion du méthylmalonate semialdéhyde en propionyl-CoA et CO<sub>2</sub> (Bannerjee *et al.*, 1970). Une déficience de cette enzyme empêche *P. aeruginosa* de croître dans un milieu qui contient uniquement de la valine comme source de carbone (Steele *et al.*, 1992).

Chez les mammifères, les trois acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine) sont trois des neuf acides aminés essentiels (Weil, 2005). Divers travaux montrent qu'à l'instar des bactéries la méthylmalonate semialdéhyde est l'un des intermédiaire du catabolisme de la valine chez les mammifères (Tanaka *et al.*, 1975 ; Manning et Pollitt, 1985). En 1989 et en 1992, la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase a été respectivement caractérisée chez le rat et l'homme (Goodwin *et al.*, 1989 ; Kedishvili *et al.*, 1992). Une déficience de cette enzyme s'accompagne d'une accumulation de 3-hydroxybutyrate dans les urines et n'a aucune incidence sur le phénotype (Chambliss *et al.*, 2000).



### 2.3.2.2. Les CoA-ALDHs et le métabolisme de la thymine

L'uracile, la cytosine et la thymine constituent les bases pyrimidiques ubiquitaires qui composent les acides nucléiques (Weil, 2005). Le catabolisme de l'uracile et de la cytosine procède via le malonate semialdéhyde (voir paragraphe 2.3.2.1.1) tandis que celui de la thymine procède par l'intermédiaire du méthylmalonate semialdéhyde (Robinson *et al.*, 1957). Ce dernier est métabolisé en propionyl-CoA par la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (Goodwin *et al.*, 1989).

### 2.3.2.3. Les CoA-ALDHs et la « matière première »

Chez *Pseudomonas fluorescens*, la malonate semialdéhyde déshydrogénase permet l'assimilation de carbone et d'énergie à partir de l'acide acétylèmonocarboxylique du sol (Yamada *et* Jakoby, 1960).

Chez *Bacillus subtilis*, la méthylmalonate pourrait être impliquée dans le catabolisme du myo-inositol par oxydation du malonate semialdéhyde en acétyl-CoA et CO<sub>2</sub> (Yoshida *et al.*, 1997). L'étude du catabolisme du myo-inositol montre l'implication de dix gènes (de A à J), appelés *iol* qui codent pour des protéines. L'activité méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase a été attribuée à la protéine codée par *iolA* d'après ses homologues de structures primaires (Yoshida *et al.*, 1995 ; Yoshida *et al.*, 1997). Une découverte similaire a été réalisée chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* qui est un hôte symbiotique des nodules radiculaires des légumineuses telles que le pois et le soja (Fry *et al.*, 2001). La caractérisation du gène codant pour la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase chez ces deux microorganismes tend à montrer que cette enzyme serait impliquée dans le catabolisme du myo-inositol.

Les microorganismes sont capables de recruter et d'adapter les enzymes des voies métaboliques de molécules naturelles dans le but de dégrader des composés synthétiques nitroaromatiques (Spain, 1995). *Burkholderia cepacia* R34 utilise le 2,4-dinitrotoluène du sol comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Johnson *et al.*, 2002). La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase serait employée dans la voie de dégradation de l'acide 2,4-dihydroxy-5-méthyl-6-oxo-2,4-hexadiénoïque issu du catabolisme du 2,4-dinitrotoluène.

### 2.3.2.4. Les CoA-ALDHs et les plantes

L'auxine, phytohormone primordiale, et le zinc induisent la formation de cals et de racines chez les plants de riz, *Oriza sativa* (Saeki *et al.*, 2000). Au niveau moléculaire, cette induction se traduit par une augmentation de la production de sept protéines dont la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (Oguchi *et al.*, 2004). Cette dernière serait ainsi impliquée dans les étapes de développement des cellules et des organes du riz.

### 2.3.3. Mécanisme enzymatique des CoA-ALDHs

#### 2.3.3.1. Mécanisme enzymatique de la méthylmalonate semialdéhyde et de la malonate semialdéhyde déshydrogénases

L'activité aldéhyde déshydrogénase à CoA décarboxylante a été révélée en 1960 par la caractérisation de la malonate semialdéhyde déshydrogénase chez *Pseudomonas fluorescens* (Yamada *et* Jakoby, 1960). Dans ce cas, une seule enzyme catalyse la conversion du malonate semialdéhyde en acétyl-CoA en présence de cofacteur dinucléotidique et de CoA (Schéma ).

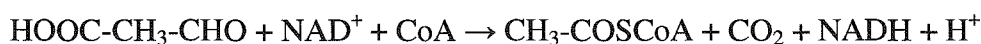


Schéma I.30 : Réaction catalysée par la malonate semialdéhyde déshydrogénase de *P. fluorescens* (Yamada *et* Jakoby, 1960).

Cette activité est confirmée par l'étude de la conversion du méthylmalonate semialdéhyde en propionyl-CoA chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sokatch *et al.*, 1968). En 1970, une MSDH est purifiée chez *P. aeruginosa* (Bannerjee *et al.*, 1970). L'étude des méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénases de *P. aeruginosa* (Bannerjee *et al.*, 1970) et de foie de rat (Goodwin *et al.*, 1989) révèle que cette enzyme catalyse à la fois la conversion du méthylmalonate semialdéhyde et du malonate semialdéhyde en leur acyl-CoA correspondant. Elles sont regroupées sous la dénomination MSDH pour méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase.

Le méthylmalonate semialdéhyde est une molécule chirale, avec un seul carbone asymétrique en position 2 (voir nomenclature en annexe). Le catabolisme de la valine produit l'énantiomère *S* (Manning *et* Pollitt, 1985), tandis que la voie de dégradation de la thymine forme l'énantiomère *R* (Manning *et* Politt, 1985). Du fait de la labilité de l'atome d'hydrogène porté par le carbone asymétrique, il est impossible d'isoler un énantiomère. Pour Goodwin *et* ses collaborateurs (1989), la MSDH ne serait pas stéréospécifique. Elle serait de stéréospécificité *R* pour Roe *et* ses collaborateurs (1998). Dans ce cas, l'énantiomère *S*, issu du catabolisme de la valine, subirait une racémisation naturelle ou assistée par une racémase, pour devenir substrat de la MSDH.

### 2.3.3.2. Mécanisme enzymatique de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de *Bacillus subtilis* (Stines-Chaumeil, 2005 ; Stines-Chaumeil *et al.*, 2006)

L'étude du mécanisme enzymatique de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de *Bacillus subtilis* a fait l'objet du travail de thèse accompli par Claire Stines-Chaumeil (2005) et d'une publication par le même auteur (2006).

La MSDH de *Bacillus subtilis* (*Bs*\_MSDH) appartient à la famille des aldéhyde déshydrogénases et a pour particularité d'être NAD<sup>+</sup> et coenzyme-A -dépendante. La *Bs*\_MSDH est une enzyme tétramérique de 220 kDa de masse moléculaire. Elle catalyse respectivement la conversion du malonate semialdéhyde et du méthylmalonate semialdéhyde en acétyl-CoA et propionyl-CoA. En ce qui concerne l'oxydation de la fonction aldéhydique, la *Bs*\_MSDH procède en deux étapes, l'acylation et la désacylation. La cinétique du mécanisme enzymatique est de type ping-pong (Schéma ). La *Bs*\_MSDH présente une réactivité de demi-site avec deux sous-unités actives par tétramère.

#### 2.3.3.2.1. L'étape d'acylation

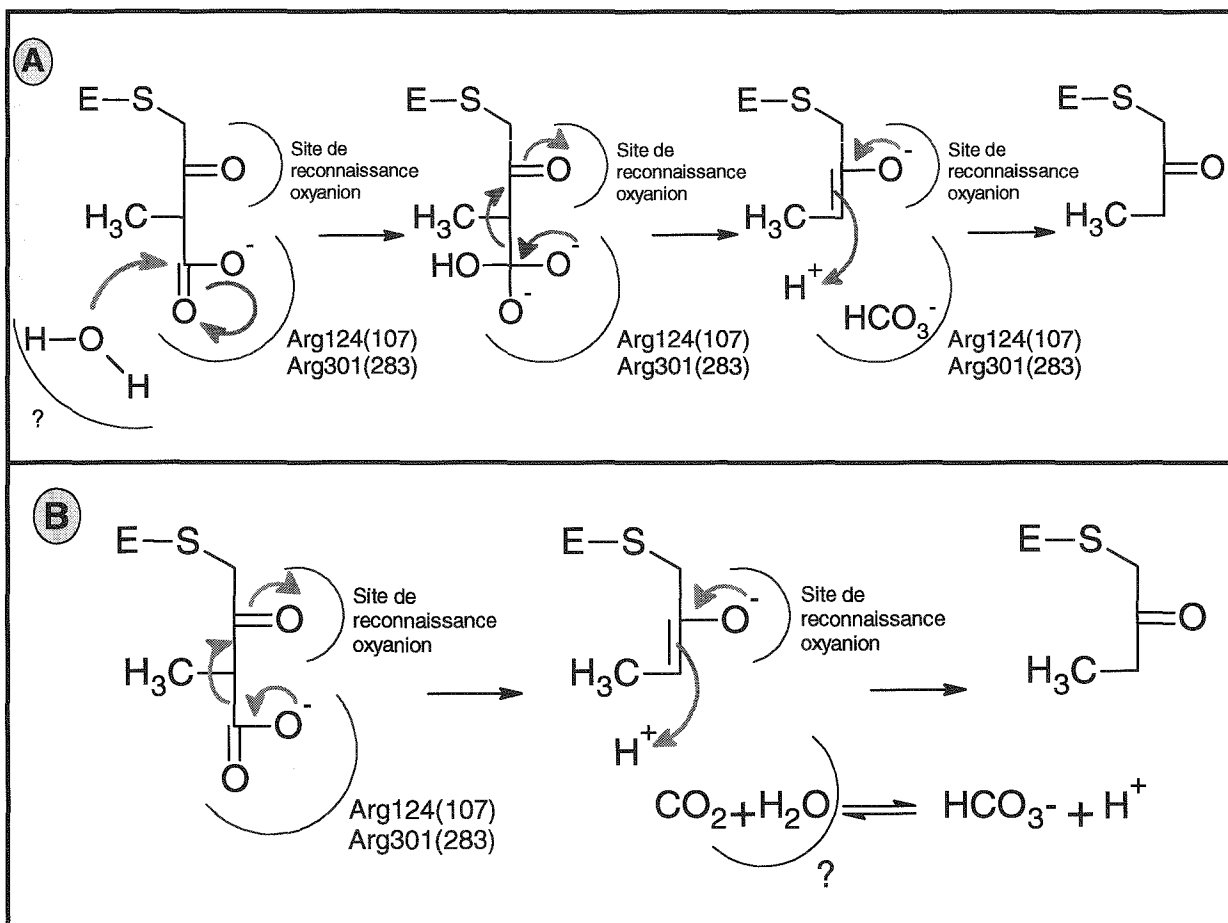
Cette étape est indépendante de la fixation du CoA. La fixation du cofacteur NAD<sup>+</sup> et du substrat est de type séquentiel ordonné. Le substrat se fixe à l'enzyme uniquement après formation du complexe binaire *Bs*\_MSDH/NAD<sup>+</sup>. L'enzyme présente un temps de latence qui est levé par incubation préliminaire de la *Bs*\_MSDH avec le cofacteur. La formation du complexe binaire s'accompagne de l'abaissement du p*K*<sub>app</sub> de la cystéine catalytique (Cys302) d'environ 8,7 à 7,9. Comme pour les ALDHs, cette activation de la cystéine catalytique serait due à des réarrangements locaux au niveau de l'orientation des chaînes latérales du site actif et du cofacteur suite à la fixation du NAD<sup>+</sup>. La formation du complexe ternaire poursuit l'activation de la cystéine catalytique en amenant le p*K*<sub>app</sub> de cette dernière à 5,5. La fixation du substrat engendrerait également des réarrangements locaux qui impliqueraient les chaînes latérales des résidus aminoacyls du site actif, le cofacteur et le substrat. L'attaque nucléophile de la cystéine catalytique sur la fonction aldéhydique du substrat est uniquement possible après bon positionnement et bonne orientation de cette fonction dans le site actif. L'étude du mécanisme enzymatique de mutants, élaborés sur la base du mécanisme enzymatique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante de *Streptococcus mutans* (voir paragraphe 1.2.4.1.3), semble indiquer que deux résidus arginyl (Arg124 et Arg301) participent à la stabilisation du substrat dans une position adéquate. De par la charge positive de la chaîne latérale du résidu arginyl, les résidus Arg124 et Arg301 pourraient stabiliser la fonction carboxylique du substrat. La formation de l'acylenzyme nécessite le passage par un intermédiaire tétraédrique, dont la charge négative portée par l'atome d'oxygène lié au carbone en position 1 est stabilisée par un site oxyanion. Le résidu Asn169 constitue le résidu majeur de ce site (paragraphe 1.2.4.1.1 pour les ALDHs). Par homologie avec les ALDHs, les atomes d'azote de la chaîne principale de la cystéine catalytique (Cys302) et du résidu aminoacyl suivant (Met303) pourraient également être des composants du site oxyanion (paragraphe 1.2.4.1.1). Le cofacteur est ensuite réduit

par transfert d'hydrure sur le carbone en position 4 du nicotinamide. Le NADH est relâché avant la fixation du CoA qui déclenche l'étape de déacylation et après la  $\beta$ -décarboxylation de l'acylenzyme.

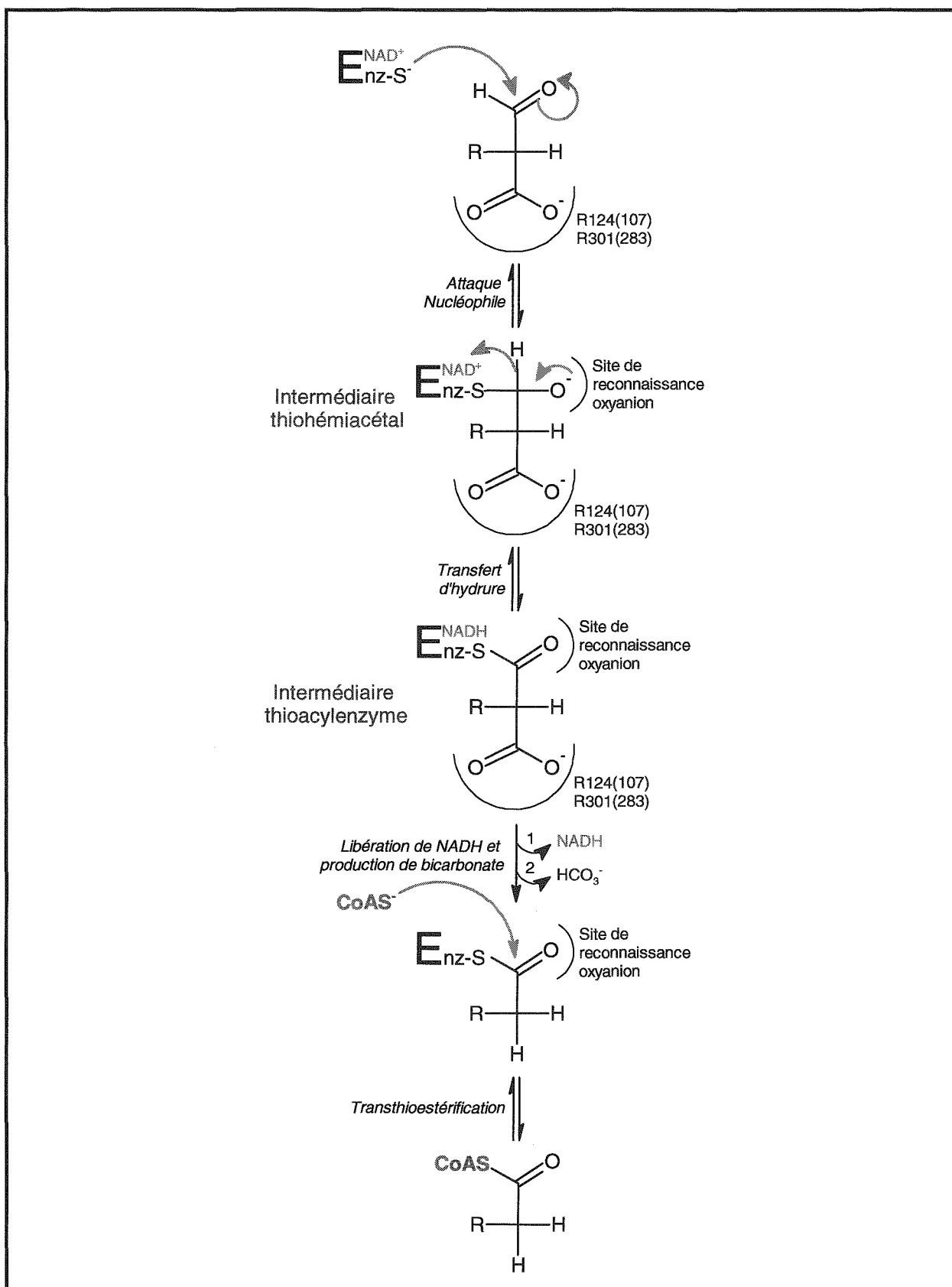
### 2.3.3.2.2. La $\beta$ -décarboxylation

La  $\beta$ -décarboxylation survient après formation de l'acylenzyme et la libération du NADH. Cette décarboxylation libère du bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et produit ainsi un nouvel acylenzyme. Cette étape limite l'ensemble de la réaction catalysée par la *Bs*\_MSDH.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la  $\beta$ -décarboxylation de l'acylenzyme (Schéma). Dans le premier mécanisme (A), le bicarbonate est produit directement par attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la fonction carboxylique de l'acylenzyme. Cette décarboxylation est assistée par le site oxyanion de l'enzyme. Dans le second mécanisme (B), la décarboxylation résulterait uniquement de la position de la fonction carboxylique, en position  $\beta$ , par rapport à la fonction carbonyle et serait favorisée par la présence du site oxyanion. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour valider l'un ou l'autre de ces deux mécanismes.



**Schéma I.31: Mécanismes proposés pour la réaction de décarboxylation catalysée par *Bs*\_MSDH.**  
L'atome de soufre de la cystéine catalytique de l'enzyme est symbolisé par « E-S ». Le  $\text{CO}_2$  est libéré sous forme de bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$ . La numérotation entre parenthèses des résidus aminoacyles correspond à celle employée lors de l'étude structurale.

Schéma I.32 : Mécanisme enzymatique de la *Bs*\_MSDH

« R » représente un groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) pour le méthylmalonate semialdéhyde et le PPCoA. « R » correspond à un atome d'hydrogène pour le malonate et l'acétyl-CoA. La numérotation entre parenthèses des résidus aminoacyls correspond à celle employée lors de l'étude structurale.

#### 2.3.3.2.3. L'étape de désacylation

L'étape de désacylation fait suite respectivement aux étapes d'acylation et de  $\beta$ -décarboxylation. De ce fait, la désacylation s'effectue sur un nouvel acylenzyme (dépourvu de fonction carboxylique). Cette étape nécessite la fixation sur l'enzyme et l'activation du CoA. Le départ du NADH étant un préalable à la fixation du CoA, il est supposé que le NAD<sup>+</sup> pourrait partager son site de fixation avec le CoA.

# *Objectifs*

# Les objectifs du travail de thèse

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier la structure de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase de *Bacillus subtilis* (*Bs\_MSDH*). Cette étude devait conduire à l'identification des éléments structuraux impliqués dans le mécanisme catalytique de cette enzyme en vue d'expliquer les propriétés singulières de cette aldéhyde déshydrogénase par rapport aux enzymes de la même famille.

Pour atteindre cet objectif, le plan de travail était tout d'abord, de déterminer les conditions de cristallisation puis, de résoudre la structure de la *Bs\_MSDH*. Le travail devait se poursuivre par l'obtention de cristaux de complexes enzyme/susstrats et par la résolution des structures de ces complexes afin de mettre en évidence les caractéristiques structurales de l'enzyme qui font d'elle une aldéhyde déshydrogénase particulière. Les aldéhyde déshydrogénases catalysent en deux étapes, l'acylation et la désacylation, la conversion d'aldéhyde en leurs acides correspondants. La *Bs\_MSDH* est une aldéhyde déshydrogénase coenzymeA-dépendante à activité décarboxylante qui convertit respectivement le malonate semialdéhyde et le méthylmalonate semialdéhyde en acétyl-CoA et propionyl-CoA (PPCoA).

Sachant que la fixation de  $\text{NAD}^+$  sur l'enzyme est un prérequis à l'obtention d'un complexe ternaire compétent, la détermination des structures de l'enzyme sous ses formes apo- et holoenzyme avait pour dessein de révéler les changements structuraux engendrés par la fixation de ce cofacteur. L'obtention de cristaux d'acylenzyme semblait possible à partir d'une enzyme native car la constante de vitesse à l'état stationnaire ( $k_{\text{H}_2\text{O}}$ ) est de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  en l'absence de CoA. A ce jour, aucune structure d'aldéhyde déshydrogénase CoA-dépendante n'a été résolue avec ou sans le CoA. La littérature révèle que pour la fixation de ce cofacteur, par opposition aux cofacteurs  $\text{NAD(P)}^+$ , il n'existe ni de structure primaire, ni de repliement caractéristiques de sa fixation (Engel *et* Wierenga, 1996 ; Modis *et* Wierenga, 1998). Les études enzymatiques de la *Bs\_MSDH* n'ayant pas permis d'identifier des résidus aminoacyls impliqués dans la fixation du CoA, la résolution de la structure du complexe enzyme/CoA semblait nécessaire. Pour cela, nous avons envisagé de former trois complexes qui permettraient d'identifier le site (voir le tableau ci-dessous).

Structures à déterminer	Objectifs
Apoenzyme Holoenzyme	Mettre en évidence les changements structuraux consécutifs à la fixation du $\text{NAD}^+$ .
Acylenzyme	Détermination de l'état conformationnel de l'enzyme acylée.
Enzyme + CoA Enzyme + CoA + $\text{NAD}^+$ Enzyme + PPCoA	Identification du site de fixation du CoA et par conséquent des résidus aminoacyls impliqués.



*Matériel et  
Méthodes*

# Sommaire

<b>1. CRISTALLOGENESE</b> .....	<b>49</b>
1.1. PREPARATION DE LA PROTEINE.....	49
1.2. LES METHODES EMPLOYEES.....	49
1.2.1. La diffusion de vapeur.....	49
1.2.2. Le « batch ».....	51
1.3. LES ASPECTS PRATIQUES DE LA CRISTALLOGENESE .....	51
1.3.1. Phénomène multi-paramétrique .....	51
1.3.2. Démarches employées.....	52
1.3.2.1. Matrices d'échantillonnage « clairsemées » (Jancarik <i>et</i> Kim, 1991 ; Doudna <i>et al.</i> , 1993).....	52
1.3.2.2. Méthode de criblage factoriel complet (Carter, 1999).....	52
1.3.2.3. Matrices de criblage développées .....	52
<b>2. RESOLUTION DE STRUCTURES</b> .....	<b>55</b>
2.1. ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES DE DIFFRACTION .....	55
2.1.1. Collecte des données .....	55
2.1.1.1. Préparation des cristaux en vue de collectes à basse température.....	55
2.1.1.2. Collecte des données .....	55
2.1.1.2.1. <i>Collecte au synchrotron</i> .....	55
2.1.1.2.2. <i>Les lignes de lumière utilisées</i> .....	56
2.1.2. Le traitement des données .....	57
2.1.2.1. Détermination de la maille et du réseau de Bravais avec XDS.....	57
2.1.2.2. Intégration et correction des intensités .....	57
2.1.2.3. Mise à l'échelle et réduction du jeu de données .....	57
2.1.2.4. Paramètres de suivi du traitement des données.....	58
2.1.3. Phasage par la méthode du remplacement moléculaire.....	58
2.2. AFFINEMENT DU MODELE .....	59
2.3. QUALITE DES MODELES .....	61
2.3.1. Niveau cristallographique .....	61
2.3.2. Niveau géométrique .....	62
<b>3. MODELISATION MOLECULAIRE</b> .....	<b>63</b>
3.1. MECANIQUE MOLECULAIRE .....	63
3.1.1. Champs de force.....	63
3.1.2. Calcul des charges atomiques.....	64
3.1.3. Minimisation .....	64

La méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis* est produite et purifiée par l'équipe du Professeur Guy Branlant au laboratoire de Maturation des ARN et d'Enzymologie Moléculaire (MAEM, UMR 7567 CNRS-UHP). La protéine est surexprimée dans la souche recombinante d'*Escherichia coli* HB 101 (Dubourg et al., 2004).

# 1. Cristallogénèse

## 1.1. Préparation de la protéine

Initialement, la protéine est conservée dans le tampon de purification, saturé à 90 % en sulfate d'ammonium. Avant d'entreprendre les essais de cristallisation, la protéine est dialysée contre une solution de tampon phosphate (KPi 50mM et pH8,2) supplémentée en DTT (1 mM) et EDTA (1 mM). Deux techniques de dialyse ont été utilisées :

- le boudin de dialyse (membrane Spectra/Por®7, 10000 MWCO<sup>1</sup>, Spectrum® Laboratories Inc.)
- la cellule à filtre (centricon®, 30000 MCWO, Millipore Corporation).

La concentration de la protéine et l'activité enzymatique sont déterminées par mesure de la densité optique sur un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Instruments).

## 1.2. Les méthodes employées

### 1.2.1. La diffusion de vapeur

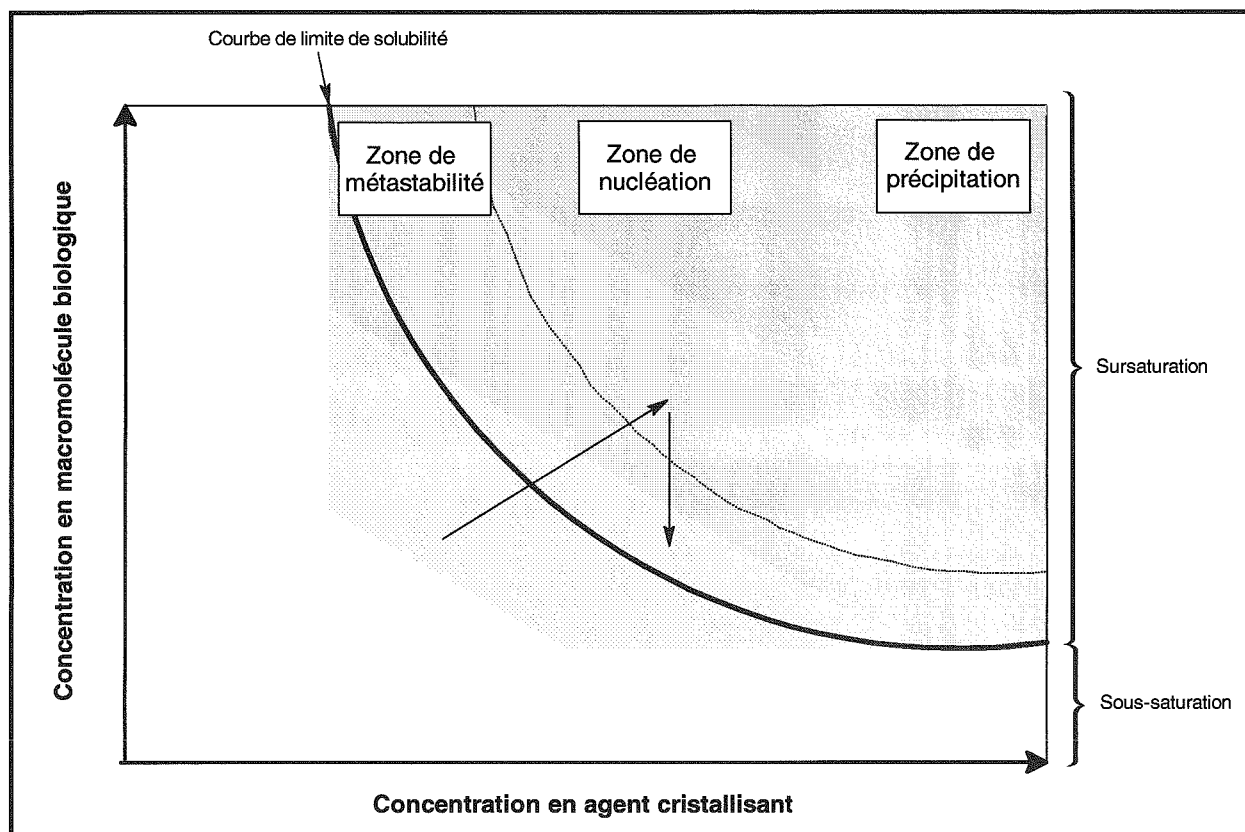
Le principe de cette méthode est de concentrer graduellement une solution contenant la molécule à cristalliser (Mc Pherson *et al.*, 1995) par diffusion de vapeur. La cristallisation des macromolécules biologiques nécessite la présence d'un agent précipitant, qui a pour fonction de diminuer la solubilité de la macromolécule sans pour autant la dénaturer.

La diffusion de vapeur induit une augmentation de la concentration en macromolécule biologique et en agent cristallisant dans la goutte. L'augmentation de la concentration de ces deux composantes a pour objectif de placer la macromolécule biologique en condition de sursaturation. Dans les conditions favorables, la solution qui compose la goutte atteint la zone de nucléation du diagramme de phase (Figure ) où des germes cristallins se forment. La formation des germes induit une diminution de la concentration en solution de macromolécule

---

<sup>1</sup> MWCO "Molecular Weight Cut-off" ou seuil de coupure en Dalton.

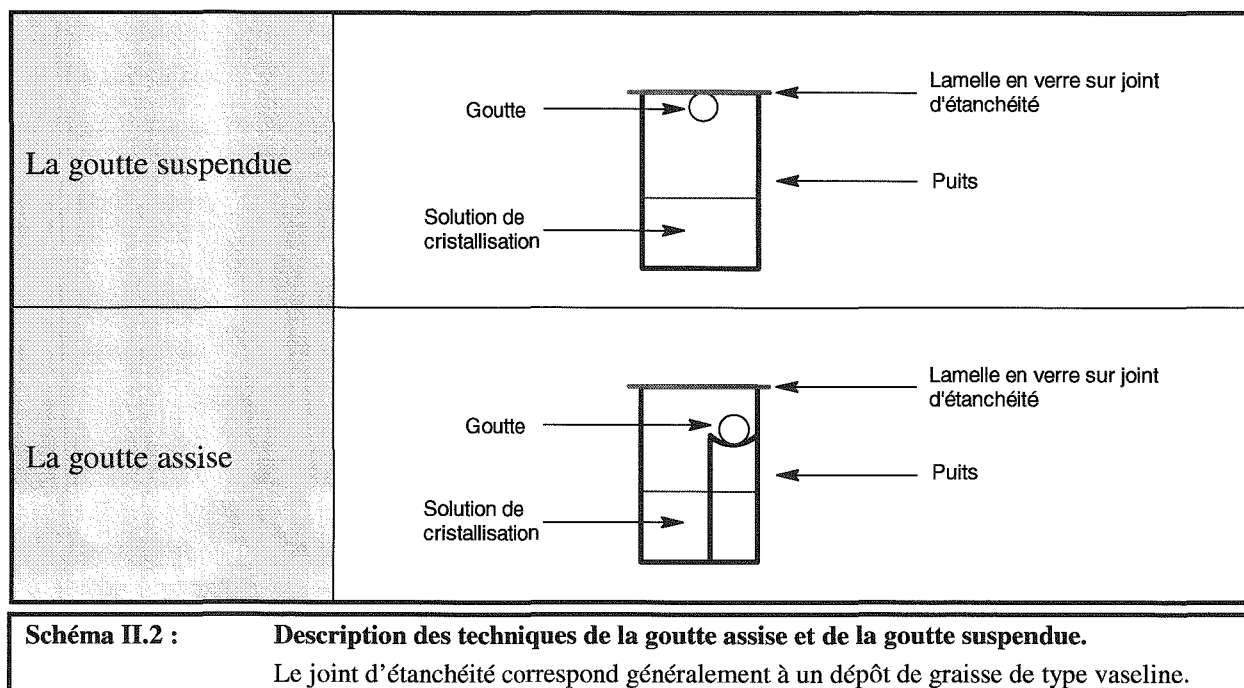
biologique pour atteindre une zone de métastabilité (zone de croissance), de telle sorte que la concentration est suffisante pour que les cristaux persistent et croissent.



**Figure II.1 :** Diagramme de phase bidimensionnel d'une macromolécule biologique en fonction de sa propre concentration et de la concentration en agent cristallisant.

Les flèches en noir portées sur le diagramme indiquent l'évolution de la concentration en solution de macromolécule biologique lors de la cristallisation par la méthode de la diffusion de vapeur. La courbe de limite de solubilité (bleu foncé) sépare les zones de sursaturation (une zone hachurée et deux zones en dégradés de bleu) la zone de sous-saturation (blanche)

Les techniques de la goutte suspendue et de la goutte assise sont les techniques les plus utilisées pour mettre en œuvre cette méthode (Schéma ). Une goutte, composée de la macromolécule biologique et de l'agent précipitant, est introduite dans une enceinte, close hermétiquement, qui contient un puits d'agent précipitant à une concentration supérieure. La différence de concentration en agent précipitant, entre la goutte et le puits, a pour but d'induire la diffusion de vapeur. La position de la goutte est la principale différence entre ces deux techniques. Cette différence est primordiale puisqu'elle ne confère pas les mêmes surfaces d'échange à la goutte et par conséquent les mêmes propriétés d'échanges. D'où les divergences de résultats, pour une même condition de cristallisation, en fonction de la technique employée.



### 1.2.2. Le « batch »

La méthode « batch » est la méthode la plus simple (Sauter et Giégé, 2001). En effet, l'agent précipitant est ajouté à la solution contenant la macromolécule, de façon à placer directement celle-ci en condition de sursaturation. La technique la plus couramment utilisée est celle de la goutte à huile. La goutte de mélange, macromolécule biologique-agent cristallisant, est en immersion complète dans un puits rempli d'huile (qui ralentit fortement l'évaporation).

## 1.3. Les aspects pratiques de la cristallogénèse

### 1.3.1. Phénomène multi-paramétrique

L'obtention d'un échantillon de macromolécule biologique pure, structuralement homogène et en quantité suffisante, est primordiale avant de commencer une expérience de cristallogénèse. Par ailleurs, de nombreux paramètres sont à prendre en compte pour déterminer les conditions *ab initio* de cristallisation d'une macromolécule biologique. Les principaux paramètres de nature physico-chimiques et biochimiques sont listés ci-dessous :

- Paramètres physiques : température, pression, méthode de cristallisation, ...
- Paramètres chimiques : pH, nature de l'agent cristallisant, additifs, ...
- Paramètres biochimiques : contaminations, vieillissement de l'échantillon, fixation des ligands, ...

## 1.3.2. Démarches employées

Actuellement, différentes stratégies peuvent être employées pour déterminer les conditions initiales de cristallisation d'une macromolécule biologique. Ces stratégies sont généralement menées en parallèle afin d'augmenter les probabilités de réussite.

Dès l'obtention d'une condition initiale de cristallisation, celle-ci est affinée par variations des paramètres physico-chimiques (température, pH, concentrations de l'agent cristallisant et de la macromolécule biologique, ...).

Pour cette étude, seules les méthodes d'échantillonnage décrites ci-dessous ont été utilisées.

### 1.3.2.1. Matrices d'échantillonnage « clairsemées » (Jancarik *et al.*, 1991 ; Doudna *et al.*, 1993)

Les matrices d'échantillonnage clairsemées rassemblent un ensemble de conditions de cristallisation qui ont déjà permis l'obtention d'un grand nombre de cristaux de macromolécules biologiques. L'utilisation de ces matrices permet de tester de larges gammes de pH et d'agents cristallisants (sels, polymères et solvants organiques).

### 1.3.2.2. Méthode de criblage factoriel complet (Carter, 1999)

Les méthodes de criblage factoriel ont été développées sur la base de méthodes mathématiques. Le prérequis à l'emploi de ces méthodes de criblage est la détermination des paramètres physico-chimiques et biochimiques à tester. Avant de débiter les essais, l'expérimentateur se limite à quelques tampons, pH, agents cristallisants, concentrations en macromolécules biologiques et températures de conservation des essais.

Le criblage factoriel complet consiste à tester toutes les combinaisons possibles d'association des paramètres retenus. Cette méthode ne peut être employée que pour un nombre restreint de paramètres à faire varier.

Cette méthode a été développée afin de tester de manière égale et efficace tous les paramètres considérés. Son emploi permet principalement de mettre en évidence les paramètres qui ont l'incidence la plus grande sur la cristallisation d'un échantillon biologique.

### 1.3.2.3. Matrices de criblage développées

Les matrices de criblage commerciales suivantes ont été employées pour détecter des conditions de cristallisation de la Bs\_MSDH : « Crystal Screens™ 1 & 2 » de Hampton Research, « Clear Strategy Screens™ I & II » et « Structure Screens 1 & 2 » de Molecular Dimensions Limited, « Wizard Screens 1 & 2 » de Emerald Biostructures et « JBS Screens 1 to 10 » Jena BioScience. D'autres matrices ont été mises au point spécifiquement pour la cristallisation de la Bs\_MSDH (Tableau , Tableau , Tableau , Tableau et Tableau ).

		Masse moléculaire des PEG (g.mol <sup>-1</sup> )									
		400	600	1000	1500	3500	4000	6000	8000	10000	20000
Pourcentage de PEG (%)	15										
	20										
	30										

**Tableau II.3 :** Matrice de criblage à base de polyéthylène glycol (30 conditions).

Matrice de criblage conçue avec dix masses moléculaires différentes de polyéthylène glycol (PEG) dans le tampon phosphate KPi 50 mM et pH 8,2. La quantité de PEG incorporé est exprimée en pourcentage de volume par volume (% V/V).

Tampon		Concentration en sulfate d'ammonium (M)			
Nature	pH				
Acétate	4,6	2,1	2,2	2,4	2,5
	5,2				
	5,6				
MES	6,0				
	6,6				
HEPES	7,2				
	7,6				
	8,0				
TRIZMA	8,5				
	8,9				

**Tableau II.4 :** Matrice de criblage à base de sulfate d'ammonium (40 conditions).

Les tampons ont été choisis en fonction des pH à atteindre (pH dans la zone tampon). Toutes les solutions tampons sont à une concentration de 50 mM à l'exception du tampon acétate qui est à 100 mM. Le symbole « | » signifie que la concentration en sulfate d'ammonium est la même pour les cellules d'une même colonne.

		Concentration en sulfate d'ammonium (M)					
		0,25	0,50	1,00	1,50	1,75	2,00
10 % V/V de PEG (M)	400						
	600						
	1000						
	6000						
	8000						

**Tableau II.5 :** Matrice de criblage à base de polyéthylène glycol et sulfate d'ammonium (30 conditions).

Matrice de criblage conçue avec cinq PEG de masses moléculaires différentes dans le tampon phosphate (KPi 50 mM et pH8,2). La quantité de PEG incorporé est exprimée en pourcentage de volume par volume (% V/V). Le pH a été réajusté à une valeur de 8,2 après incorporation du sulfate d'ammonium. Le symbole « | » indique que la concentration en sulfate d'ammonium est la même dans toute la colonne.

Concentration en sulfate d'ammonium (M)	Concentration de la protéine (mg.mL <sup>-1</sup> )			
	1,5	175	200	225
1,6				
1,7				
1,8				
1,9				
2,0				
2,1				
2,2				
2,3				
2,4				
2,5				
2,6				
2,7				
2,8				
2,9				
3,0				

**Tableau II.6 :** Première matrice d'affinement à base de sulfate d'ammonium et concentrations en *Bs\_MSDH* testées.

Dans cette matrice d'affinement, le sulfate d'ammonium est mis en solution dans le tampon phosphate KPi (50 mM et pH 8,2). Pour chaque concentration en sulfate d'ammonium, le pH a été réajusté à une valeur de 8,2. Le symbole « | » indique que la concentration en sulfate d'ammonium est la même dans toute la colonne.

Nature	Tampon	Concentration en sulfate d'ammonium (M)			
	pH	1,8	1,9	2,0	2,1
Acétate	4,6				
	5,2				
	5,6				
MES	6,0				
	6,6				
-	V				

**Tableau II.7 :** Deuxième matrice d'affinement à base de sulfate d'ammonium.

Les tampons acétate et MES ont été utilisés de façon à avoir un pH commun pour chaque solution de sulfate d'ammonium. Le symbole « - » indique que le sulfate d'ammonium a été mis en solution dans l'eau. Dans ce cas, le pH de la solution varie autour d'une valeur de 5,5 en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium. Ce phénomène est symbolisé par la lettre V dans le tableau. Le symbole « | » indique que la concentration en sulfate d'ammonium est la même dans toute la colonne.



## 2. Résolution de structures

### 2.1. Acquisition et traitement des données de diffraction

#### 2.1.1. Collecte des données

##### 2.1.1.1. Préparation des cristaux en vue de collectes à basse température

Un cristal de macromolécules biologiques se dégrade rapidement durant la collecte des données de diffraction. Les radiations ionisantes incidentes engendrent des dommages importants sur le cristal. Pour limiter la dégradation du cristal, la collecte des données s'effectue à 100K par projection constante d'un flux d'azote sur le cristal.

L'espace occupé par le solvant représente 25 à 90% du volume total du cristal. La méthode de la congélation rapide (« flash-cooling ») est la méthode employée actuellement pour amener les cristaux de macromolécules biologiques de la température de cristallisation à 100K (Rodgers, 1994 ; Garman *et* Schneider, 1997). L'objectif de cette méthode est d'éviter la formation de glace qui pourrait diffracter et/ou dégrader le cristal. La congélation brutale et rapide du cristal permet de vitrifier le solvant aqueux présent à l'intérieur et autour du cristal (Mayer, 1985; Dubochet *et* Schultz, 1988). Ainsi vitrifié, le solvant aqueux est figé sous une forme amorphe qui ne peut diffracter. La vitrification est améliorée par adjonction d'additifs chimiques qualifiés de cryo-protecteurs tel que le glycérol. 2% à 30% en volume d'additifs sont mélangés à la solution de cristallisation de la macromolécule biologique. Une autre méthode consiste à tremper le cristal dans une huile pour créer un film autour de celui-ci. Si le cristal résiste au trempage, cette méthode permet aussi d'éviter la formation de glace (Riboldi-Tunnicliffe *et* Hilgenfeld, 1999 ; Gakhar *et* Wiencek, 2005).

##### 2.1.1.2. Collecte des données

###### 2.1.1.2.1. Collecte au synchrotron

La lumière synchrotron produite est en grande partie composée de rayons X. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques situées entre l'ultraviolet et les rayons gamma. Ceux utilisés en cristallographie des macromolécules biologiques ont des longueurs d'onde comparables aux distances interatomiques.

Des électrons, émis par un canon à électrons, sont d'abord accélérés dans un accélérateur linéaire (linac) puis transférés dans un accélérateur circulaire (booster synchrotron) jusqu'à ce qu'ils atteignent une énergie de plusieurs milliards d'électronvolts (GeV). Ils sont alors

envoyés dans l'anneau de stockage dans lequel ils tournent à énergie constante pendant plusieurs heures à l'intérieur d'une chambre à vide. L'anneau de stockage est constitué de sections courbes (aimants de courbure) et de sections droites (dans lesquelles se trouvent notamment des onduleurs formés de petits aimants juxtaposés). Lorsqu'ils passent dans ces aimants, les électrons sont déviés et décrivent une trajectoire courbe. Cette déviation conduit les électrons à émettre de la lumière synchrotron.

Les faisceaux de rayonnement synchrotron émis par les électrons se dirigent vers les lignes de lumière (Figure II.8), disposées tout autour de l'anneau. Ces lignes de lumière se compartimentent de la façon suivante :

Schéma descriptif	Cabines	Descriptions
	Optique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- accolée à l'anneau de stockage</li> <li>- comporte des instruments d'optique qui donnent à la lumière les caractéristiques désirées pour l'expérience.</li> </ul>
	Expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contient un dispositif sur lequel est monté l'échantillon à étudier.</li> <li>- un ou plusieurs détecteurs enregistrent les informations générées au moment de l'interaction de la lumière avec la matière.</li> </ul>
	De contrôle	permet aux chercheurs de diriger leurs expériences et de recueillir les données.

**Figure II.8 :** Ligne de lumière de l'ESRF Grenoble (<http://www.esrf.fr>)

#### 2.1.1.2.2. Les lignes de lumière utilisées

Les trois lignes de lumière utilisées sont BM30A-FIP à Grenoble, X11 et BW7 à Hambourg.

	BM30A-FIP	X11	BW7A
Synchrotron	ESRF-Grenoble	DESY-EMBL Hambourg	DESY-EMBL Hambourg
Source synchrotron	6 GeV	4,5 GeV	4,5 GeV
Dispositif d'insertion	aucun	aucun	« wiggler » multipôle
Responsables	J.-L. Ferrer, L. Jacquamet	S. Panjekar, V. Lamzin	A. Schmidt
Longueur(s) d'onde	0,49 à 1,53 Å	0,81 Å	0,7 à 1,8 Å
Détecteur	MAR CCD 165 mm	MAR CCD 165 mm	MAR CCD 165 mm
Résolution maximale possible	1,43 Å	0,8 Å	0,7 Å
Équipement de refroidissement	Oxford Cryosystem (-190 à +100 °C)	Oxford Cryosystem (-170 à +20 °C)	Oxford Cryosystem (-170 à +20 °C)

**Tableau II.9 :** Descriptifs et caractéristiques des lignes de lumière utilisées.

Les conditions détaillées de collecte des données des expériences menées sont décrites dans le chapitre *Résultats*.

## 2.1.2. Le traitement des données

Actuellement, le traitement des données est effectué automatiquement par divers programmes dont XDS (Kabsch, 1993) utilisé principalement pour cette étude.

Le traitement des données se décompose en deux étapes distinctes. La première étape consiste à déterminer la maille cristalline et le réseau de Bravais qui caractérise le réseau cristallin. La seconde étape correspond à la détermination des intensités qui permettent de définir le motif du cristal étudié.

### 2.1.2.1. Détermination de la maille et du réseau de Bravais avec XDS

Cette étape utilise un algorithme d'autoindexation développé par Wolfgang Kabsch (1993). Dans un premier temps, les pics les plus intenses, correspondant aux tâches de diffraction, sont localisés sur quelques clichés de diffraction. Dans un deuxième temps, le programme établit une liste de vecteurs qui existent entre ces pics. Ensuite, le programme détermine trois vecteurs non-coplanaires, linéairement indépendants et de plus petits modules qui indexent, avec des valeurs entières, les pics de diffraction. A l'issue de cette étape le programme obtient les paramètres de la maille réduite du cristal. L'affinement des paramètres géométriques du système comme la position du faisceau direct sur le détecteur, la distance cristal-détecteur, les paramètres de maille, ... permettent de choisir dans la plupart des cas le réseau de Bravais du cristal parmi 44 réseaux types. Le programme établit un facteur de qualité d'indexation entre le réseau trouvé pour le cristal et chacun des 44 réseaux types.

### 2.1.2.2. Intégration et correction des intensités

XDS utilise un processus en deux étapes pour estimer l'intensité des tâches de diffraction. Cette méthode suppose que des réflexions voisines (aussi bien faibles que fortes) possèdent le même profil normalisé. Tout d'abord, le logiciel prédit un profil tridimensionnel moyen pour la réflexion à intégrer à partir de réflexions fortes voisines. Puis, celui-ci applique au mieux le profil moyen sur le pic à intégrer pour en estimer l'intensité.

### 2.1.2.3. Mise à l'échelle et réduction du jeu de données

En fonction de l'orientation initiale du cristal, tout ou une partie de celui-ci est immergé dans le faisceau de rayons X. La mise à l'échelle de toutes les images intégrées permet de constituer un jeu de données complet.

Le jeu de données mis à l'échelle est moyenné sur les réflexions équivalentes par les symétries ou par leurs collectes multiples.

### 2.1.2.4. Paramètres de suivi du traitement des données

La qualité du jeu de données obtenu est évaluée par plusieurs paramètres issus de l'analyse statistique des données (Tableau ). Seuls les paramètres qui correspondent à l'ensemble du jeu de données et à la dernière couronne de résolution sont résumés dans un tableau de résultats.

Paramètres	Définitions
Résolution (Å)	niveau de détail (en pratique observé dans les cartes de densité électronique) obtenu à partir du jeu de données de diffraction. L'information sur les détails de la structure est portée par les faisceaux diffractés observés à plus grand angle.
Redondance	nombre de fois que la diffraction d'une famille de plans ( <i>hkl</i> ) ou ses équivalentes est mesurée.
Complétude (%)	taux de réflexions mesurées par rapport au nombre théorique de réflexions à mesurer pour une résolution donnée.
Rapport I/σI	rapport entre l'intensité mesurée et l'écart type estimé de cette mesure.
R <sub>merge</sub> (%)	estimation de la déviation entre différentes intensités équivalentes et leurs moyennes. $R_{sym} = \sum  I_j - \langle I \rangle  / \sum I_j$ où j est la j <sup>ème</sup> mesure de l'intensité associée au nœud du réseau réciproque ( <i>hkl</i> ) ou ses équivalentes et $\langle I \rangle$ la valeur moyenne.

**Tableau II.10 :** Description des paramètres d'évaluation de la qualité des données collectées.

### 2.1.3. Phasage par la méthode du remplacement moléculaire

Le facteur de structure, représentant un terme de l'onde diffractée par une famille de plans (*hkl*), est composé du module et de la phase  $\varphi$  :  $F_{obs}(hkl) = ||F_{obs}(hkl)|| e^{i \varphi_{hkl}}$ . L'amplitude de l'onde diffractée (par une famille de plans (*hkl*)) est directement obtenue à partir des clichés de diffraction. Mais la phase de cette onde reste à déterminer.

La méthode du remplacement moléculaire utilise un modèle atomique connu, correctement orienté et positionné dans la maille de la structure inconnue, pour obtenir un jeu initial de phases (Rossman, 1972 ; Tong & Rossman, 1990). Le modèle est orienté dans la maille par une fonction de rotation puis positionné dans le cristal par une fonction de translation (Lattman, 1985). Cette méthode est valable uniquement si le modèle connu et le modèle à déterminer présentent une homologie structurale suffisante.

La suite de programmes de CNS (Brunger *et al.*, 1998) a été utilisée pour effectuer les remplacements moléculaires de cette étude.

## 2.2. Affinement du modèle

Le modèle construit dans la carte de densité électronique par remplacement moléculaire ne rend pas bien compte des données expérimentales. Le processus d'affinement a pour objectif de réduire l'écart entre le modèle et les données expérimentales.

L'affinement n'est possible, et ne converge de manière satisfaisante, que si le nombre d'observations est supérieur au nombre de paramètres. Les paramètres sont au nombre de quatre par atome ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ,  $B$ ). Pour favoriser la convergence, l'affinement est réalisé sous contraintes, par apport de données géométriques externes issues de l'étude de structures de petites molécules et de protéines obtenues à haute résolution (longueurs des liaisons, valeurs des angles de valences, ...). Les coordonnées des atomes ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) sont affinées indépendamment des facteurs d'agitation thermique  $B$ . Quant au taux d'occupation d'une entité, comme un cofacteur, celui-ci est soit affiné par des programmes adaptés soit, le plus fréquemment, modifié manuellement suite à l'analyse graphique de la densité électronique.

Dans un affinement cristallographique, trois axes sont donc à prendre en compte : le type de paramètres à affiner, la méthode d'affinement et le critère de convergence. Le logiciel CNS (Brünger *et al.*, 1998) permet soit d'affiner le modèle en corps rigide, soit les positions  $x$ ,  $y$ ,  $z$  de chacun des atomes, soit les déplacements atomiques de manière isotrope ou anisotrope, ou soit les angles de torsion. Au cours du processus d'affinement par minimisation, la « pseudo énergie potentielle » du système ( $E_{tot}$ ) est minimisée. Cette énergie est composée de l'énergie moléculaire de la protéine ( $E_{mol}$ ) et d'une pseudo-énergie cristallographique ( $E_{crist}$ ) (Tableau ). Pour ce travail, l'algorithme du gradient conjugué a été utilisé pour minimiser l'énergie potentielle du système. Cet algorithme permet de changer graduellement les coordonnées des atomes du système pour amener progressivement celui-ci dans une conformation dont l'énergie potentielle correspond à un minimum d'énergie local. Pour pallier aux limites de l'affinement par minimisation, la dynamique moléculaire par la méthode du recuit simulé peut être utilisée. Dans ce cas, la température thermodynamique est le paramètre utilisé pour permettre au système de franchir des barrières énergétiques de l'ordre de l'énergie cinétique. La température thermodynamique de départ est de l'ordre de 2500 K, puis elle est progressivement diminuée pour amener le système à 350 K. Le logiciel CNS utilise deux critères de convergence que ce soit pour un calcul de minimisation ou de dynamique moléculaire. Le premier a pour objectif de minimiser le résiduel de moindres carrés. Tandis que le second, basé sur la théorie de la maximisation de vraisemblance, recherche le modèle le plus probable.

Les facteurs d'agitations thermiques sont soit affinés individuellement pour chaque atome, soient en groupe pour tous les atomes d'un même résidu aminoacyl ou d'une même molécule de cofacteur. Le choix du type d'affinement des  $B$  est effectué en fonction de la résolution de la structure et de la qualité de la densité électronique.

Energies	Descriptions	
<b>totale</b>	$E_{tot} = E_{mol} + E_{crist}$	
moléculaire	$E_{mol} = E_{liantes} + E_{non\ liante}$	
liées	$E_{liées} = E_l + E_\theta + E_\phi + E_p$	
d'oscillation harmonique des liaisons covalentes	$E_{l_{ij}} = \sum_{i,j=1}^N \frac{1}{2} k_{ij} (l^{ij} - l_o^{ij})^2$	$k_{ij}$ : constante de force $l^{ij} - l_o^{ij}$ : allongement de la liaison ( $l_o^{ij}$ est la distance de référence)
d'oscillation harmonique des angles de valences	$E_{\theta^i} = \sum_{\theta^i} \frac{1}{2} k_{\theta^i} (\theta^i - \theta_o^i)^2$	$k_{\theta^i}$ : constante de force $\theta^i - \theta_o^i$ : déplacement angulaire ( $\theta_o^i$ est l'angle de référence)
potentielle des angles dièdres	$E_\phi = \sum \frac{1}{2} k_{\phi_i} [1 + \cos(n_i \phi_i - \delta_i)]$	$k_{\phi_i}$ : barrière de torsion $n_i$ : périodicité $\phi_i$ : angle dièdre $\delta_i$ : phase déterminant le point zéro de la rotation
d'oscillation des angles de torsion	$E_p = \sum \frac{1}{2} K_\zeta (\zeta^i - \zeta_o^i)^2$	angles : définis par 4 atomes non liés $K_\zeta$ : constante de force $\zeta^i - \zeta_o^i$ : déplacement angulaire ( $\zeta_o$ angle de torsion de référence)
Non liantes	$E_{non\ liantes} = E_c + E_{vdW}$	
électrostatique ou de Coulomb	$E_c = \sum_{\text{paires } 1,4} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r \epsilon_o r_{ij}}$	$q_i$ et $q_j$ : charges partielles des atomes i et j. $\epsilon$ : constante diélectrique du milieu
van der Waals	$E_{vdW} = \sum_{\text{paires } 1,4} E_{ij} \left[ -2 \left( \frac{R_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 + \left( \frac{R_{ij}}{d_{ij}} \right)^{12} \right]$	$e_{ij}$ : valeur du puits du potentiel de Lennard et Jones au niveau de $R_{ij}$ . $R_{ij}$ : distance d'interaction entre les atomes i,j pour laquelle l'énergie est minimale $d_{ij}$ : distance entre les atomes i,j
cristallographique	correspond à une énergie fictive appelée critère de convergence. Ce critère peut être simplement la différence entre les facteurs de structure observés et calculés, mais il peut aussi être fondé sur des méthodes mathématiques plus complexes tel que la maximum de vraisemblance.	

**Tableau II.11 :** Description des énergies moléculaire et cristallographique composant l'énergie potentielle du système affiné.

L'alternance d'étapes d'affinement et de corrections manuelles du modèle est nécessaire pour converger vers le minimum « absolu » d'énergie.

Deux facteurs d'accord,  $R_{crist}$  et  $R_{free}$ , permettent de suivre et de contrôler le processus d'affinement (Tableau ). Ces deux facteurs doivent diminuer de façon concomitante durant le processus.

Facteurs d'accord	Abréviations	Descriptions
Cristallographique	$R_{crist}$	Calculé à partir de (r) % des données
Libre	$R_{free}$	Calculé à partir de (1-r) % des données

**Tableau II.12 :** Description des facteurs d'accord utilisés pour suivre et évaluer le processus d'affinement.

Les affinements des modèles des structures ont été effectués avec le programme CNS (Brünger *et al.*, 1998) dans les étapes de calculs et, le programme Turbo-Frodo (Roussel *et Cambillau*, 1991) pour les phases de reconstruction graphique.

## 2.3. Qualité des modèles

L'obtention de bons facteurs d'accords  $R_{crist}$  et  $R_{free}$  ne permet pas de préjuger seul de la qualité du modèle obtenu. La qualité et la justesse des modèles sont discutées à deux niveaux :

1 <sup>er</sup> niveau	Cristallographique	Modèle évalué par rapport	aux données cristallographiques mesurées sur le cristal étudié
2 <sup>ème</sup> niveau	Géométrique		à des structures de petites molécules ou des structures de protéines obtenues à haute résolution

Les paramètres pris en compte concernent l'ensemble des données et la dernière couronne de résolution.

### 2.3.1. Niveau cristallographique

Le processus d'affinement aboutit à un modèle final caractérisé par ses facteurs d'accord  $R_{crist}$  et  $R_{free}$  et son facteur d'agitation thermique moyen (B moyen). Des cartes de densité électronique finales, de type  $fo-fc$  et  $2fo-fc$  (ou  $3fo-2fc$ ), sont établies à partir de ce modèle. La qualité du modèle obtenu est discutée après l'étude croisée des données présentées dans le Tableau et en tenant compte de la résolution.

Données cristallographiques	Dénominations	Critères
Facteur d'accord cristallographique	$R_{crist}$	valeur seule et par rapport au $R_{free}$
Facteur d'accord libre	$R_{free}$	valeur seule et par rapport au $R_{crist}$
Densité électronique	<b>2fo-fc ou 3fo-2fc</b>	continuité de la densité
Densité électronique	<b>fo-fc</b>	taux de présence, amplitudes des pics résiduels
Facteur d'agitation thermique	<b>B</b>	valeur du B moyen par rapport à celui déduit de la courbe de Wilson valeurs des B locaux par rapport au B moyen du modèle

**Tableau II.13 :** Données disponibles pour évaluer, au niveau cristallographique, la qualité du modèle déterminé en fonction de la résolution.

### 2.3.2. Niveau géométrique

Cette ultime étape est une étape de validation du modèle en accord avec les connaissances actuelles sur la structure des protéines. La géométrie du modèle obtenu est comparée à celles de structures connues et obtenues à haute résolution (Tableau ).

Géométrie	Critères	Expression
Globale	longueur des liaisons	r.m.s.d (Å)
	angles de valence	r.m.s.d (°)
	angles dièdres	r.m.s.d (°)
	angles impropres	r.m.s.d (°)
Chaînes principales	angles $\phi$ et $\psi$	diagramme de Ramachadran
Chaînes latérales	conformations	rotamères possibles

**Tableau II.14 :** Description des critères géométriques considérés pour évaluer un modèle.  
r.m.s.d : écart quadratique moyen par rapport aux valeurs standards.

Le programme Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) a été utilisé pour analyser la géométrie des modèles obtenus.



## 3. Modélisation moléculaire

Des travaux de modélisation moléculaire ont été entrepris après avoir obtenu la structure cristallographique de la MSDH de *Bacillus subtilis* et en parallèle avec la détermination de structures de complexes enzyme-substrat(s).

Le terme modélisation moléculaire regroupe un ensemble de méthodes qui permettent de simuler le comportement d'un système de particules. Le système étudié peut aller d'une molécule simple diatomique jusqu'à des macromolécules biologiques de plusieurs dizaines de milliers d'atomes. Seules les performances des ordinateurs limitent la taille du système étudié. Ces études nécessitent de déterminer une expression de l'énergie d'interaction des atomes du système moléculaire en fonction de leurs positions relatives. Les méthodes de modélisation moléculaire reposent principalement sur deux approches différentes, la mécanique quantique et la mécanique moléculaire, pour calculer l'énergie du système. Dans le cas de ce travail de thèse, la mécanique moléculaire a principalement été employée.

### 3.1. Mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire est une approche qui permet l'analyse conformationnelle d'un système. Cette approche repose sur les principes de la mécanique classique où l'énergie d'interaction d'un système est calculée en fonction de la position des noyaux des atomes tout en ignorant le mouvement des électrons. Dans ce cas, les atomes sont assimilés à des points massiques (éventuellement chargés) et les liaisons chimiques à des ressorts mécaniques. Cette approche de la modélisation moléculaire utilise les champs de forces empiriques et la minimisation d'énergie.

La mécanique moléculaire permet de décrire l'énergie en fonction des coordonnées atomiques et de rechercher des minima d'énergie qui correspondent à des conformères stables.

#### 3.1.1. Champs de force

Cette approche est basée sur l'utilisation d'une fonction d'énergie potentielle empirique  $E_{\text{tot}}$ . Elle est définie empiriquement comme la somme des différentes contributions qui traduisent les interactions physiques inter- et intramoléculaires du système étudié. Elle est décrite (Tableau ) en termes internes reliés directement aux liaisons covalentes entre les atomes (interactions liantes,  $E_{\text{liantes}}$ ) et en termes externes correspondant aux interactions non covalentes (interactions non liantes,  $E_{\text{non liantes}}$ ). Les paramètres structuraux nécessaires à la modélisation sont regroupés dans des champs de forces. Chaque champ de force regroupe

l'ensemble des constantes de force et les coefficients d'interactions pour les forces s'exerçant. Le choix du champ de force s'effectue en fonction de la nature des molécules étudiées (acides aminés, acides nucléiques, sucres, ...) et du programme utilisé pour modéliser. Les modèles de la MSDH de *Bacillus subtilis* ont été générés en utilisant la suite de programmes Amber (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), version 8 (Case *et al.*, 2004) avec le champ de force *ff94* du programme.

L'énergie électrostatique est calculée pour chaque paire d'atomes ( $i, j$ ) possible du système, ce qui est extrêmement coûteux en terme de temps de calcul. Le nombre de ces interactions est diminué en ayant recours à une approximation qui indique qu'au-delà d'une certaine distance, les interactions non liantes ne sont plus prises en compte dans le calcul. Une sphère d'interaction est alors déterminée autour de chaque atome. Elle est définie par son rayon appelé rayon de coupure,  $r_{off}$ , ou de troncature, ou encore « *cut-off* ».

### 3.1.2. Calcul des charges atomiques

La suite de programmes AMBER 8 est dotée de bibliothèques dans lesquelles les charges atomiques des résidus amino-acyles sont répertoriées. L'étape préliminaire de détermination des charges atomiques est uniquement nécessaire lors de la modélisation moléculaire de molécules non peptidiques ou de résidus modifiés par liaisons covalentes. Les charges atomiques dépendent de la conformation de la molécule considérée. AMBER 8 utilise les charges RESP (*Restrained ElectroStatic Potential*) qui tiennent compte de la mobilité conformationnelle de la molécule. Les charges atomiques RESP sont calculées à partir du potentiel électrostatique de chaque conformère. Le potentiel électrostatique est calculé au niveau Hartree-Fock/6-31G\* avec les mots clés `pop=mk` et `iop(6/33)=2` par le programme Gaussian 98 (Frish *et al.*, 1998).

### 3.1.3. Minimisation

Pour un système à  $N$  atomes, l'énergie potentielle est une fonction de  $3N$  coordonnées cartésiennes ou de  $3N-6$  coordonnées internes.

La fonction d'énergie potentielle présente de nombreux maxima, minima locaux et un seul minimum global. Ces énergies minimales correspondent à des arrangements du système qui traduisent des états stables du système. La recherche des minima est effectuée par des algorithmes de minimisation. Ces algorithmes changent graduellement les coordonnées des atomes du système pour amener progressivement celui-ci dans une conformation dont l'énergie potentielle correspond à un minimum d'énergie local. Les deux algorithmes utilisés successivement dans ce travail sont « *Steepest descent* » et le gradient conjugué. La méthode qui utilise l'algorithme du « *Steepest descent* » (la plus grande pente) converge difficilement

vers un minimum d'énergie. Elle est principalement employée pour « éliminer » les mauvais contacts stériques (interpénétration des rayons de van der Waals entre atomes). La méthode du gradient conjugué permet ensuite de converger plus aisément vers un minimum local d'énergie.

Pour tendre vers le minimum global, de l'énergie doit être apportée au système afin que celui-ci franchisse les barrières énergétiques. Cette énergie est apportée en chauffant le système de façon progressive ; c'est la dynamique moléculaire. Les travaux de dynamique entrepris dans le cadre de cette étude ne sont pas présentés dans ce mémoire de thèse.

Energies	Descriptions		
<b>Totale</b>	$E_{tot} = E_{liantes} + E_{non\ liantes}$		
<b>Liantes</b>	$E_{liantes} = E_{liaisons} + E_{valences} + E_{impropres} + E_{dièdres}$		
Liaisons	$E_{liaisons}$	$E_l = \sum_{liaisons} k_b (l - l_0)^2$	$l$ : longueur de la liaison $l_0$ : longueur de la liaison à l'équilibre $k_b$ : constante de force
Angles de valences	$E_{valences}$	$E_\theta = \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$	$\theta$ : angle de valence $\theta_0$ : angle de valence à l'équilibre $k_\theta$ : constante de force
Angles impropres	$E_{impropres}$	$E_\omega = \sum_{impropres} k_\omega (\omega - \omega_0)^2$	$\omega$ : angle impropre $\omega_0$ : angle impropre à l'équilibre $k_\omega$ : constante de force
Angles dièdres	$E_{dièdres}$	$E_\phi = \sum_{dièdres} k_\phi^n (1 + \cos(n\phi - \delta))$	$\phi$ : angle dièdre $\delta$ : phase $n$ : périodicité $k_\phi$ : barrière de torsion
<b>Non liantes</b>	$E_{non\ liantes} = E_c + E_{vdW}$		
Electrostatique ou de Coulomb	$E_c$	$E_c = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$	$q_i$ et $q_j$ : charges partielles des atomes $i$ et $j$ . $\epsilon$ : constante diélectrique du milieu
van der Waals	$E_{vdW}$	$E_{vdW} = \sum_{i < j} e_{ij} \left[ -2 \left( \frac{R_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 + \left( \frac{R_{ij}}{d_{ij}} \right)^{12} \right]$	$e_{ij}$ : valeur du puits du potentiel de Lennard et Jones au niveau de $R_{ij}$ . $R_{ij}$ : distance d'interaction entre les atomes $i, j$ pour laquelle l'énergie est minimale $d_{ij}$ : distance entre les atomes $i, j$

**Tableau II.15 :** Description des énergies moléculaires qui composent l'énergie potentiel totale. Dans l'énergie de van der Waals,  $-R_{ij}6$  représente la dispersion attractive de London, tandis que le terme  $R_{ij}12$  correspond à la répulsion due à l'exclusion de Pauli. Le calcul de l'énergie moléculaire est propre à chaque champs de force.

# *Résultats*

# Sommaire

<b>1. CRISTALLOGENESE .....</b>	<b>66</b>
1.1. DONNEES PRELIMINAIRES .....	66
1.1.1. Propriétés de la méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de <i>Bacillus subtilis</i> .....	66
1.1.1.1. Propriétés physicochimiques .....	66
1.1.1.2. Propriétés enzymatiques .....	67
1.1.2. Etude bibliographique des conditions de cristallisation des enzymes de la famille des aldéhyde deshydrogénases .....	67
1.2. RECHERCHE DES CONDITIONS DE CRISTALLISATION .....	68
1.2.1. Préparation de la protéine pour la cristallisation .....	68
1.2.2. Détermination des conditions de cristallisation.....	70
1.2.2.1. Les matrices de criblage.....	70
1.2.2.2. Détermination de l'état et de la concentration de l'échantillon protéique pour la cristallisation..	70
1.2.3. Affinement des conditions de cristallisation .....	71
1.2.3.1. Méthode de la diffusion de vapeur.....	71
1.2.3.2. Méthode « batch ».....	71
1.2.3.3. Description des cristaux obtenus.....	72
1.2.4. Cristallisations en vue de l'obtention de complexes de la <i>Bs_MSDH</i> .....	73
<b>2. LES STRUCTURES DETERMINEES .....</b>	<b>74</b>
2.1. JEUX DE DONNEES.....	74
2.1.1. Collecte des jeux de données .....	74
2.1.2. Les jeux de données collectés .....	75
2.2. DETERMINATION DES STRUCTURES.....	76
2.2.1. La première structure de l'holoenzyme.....	76
2.2.1.1. Résolution de la structure.....	76
2.2.1.2. Affinement de la structure de l'holoenzyme .....	77
2.2.2. Résolution et affinement des structures CoA et CoA-NAD et <i>Mmsa-1</i> .....	78
2.3. STRUCTURE DE L'HOLOENZYME HOLO-2.....	79
2.3.1. Le monomère .....	81
2.3.1.1. Le domaine de fixation du cofacteur.....	82
2.3.1.2. Le domaine catalytique.....	82
2.3.1.3. Le domaine d'oligomérisation .....	83
2.3.1.4. Organisation spatiale des trois domaines .....	83
2.3.2. L'association oligomérique .....	83
2.3.3. Les sites importants.....	85
2.3.3.1. Le site de fixation du cofacteur NAD <sup>+</sup> .....	85
2.3.3.2. Le site actif .....	86
2.4. STRUCTURE DE L'ACYLENZYME (MMSA-1) .....	88
2.4.1. Généralités .....	88
2.4.2. Particularités de la structure <i>Mmsa-1</i> .....	89
2.4.2.1. Le site de fixation du cofacteur.....	89
2.4.2.2. Le site actif .....	90
2.5. STRUCTURE DU COMPLEXE COA-NAD.....	92
2.5.1. Généralités .....	92
2.5.2. Particularité de la structure CoA-NAD .....	93
2.5.2.1. Le site de fixation du cofacteur.....	93
2.5.2.2. Le site de fixation du CoA.....	93
2.6. STRUCTURE DU COMPLEXE COA .....	96
2.6.1. Les particularités de la structure CoA.....	97
2.6.1.1. Le site de fixation du NAD <sup>+</sup> .....	97
2.6.1.2. Le site de fixation du CoA.....	97
<b>3. MODELISATION MOLECULAIRE.....</b>	<b>98</b>
3.1. OBJECTIF DE LA MODELISATION MOLECULAIRE .....	98
3.2. MODELISATION DES INTERMEDIAIRES R- ET S- .....	99
3.2.1. Préparation en vue de la modélisation.....	99
3.2.2. Minimisation des modèles .....	100
3.2.2.1. La procédure de minimisation.....	100
3.2.2.2. Modèles obtenus par la modélisation moléculaire .....	100
<b>4. ALIGNEMENT DE STRUCTURES PRIMAIRES .....</b>	<b>101</b>

# 1. Cristallogénèse

## 1.1. Données préliminaires

### 1.1.1. Propriétés de la méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis*

Les conditions de production et de purification de la méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis* (*Bs\_MSDH*) ont été publiées en 2004 (Dubourg *et al.*, 2004), tandis que l'étude des propriétés catalytiques de cette enzyme a été publiée en 2006 (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Le paragraphe 1.1.1 résume les propriétés physicochimiques et enzymatiques déterminées par Claire Stines-Chaumeil de 2001 à 2005 (travail de DEA et thèse).

#### 1.1.1.1. Propriétés physicochimiques

La *Bs\_MSDH* est une enzyme homotétramérique de 213800 Da de masse moléculaire dont chaque monomère est composé de 488 résidus aminoacyles (Figures ). Elle présente un *pI* théorique d'une valeur de 5,16 et reste stable dans une gamme de pH comprise entre les valeurs 5,0 et 9,5. Son coefficient d'absorption molaire est de 204000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> par tétramère.

MAEIRKLKNY	INGEVVESKT	DQYEDVVNPA	TKEVLCQVPI	STKEDIDYAA	QTAAEAFKTW
SKVAVPRRAR	ILFNFQQLLS	QHKEELAHLI	TIENGKNTKE	ALGEVGRGIE	NVEFAAGAPS
LMMGDSLASI	ATDVEAANYR	YPIGVVGGIA	PFNFPMMVPC	WMFPMAIALG	NTFILKPSER
TPLLTEKLVE	LFEKAGLPKG	VFNVVYGAHD	VVNGILEHPE	IKAISFVGSK	PVGEYVYKKG
SENLRVQSL	TGAKNHTIVL	NDANLEDTV	NIVGAAFGSA	GERCMACAVV	TVEEGIADEF
MAKLQEKVAD	IKIGNGLDDG	VFLGPVIRE	NKKRTLSEIE	KGLEEGARLV	CDGRENVSD
GYFVGPTIFD	NVTTEMTIWK	DEIFAPVLSV	IRVKNLKEAI	EIANKSEFAN	GACLFSTNSN
AIRYFRENID	AGMLGINLGV	PAPMAFFPFS	GWKSSFFGTL	HANGKDSVDF	YTRKKVVTAR
YPAPDFN					

**Figures III.1 :** Structure primaire de la *Bs\_MSDH*.

La structure primaire de *Bs\_MSDH* est constituée de 488 résidus aminoacyles.

L'enzyme est purifiée dans un tampon de phosphate de potassium (KPi) à 50 mM et à pH de 8,2 contenant 10 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol. En fonction du lot de purification, 0 à 10% de molécules de NAD<sup>+</sup> sont fixées sur la *Bs\_MSDH*. L'enzyme est conservée à -80°C après précipitation dans une solution saturée à 90% de sulfate d'ammonium. *Bs\_MSDH* présente un rapport densité optique (DO) à 280 nm sur DO à 260 nm d'environ 1,72.

### 1.1.1.2. Propriétés enzymatiques

La détermination de l'activité enzymatique de la *Bs*\_MSDH nécessite une incubation préalable de l'enzyme à une concentration d'environ 20  $\mu$ M, pendant 30 min à 37°C dans le tampon KPi (50 mM et pH 8,2) additionné de 2mM de NAD<sup>+</sup>. L'activité enzymatique est mesurée par suivi de l'absorbance à 340 nm de longueur d'onde. Cette mesure est réalisée à 30°C avec une concentration de 2  $\mu$ M en enzyme (incubée), dans le tampon KPi (50mM et pH 8,2) supplémenté en MMSA à 500  $\mu$ M ou en MSA à 1 mM, en CoA à 500  $\mu$ M et en NAD<sup>+</sup> à 2 mM. Les propriétés cinétiques à l'état stationnaire de la *Bs*\_MSDH sont regroupées dans le Tableau III.2.

$K_M$ MSA (mM)	$K_M$ NAD <sup>+</sup> (mM)	$K_M$ CoA (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
0,12 ± 0,01	1,78 ± 0,39	0,03 ± 0,01	7,4 ± 0,3
$K_M$ MMSA (mM)	$K_M$ NAD <sup>+</sup> (mM)	$K_M$ CoA (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
0,06 ± 0,01	2,30 ± 0,06	0,12 ± 0,02	1,1 ± 0,1

**Tableau III.2 :** Paramètres cinétiques à l'état stationnaire de la *Bs*\_MSDH (Claire Chaumeil, 2005)

Les paramètres cinétiques ont été réduits à partir des jeux de données expérimentales par régression linéaire suivant le modèle de Michaelis-Menten ; les valeurs de  $k_{cat}$  (constante de vitesse de la réaction) sont exprimées par sous-unité (en considérant quatre sous-unités actives par tétramères). MSA pour malonate semialdéhyde et MMSA pour méthylmalonate semialdéhyde.

### 1.1.2. Etude bibliographique des conditions de cristallisation des enzymes de la famille des aldéhyde deshydrogénases

Au départ de l'étude de la *Bs*\_MSDH, la PDB n'avait pas recensé de structure de CoA-ALDH et la littérature ne faisait mention d'aucune condition de cristallisation de MSDH ou de CoA-ALDH. A cette période, quatorze structures de sept ALDHs distinctes avaient été déterminées et publiées. Les cristaux de ces 14 enzymes ont été obtenus par emploi de polyéthylène glycol ou de sulfate d'ammonium comme agent cristallisant (Tableau III.3). Ces conditions de cristallisation ont servi de support pour l'établissement de matrices de criblage employées pour rechercher les conditions de cristallisation de la *Bs*\_MSDH (voir paragraphe 1.2).

Enzymes	Organismes	Localisation cellulaire (organe)	Codes PDB	Dates*	Agents cristallisants	Références
ALDH3	rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	cytoplasme (foie)	1ad3	1996	PEG-8000	Rose <i>et al.</i> , 1990
ALDH2	bovin ( <i>Bos taurus</i> )	mitochondries (foie)	1ag8	1997	PEG-8000	Steinmetz <i>et al.</i> , 1997
			1a4z	1998		
RALDH	rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	cytoplasme (embryon)	1bi9	1998	S.A. Ethylène glycol	Lamb <i>et Newcomer</i> , 1999
ALDH1	mouton ( <i>Ovis aries</i> )	cytoplasme (foie)	1bxs	1998	PEG-5000	Moore <i>et al.</i> , 1998
ALDH2	humain ( <i>Homo sapiens</i> )	mitochondries (foie)	1cw3	1999	PEG-6000	Ni <i>et al.</i> , 1999
			1o05	2003	PEG-6000 MgCl <sub>2</sub>	Hurley <i>et al.</i> , 2001
BADH (bétaine)	morue ( <i>Gadus Calliaras</i> )	cytoplasme (foie)	1a4s	1998	PEG-4000	Johansson <i>et al.</i> , 1998
			1bpw	1998		
GAPN	<i>Streptococcus mutans</i>	cytoplasme	1euh	1998	S.A.	Cobessi <i>et al.</i> , 1999
			2euh	1998		
			1qi1	1999	S.A.	Cobessi <i>et al.</i> , 2000
			1qi6	1999		
ALDH	<i>Vibrio harveyi</i>	cytoplasme	1eyy	2000	PEG-8000	Ahvazi <i>et al.</i> , 2000
			1ez0	2000		

**Tableau III.3 :** Tableau récapitulatif des agents cristallisants employés pour cristalliser les ALDHs au départ de l'étude de la *Bs\_MSDH* (2001).

\* date de dépôt des coordonnées et des facteurs de structures de chaque structure d'ALDH dans la Protein Data Bank.

PEG pour polyéthylène glycol, PEG-8000 pour du PEG de 8000 g.mol<sup>-1</sup> de masse moléculaire (idem pour PEG-4000, PEG-5000 et PEG-6000). S.A. pour sulfate d'ammonium.

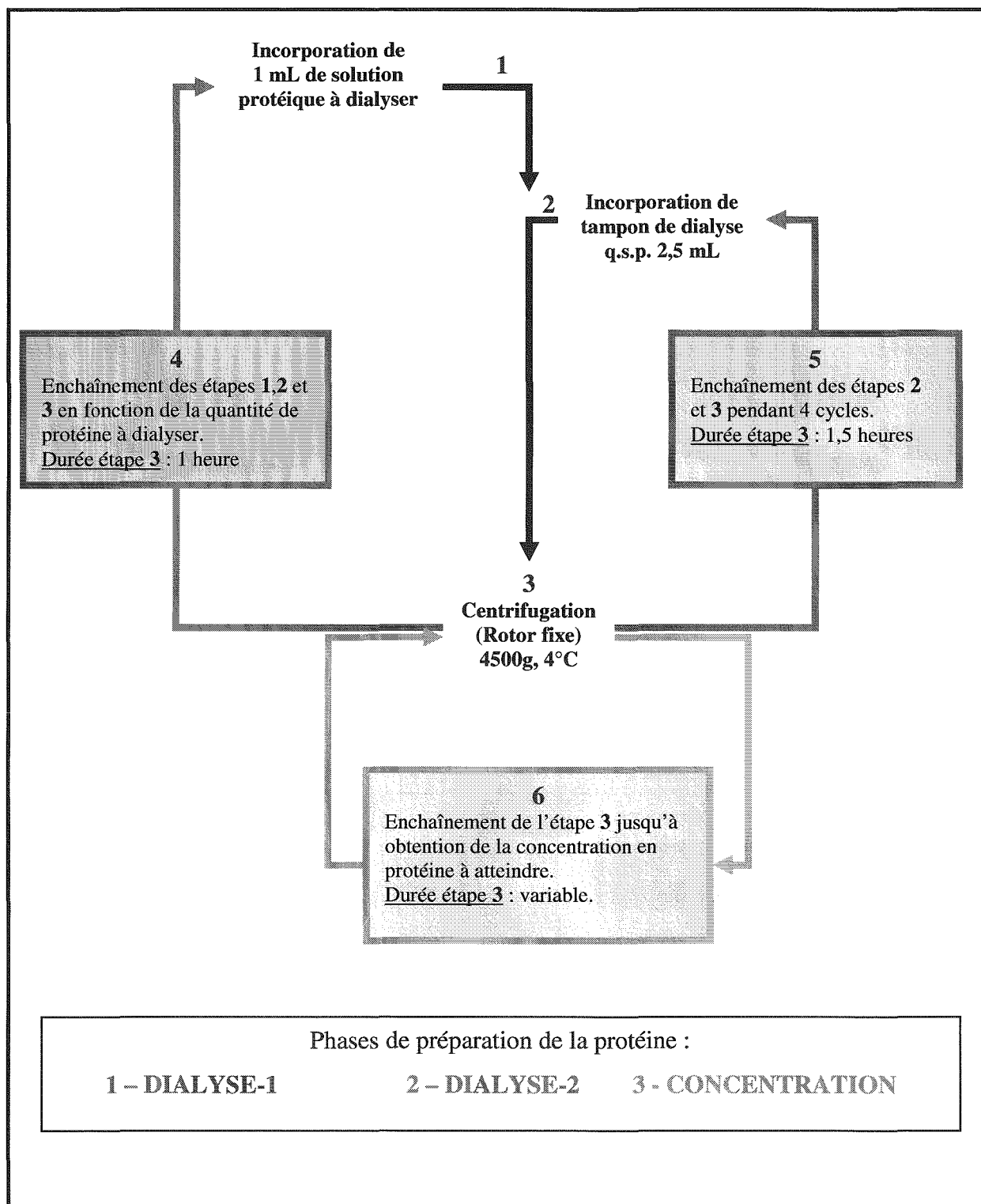
## 1.2. Recherche des conditions de cristallisation

### 1.2.1. Préparation de la protéine pour la cristallisation

La protéine est préalablement dialysée contre le tampon de purification (50mM de KPi et pH8,2 ; 1 mM de DTT ; 1 mM EDTA). Au sortir de la dialyse en boudin, la protéine s'est avérée être instable et par conséquent inapte à la cristallisation. La cellule à filtre a été retenue pour dialyser et concentrer la *Bs\_MSDH*. Aussi, la protéine est préparée en vue de la cristallisation au moyen de cellules à filtre selon le protocole décrit dans le schéma III.4.

La qualité de l'échantillon protéique préparé est ensuite estimée par mesure de l'activité enzymatique selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.1.1.2.





**Schéma III.4 :** Protocole de préparation de la *Bs\_MSDH*.

La *Bs\_MSDH* est préparée en trois phases successives : dialyse, rinçage et concentration. La phase de dialyse-1 a pour but de retirer une partie du sulfate d'ammonium (SA) et surtout de rassembler tous les aliquots de protéine utilisés. La phase de dialyse-2 est en fait une phase de dialyse plus poussée au bout de laquelle il ne doit plus rester de SA. La dernière phase consiste en une succession de cycles de centrifugation, allant de 1,5 heures à 30 minutes, qui vont permettre de concentrer la protéine. q.s.p signifie quantité suffisante pour atteindre, ici un volume de 2,5 mL.

## 1.2.2. Détermination des conditions de cristallisation

### 1.2.2.1. Les matrices de criblage

La recherche de conditions de cristallisation de la *Bs\_MSDH* a été réalisée en employant la méthode de la diffusion de vapeur par la technique de la goutte suspendue.

Les matrices de criblage commerciales suivantes ont été employées pour détecter des conditions de cristallisation de la *Bs\_MSDH* : « Crystal Screen™ 1 & 2 » de Hampton Research et, « Clear Strategy Screen™ I & II » de Molecular Dimensions Limited. Des matrices de criblage de conception personnelle ont été utilisées en parallèle, afin d'augmenter le panel des conditions de cristallisation. L'étude bibliographique (paragraphe 1.1.2.) avait révélé deux agents cristallisants potentiels : polyéthylène glycol (PEG) et sulfate d'ammonium. Ces deux agents, seuls ou combinés, ont été utilisés pour concevoir des matrices de criblage. La solubilité du PEG varie en fonction du pH, ce qui explique que la matrice de criblage à base de PEG ait uniquement été réalisée dans le tampon phosphate KPi (50 mM) à pH 8,2 (tampon de conservation de la *Bs\_MSDH*). Pour une même masse moléculaire, le pourcentage de PEG en solution a été modulé. La matrice de criblage à base de SA (2,1 à 2,5 M) a été réalisée dans une gamme de pH étendue grâce à l'emploi de plusieurs solutions tampon. Pour la même raison que la matrice de criblage à base de PEG, la matrice de criblage qui allie les deux agents cristallisants a été réalisée dans le tampon phosphate pH 8,2. Au total, trois matrices de criblage ont été conçues pour rechercher les conditions de cristallisation de la *Bs\_MSDH* (voir Tableaux II.3, II.4 et II.5 pages 53 dans le chapitre *Matériel & Méthodes*). Tous ces essais préliminaires ont été réalisés à trois températures différentes : 4, 12 et 20°C.

Les résultats probants ont été obtenus avec les conditions de cristallisation où le sulfate d'ammonium est l'agent cristallisant majeur.

### 1.2.2.2. Détermination de l'état et de la concentration de l'échantillon protéique pour la cristallisation

Les tests de recherche de conditions de cristallisation de la *Bs\_MSDH* ont débuté avec trois concentrations en protéine : 2,5 ; 5 et 10 mg.mL<sup>-1</sup>. L'absence de cristaux et de précipités à l'issue des premiers essais a conduit à réitérer les essais avec des concentrations supérieures en protéine. La concentration a été augmentée par palier de 20 mg.mL<sup>-1</sup> jusqu'à 80 mg.mL<sup>-1</sup>. La gamme 2,5 à 80 mg.mL<sup>-1</sup> correspond alors aux concentrations les plus couramment observées dans les conditions de cristallisation publiées.

Dans un premier temps, ces augmentations de la concentration en protéine n'ont eu aucun impact. Les essais ont alors été renouvelés en utilisant une *Bs\_MSDH* incubée 30 min à 37°C en présence de 20 mM NAD<sup>+</sup>. L'étape d'incubation est nécessaire pour l'obtention de cristaux, de taille de l'ordre du micromètre, dans les conditions de cristallisation à base de sulfate d'ammonium. Leur petite taille (cristaux quasi inobservables) semblait indiquer que la concentration en protéine était encore trop faible.

A la suite de ce constat, la limite de solubilité de la protéine a été recherchée par concentration poussée de cette dernière. Arrivée à 230 mg.mL<sup>-1</sup>, la concentration de la *Bs\_MSDH* a été stoppée par souci de préservation de la protéine. Les conditions à base de SA ont alors été testées avec des concentrations élevées en protéine : 100, 150, 175 et 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

La *Bs\_MSDH* cristallise à une concentration d'environ 200 mg.mL<sup>-1</sup> et après incubation dans 20 mM de NAD<sup>+</sup> (30 min à 37°C), dans une solution de cristallisation à base de sulfate d'ammonium à une concentration d'environ 2,0 M.

### 1.2.3. Affinement des conditions de cristallisation

#### 1.2.3.1. Méthode de la diffusion de vapeur

Le sulfate d'ammonium est l'agent cristallisant retenu pour cristalliser la *Bs\_MSDH*. Différentes matrices d'affinement ont été nouvellement conçues pour définir les conditions optimales de cristallisation de la *Bs\_MSDH*.

Les techniques de la goutte suspendue et de la goutte assise ont été testées lors de la phase d'affinement des conditions de cristallisation par la méthode de la diffusion de vapeur. Deux matrices de criblage ont été nécessaires pour définir les conditions de cristallisation de la *Bs\_MSDH* par la méthode de la diffusion de vapeur. La première matrice d'affinement a permis de définir la concentration de la protéine et la gamme de concentration en SA auxquelles cristallise la *Bs\_MSDH* (Tableau II.6 page 54 dans le chapitre *Matériel & Méthodes*). Les résultats de cette matrice indiquent que la technique de la goutte suspendue est la plus adaptée à ces conditions particulières de cristallisation où la goutte présente une viscosité importante. La deuxième matrice d'affinement (Tableau II.7 page 54 dans le chapitre *Matériel & Méthodes*) a révélé la condition de préparation de la solution de cristallisation et la température optimale de cristallisation.

Au final, la *Bs\_MSDH* donne des cristaux adaptés à l'étude par la diffraction des rayons X uniquement à 200 mg.mL<sup>-1</sup> après une incubation de 30 minutes à 37°C en présence d'environ 20 mM de NAD<sup>+</sup>, dans une gamme de concentration en sulfate d'ammonium non tamponnée allant de 1,8 M à 2,1 M (paliers de 0,1 M) et par la technique de la goutte suspendue à 20°C.

#### 1.2.3.2. Méthode « batch »

A la suite d'un stage effectué dans le cadre d'échanges européens avec le groupe de Biologie Structurale et de Cristallographie (Professeur Rolf Hingefeld) de l'Institut de Biotechnologie de Jena en Allemagne, une nouvelle condition de cristallisation de la *Bs\_MSDH* a été identifiée par la technique de micro-batch dans l'huile (paraffine). Durant ce séjour, de nouvelles matrices de criblage commerciales ont été testées : « Wizard Screens 1 & 2 » de Emerald Biostructures et « JBS Screens 1 to 10 » Jena BioScience. Cette technique s'est avérée être très productive (*Bs\_MSDH* et autres protéines) et moins consommatrice de

protéine et de solutions de cristallisation (quelques microlitres). Au retour de ce stage, la technique de micro-batch dans l'huile a été implantée au laboratoire afin d'affiner les conditions identifiées.

Par cette technique, des cristaux de *Bs\_MSDH* ont été obtenus à 20°C avec une protéine à une concentration de 150 mg.mL<sup>-1</sup>, toujours incubée dans 20 mM de NAD<sup>+</sup>, dans une solution de cristallisation contenant du sulfate d'ammonium à 3,0 M et du glycérol à 10 % V/V (en volume). L'affinement des conditions de cristallisation a conduit à changer les conditions d'incubation de la protéine. Dans ce cas, du glycérol à 5 % V/V est ajouté à la solution d'incubation de la *Bs\_MSDH* (150 mg.mL<sup>-1</sup>).

Au final, la *Bs\_MSDH* cristallise de façon optimale à 150 mg.mL<sup>-1</sup> après une incubation de 30 minutes à 37°C en présence d'environ 20 mM de NAD<sup>+</sup> et 5 % V/V de glycérol, dans une gamme de concentration en sulfate d'ammonium allant de 1,6 M à 3,1 M (paliers de 0,1 M) et par la technique de micro-batch.

### 1.2.3.3. Description des cristaux obtenus

Les propriétés des cristaux obtenus par les techniques de la goutte suspendue et du micro-batch sont résumées dans le Tableau .

Chronologiquement, les premiers cristaux ont été obtenus par la technique de la diffusion de vapeur, c'est-à-dire à une concentration de 200 mg.mL<sup>-1</sup> en *Bs\_MSDH* à environ 2,0 M de sulfate d'ammonium. Dans ces conditions, la goutte est très visqueuse et instable vis-à-vis de perturbations extérieures telles que la mise à l'air et l'introduction d'un outil de prélèvement de cristaux. Les cristaux obtenus sont en forme de plaques dont l'épaisseur est faible, rendant les cristaux très fragiles. Toute manipulation du cristal, comme la diffusion de molécules, est risquée et nécessite un grand nombre de cristaux avec un rendement très faible.

Les cristaux apparaissent au bout de 15 jours et le délai de prélèvement est alors de deux jours car l'état de la goutte est très instable. Au-delà, les gouttes et les cristaux évoluent vers un état inexploitable. Les cristaux prélevés sont ensuite conditionnés afin d'être conservés et prêts à être soumis aux rayons X. Les cristaux sont trempés dans une solution cryoprotectante composée à 80 % de la solution de cristallisation et à 20 % de glycérol, puis congelés dans de l'éthane liquide. Les cristaux congelés sont stockés dans un cryo-conteneur à azote liquide.

L'obtention d'une nouvelle forme cristalline par la technique de micro-batch parut salvatrice. La manipulation de ces cristaux en forme de bipyramides est nettement plus aisée. Les cristaux apparaissent au bout d'un mois et sont très stables dans le temps. Ils sont également congelés et conservés selon le protocole décrit ci-dessus.

Cristal	Techniques de cristallisation	
	goutte suspendue	μ-batch
Forme	plaque	bipyramide
Dimensions AxBxC (mm)	0,3 x 0,3 x 0,05	0,2 x 0,2 x 0,2
Stabilité	instable	stable

Tableau III.5 : Tableau récapitulatif des propriétés des cristaux de *Bs\_MSDH* obtenus.

### 1.2.4. Cristallisations en vue de l'obtention de complexes de la *Bs*\_MSDH

La *Bs*\_MSDH catalyse respectivement la conversion du malonate semialdéhyde et du méthylmalonate semialdéhyde en acétyl-CoA et propionyl-CoA en présence de  $\text{NAD}^+$  et de CoA. La détermination de la structure de complexes de la *Bs*\_MSDH avec ses partenaires réactionnels est une phase nécessaire pour la compréhension du mécanisme enzymatique au niveau moléculaire. Seule la détermination des structures des complexes permet de vérifier si les conditions utilisées étaient adéquates pour former les complexes attendus.

La procédure de préparation des solutions concentrées de  $\text{NAD}^+$  et de CoA a tout d'abord été similaire à celle employée lors des tests enzymologiques, c'est-à-dire mise en suspension dans l'eau distillée. Pour obtenir des concentrations finales de 20 mM en  $\text{NAD}^+$  et 40 mM en CoA dans la solution protéique, les solutions mères ont pour concentrations respectives 700 mM et 500 mM. A ces concentrations, les solutions sont très acides (inférieur à pH 4,0) et leurs introductions dans la solution protéique (concentration supérieure à 200  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) induisent la formation d'un précipité local réversible pour le  $\text{NAD}^+$  et irréversible pour le CoA. Pour remédier à ce problème, le  $\text{NAD}^+$  est mis en solution dans le tampon phosphate pH 8,2 de préparation de la protéine (50 mM KPi, 1mM DTT, 1 mM EDTA) et le pH est ajusté à environ 7,0 par ajout d'hydroxyde de potassium (KOH 10 M). La quantité de  $\text{NAD}^+$  est ensuite déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm et 340 nm. Le CoA est mis en solution dans la solution mère du tampon de préparation de la protéine, dix fois plus concentrée (KPi 500 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM). A titre de remarque, la concentration de la solution de CoA ne peut pas être contrôlée par simple mesure de spectroscopie UV.

Quelle que soit la méthode de cristallisation mise en œuvre, les cristaux de complexes ont été obtenus selon le même protocole. Le Tableau recense tous les essais de formation de complexes. Les cristaux de complexes enzyme/ $\text{NAD}^+$  ou enzyme/CoA ont été obtenus en utilisant les conditions de cristallisation mentionnées ci-dessus (paragraphe 1.2.3.) après incubation de l'enzyme en présence respectivement de 20 mM  $\text{NAD}^+$  et 40 mM de CoA. Les cristaux du complexe enzyme/ $\text{NAD}^+$ /CoA ont été obtenus selon le même protocole, c'est-à-dire par incubation préalable de l'enzyme avec à la fois 20 mM  $\text{NAD}^+$  et 40 mM de CoA. Les complexes mettant en jeu les substrats\* et les produits† de la réaction ont été obtenus par diffusion de ces derniers dans les cristaux du complexe enzyme/ $\text{NAD}^+$ .

\* Substrats : malonate semialdéhyde (MSA) et méthylmalonate semialdéhyde (MMSA).

† Produits : acétyl-CoA (AcCoA) et propionyl-CoA (PPCoA).

Cristaux	Description des complexes			
	Cofacteur 1	Cofacteur 2	Substrats	Produits
1	NAD <sup>+</sup>			
2	NAD <sup>+</sup>	CoA		
3		CoA		
4	NAD <sup>+</sup>		MMSA	
5	NAD <sup>+</sup>			PPCoA

**Tableau III.6 :** Tableau récapitulatif des essais de formation de complexes.

Le CoA introduit a été au préalable mis en solution dans le tampon phosphate KPi, 500 mM et pH 8,2. Le pH de la solution de CoA a été ajusté à une valeur d'environ 7,0 avant d'être mis en contact avec la protéine.

## 2. Les structures déterminées

### 2.1. Jeux de données

#### 2.1.1. Collecte des jeux de données

Les collectes de jeux de données sont effectuées à 100 K pour diminuer les altérations du cristal par le rayonnement X. Afin d'éviter les problèmes consécutifs à la congélation de l'eau, les cristaux ont été préalablement plongés dans une solution de conservation cryogénique pendant 30 secondes. Cette solution est composée à 80 % V/V de solution de cristallisation et 20% V/V de glycérol.

Toutes les collectes ont été effectuées sur des lignes de lumière de synchrotron. Aucune tâche de diffraction n'a pu être observée lors de l'utilisation du diffractomètre du laboratoire. Les données de diffraction ont été obtenues par la méthode d'oscillation qui consiste à faire tourner graduellement le cristal par pas d'oscillation de 0,2° ou 1° (en fonction du cristal) selon un seul axe. Tous les jeux collectés sont complets et de ce fait potentiellement exploitables avec une complétude supérieure à 98 %. Les cristaux en forme de bipyramide ont une limite de résolution de 1,9 Å tandis que les cristaux en forme de plaque diffractent au maximum à 2,5 Å de résolution. Toutes les structures résolues présentent un tétramère par unité asymétrique à l'exception de la structure CoA-NAD qui a deux tétramères par unité asymétrique.

### 2.1.2. Les jeux de données collectés

Tous les jeux de données collectés sont répertoriés et décrits dans le Tableau . Seuls les jeux de données collectés à partir de cristaux en forme de plaque ont pu être exploités.

	Structures		
	Holo-1	Holo-2	Holo-3*
Lieu	ESRF FIP	EMBL	EMBL
Détecteur	MAR CCD 165mm	MAR CCD 165mm	MAR CCD 165mm
Longueur d'onde (Å)	1,0093	0,8126	0,8110
Pas d'oscillation (°)	1,0	0,5	1,0
Gamme d'oscillation (°)	180	180	180
Logiciel	XDS	XDS	HKLsuite
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	R32
a (Å)	194,98	195,24	108,68
b (Å)	192,29	192,58	108,68
c (Å)	83,39	83,56	153,13
β (°)	90	90	90
Gamme de résolution (Å)	30,0-2,8 (2,9-2,8)	20,0-2,5 (2,57-2,5)	60,0-1,9 (1,97-1,9)
Nb. de réflexions mesurées	497047	786249	284428
Nb. de réflexions uniques	76875	108345	27601
Redondance	6,4	7,25	10,3
Complétude (%)	98,9 (90,0)	99,5 (91,9)	100 (100)
<I/σ(I)>	10,5 (2,9)	9,39 (3,58)	35,6 (2,4)
R <sub>merge</sub> (%)	12,5 (39,0)	13,8 (37,2)	6,9 (52,9)
	Structures		
	Mmsa-1	Mmsa-2*	Prop*
Lieu	EMBL	EMBL	EMBL
Détecteur	MAR CCD 165mm	MAR CCD 165mm	MAR CCD 165mm
Longueur d'onde (Å)	1,240	0,8110	0,8110
Pas d'oscillation (°)	0,5	1,0	1,0
Gamme d'oscillation (°)	125	180	180
Logiciel	XDS-SCALA	HKLsuite	HKLsuite
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2	C2
a (Å)	196,1	187,88	189,16
b (Å)	192,1	108,46	109,01
c (Å)	83,4	120,13	118,77
β (°)	90	121,42	122,04
Gamme de résolution (Å)	20,0-2,9 (3,06-2,90)	60,0-3,0 (3,11-3,0)	30,0-2,8 (2,9-2,8)
Nb. de réflexions mesurées	344573	156812	192297
Nb. de réflexions uniques	70205	40397	49307
Redondance	4,9	3,9	3,9
Complétude (%)	99,4 (99,1)	99,4 (99,2)	99,4 (99,1)
<I/σ(I)>	9,7 (3,3)	13,6 (4,6)	13,91 (2,8)
R <sub>merge</sub> (%)	14,2 (41,0)	8,0 (19,0)	9,0 (23,0)

	Structures	
	CoA	CoA-NAD <sup>+</sup>
Lieu	EMBL	EMBL
Détecteur	MAR CCD 165mm	MAR CCD 165mm
Longueur d'onde (Å)	1,240	0,8123
Pas d'oscillation (°)	0,5	0,2
Gamme d'oscillation (°)	150	168
Logiciel	XDS-SCALA	XDS-SCALA
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
a (Å)	195,5	192,36
b (Å)	192,3	83,25
c (Å)	83,32	194,95
β (°)	90	92,46
Gamme de résolution (Å)	20,0-2,7 (2,85-2,70)	20,0-2,5 (2,63-2,50)
Nb. de réflexions mesurées	531742	708782
Nb. de réflexions uniques	86543	213590
Redondance	6,1	3,3
Complétude (%)	99,5 (98,5)	98,4 (92,7)
<I/σ(I)>	7,8 (3,4)	9,2 (3,8)
R <sub>merge</sub> (%)	19,8 (50,3)	9,7 (26,6)

**Tableau III.7 :** Tableaux des collectes de données.

Holo-1 et Holo-2 désignent deux collectes de données effectuées sur des cristaux en forme de plaque de *Bs*\_MSDH cocrystallisée avec du NAD<sup>+</sup>, tandis que Holo-3 correspond à une collecte de données réalisée à partir d'un cristal en forme de bipyramide de la protéine également co-cristallisée avec du NAD<sup>+</sup>. Les collectes de données dont le nom est marqué par un « \* » correspondent à des collectes réalisées sur des cristaux en forme de bipyramides. Pour la définition des termes, se conférer au chapitre « Matériel et Méthodes ». Le terme « Nb » est employé pour désigner le mot « nombre ».

## 2.2. Détermination des structures

### 2.2.1. La première structure de l'holoenzyme

#### 2.2.1.1. Résolution de la structure

La *Bs*\_MSDH présente environ 33 % d'identité de structure primaire avec les ALDHs tétramériques (Tableau ). De par ce pourcentage d'identité, la méthode du remplacement moléculaire a tout d'abord été employée, mais elle s'est avérée être suffisante pour obtenir la structure. Le premier jeu de données, Holo-1 (2,8 Å de limite de résolution), enregistré à l'ESRF de Grenoble (Tableau ) a permis de trouver la solution de remplacement moléculaire. Toutes les structures d'ALDH tétramériques disponibles dans la PDB ont été testées pour réaliser le remplacement moléculaire. Au moyen du logiciel CNS (Brünger, 1998), la recherche de la fonction de rotation croisée suivie par celle de la fonction de translation ont été réalisées dans la gamme de résolution 10 à 4 Å. La structure de la bêtaïne aldéhyde



deshydrogénase de foie de morue, sous sa forme holoenzyme, (Johansson *et al.*, 1998 ; code PDB 1bpw) est la structure qui a donné la meilleure solution (Tableau ).

ALDHs	Organismes	Code PDB	Pourcentage d'identité*	Facteurs de corrélation	Références
BADH	<i>Gadus calliarias</i>	1bpw	32 %	0,342	Johansson <i>et al.</i> , 1998
ALDH2	<i>Bos taurus</i>	1a4z	32 %	0,319	Steinmetz <i>et al.</i> , 1997
RALDH	<i>Rattus norvegicus</i>	1bi9	34 %	0,314	Lamb <i>et Newcover</i> , 1999
GAPN	<i>Streptococcus mutans</i>	1euh	34 %	0,301	Cobessi <i>et al.</i> , 1999
ALDH1	<i>Ovis aries</i>	1bxs	33 %	0,292	Moore <i>et al.</i> , 1998

**Tableau III.8 :** Tableau des structures d'ALDHs testées pour résoudre la structure par remplacement moléculaire.  
\* pourcentage d'identité de structure primaire.  
Les tests de remplacement moléculaire ont été effectués avec le programme CNS (Brünger *et al.*, 1998).

La procédure de résolution de la structure de la *Bs*\_MSDH sous sa forme holoenzyme a été publiée en 2004 (publication insérée à la fin du manuscrit).

### 2.2.1.2. Affinement de la structure de l'holoenzyme

Avec une limite de résolution à 2,5 Å, le deuxième jeu de données, Holo-2, collecté à l'EMBL de Hambourg a été utilisé pour affiner la structure de l'holoenzyme. L'affinement de la structure Holo-2 a été effectué avec la suite de programmes du logiciel CNS (Brünger, 1998) dans la gamme de résolution 20,0 à 2,5 Å avec 54,2 % de  $R_{crist}$  et  $R_{free}$  (facteurs d'accord de départ). La méthode du recuit-simulé en mode torsion (angles de torsion affinés) a été utilisée pour débiter l'affinement (« anneal » ; Brünger *et al.*, 1987 ; Brünger *et al.*, 1990 ; Brünger, 1992 ; Rice *et Brünger*, 1994 ; Pannu *et Read*, 1996 ; Adams *et al.*, 1997). Cet affinement de dynamique moléculaire a convergé après plusieurs tentatives et uniquement en utilisant une protéine composée seulement de résidus alanyl (polyalanine). Le système est initialement placé à une température de 2500 K puis refroidi progressivement de 25 K par minute. A l'issue de cet affinement les facteurs d'accord  $R_{crist}$  et  $R_{free}$  ont pour valeur respective 44,7 % et 47,6 %.

Les résidus aminoacyls de la *Bs*\_MSDH ont été replacés manuellement à partir des cartes de densité électronique  $2fo-fc$  et  $fo-fc$ . Plusieurs cycles, de reconstruction graphique et d'affinement par minimisation (Brünger, 1992 ; Pannu *et Read*, 1996 ; Adams *et al.*, 1997), ont été nécessaires pour placer l'ensemble des résidus aminoacyls. Seuls les deux premiers résidus aminoacyls de l'extrémité N-terminale (Met1, Ala2) et le dernier de l'extrémité C-terminale (Asn487) n'ont pu être modélisés pour cause d'absence de densité électronique. Ensuite, de nombreuses boucles de la structure ont fait l'objet d'une reconstruction manuelle.

La carte de densité électronique résiduelle ( $fo-fc$ ) a révélé la présence de  $\text{NAD}^+$  dans les quatre monomères. Les bibliothèques de topologie et de paramètres du  $\text{NAD}^+$  (Kleywegt *et al.*, 1998 ; Kleywegt *et al.*, 2003) ont dû être adaptées à la conformation rencontrée du cofacteur. Les quatre molécules de  $\text{NAD}^+$  ont été affinées avec un taux d'occupation d'une valeur de 1,0. Les molécules d'eau ont été modélisées manuellement. Les statistiques d'affinement final et celles du diagramme de Ramachandran sont présentées dans le Tableau . Les coordonnées de l'holoenzyme sont disponibles dans la PDB sous le code 1t90.

		Structure Holo-2			
Facteurs d'accord					
$R_{\text{cris}} (\%)$		21,1			
$R_{\text{free}} (\%)$		25,0 (5%)			
Géométrie (r.m.s.d) :					
Longueur des liaisons (Å)		0,006			
Angles de valence (°)		1,3			
Angles dièdres (°)		22,9			
Angles impropres (°)		0,83			
B moyen (Å <sup>2</sup> )					
Protéine		30,1			
NAD+		34,2			
Molécules d'eau		35,3			
Ramachandran		A	B	C	D
Régions favorables (%)		88,8	89,8	90,7	90,0
Régions additionnelles (%)		10,2	9,3	8,6	9,0
Régions permises (%)		1,0	1,0	0,7	1,0
Régions défavorables (%)		0,0	0,0	0,0	0,0

**Tableau III.9 :** Statistiques d'affinement et du diagramme de Ramachandran du modèle de la structure Holo-2 finale.

Pour le facteur d'accord  $R_{\text{free}}$ , la valeur entre parenthèse correspond au pourcentage de données utilisées comme contrôle l'évaluation du modèle. Le terme « B » est l'abréviation utilisée pour facteur isotrope de déplacement atomique.

### 2.2.2. Résolution et affinement des structures CoA et CoA-NAD et Mmsa-1

Les structures ultérieures ont été déterminées par remplacement moléculaire en utilisant la première structure, Holo-2, comme modèle.

Des cycles successifs de reconstruction manuelle et d'affinement par minimisation ont permis d'obtenir les modèles finaux. Seul le modèle de la structure CoA-NAD est encore en cours d'affinement. Pour les modèles qui présentent des molécules de CoA, ce dernier a été modélisé manuellement. Les bibliothèques de topologie et paramètres de ce cofacteur ont été déterminées avec le programme XPLO2D (Kleywegt 1995 *et* 1996 ; Kleywegt *et al.*, 1997 ; Kleywegt *et al.*, 2001 ; Kleywegt *et al.*, 2003), inclus dans l'ensemble de programmes

X-UTIL de la suite de programme Uppsala Software Factory (USF). Les bibliothèques de topologies et de paramètres de protéines de CNS ont été modifiées pour y introduire un nouveau résidu aminoacyl qui correspond à la cystéine catalytique acylée par le substrat MMSA.

Les diagrammes de Ramachandran et la géométrie des modèles sont en accord avec les structures de protéines connues. Les statistiques d'affinement final et celles du diagramme de Ramachandran sont présentées dans le Tableau .

	Structures							
	Mmsa-1				CoA			
<b>Facteurs d'accord</b>								
$R_{crist}$ (%)	22,5				22,6			
$R_{free}$ (%)	27,0 (5%)				26,2 (5%)			
<b>Géométrie (r.m.s.d) :</b>								
Longueur des liaisons (Å)	0,007				0,007			
Angles de valence (°)	5,3				1,3			
Angles dièdres (°)	22,8				22,9			
Angles impropres (°)	0,80				0,83			
<b>B moyen (Å<sup>2</sup>)</b>								
Protéine	25,9				25,7			
CoA					60			
Molécules d'eau	22				32			
<b>Ramachandran</b>	A	B	C	D	A	B	C	D
Régions favorables (%)	85,3	87,6	87,9	87,2	88,4	88,5	90,0	87,9
Régions additionnelles (%)	13,5	11,2	11,4	12,4	10,9	10,7	9,0	11,1
Régions permises (%)	1,2	1,2	0,7	0,5	0,7	1,0	1,0	1,0
Régions défavorables (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tableau III.10 :** Statistiques d'affinements et des diagrammes de Ramachandran des structures Mmsa-1, CoA-NAD et CoA.

Pour le facteur d'accord  $R_{free}$ , la valeur entre parenthèse correspond au pourcentage de données utilisées comme contrôle dans l'évaluation du modèle. Le terme « B » est l'abréviation utilisée pour facteur isotrope de déplacement atomique.

## 2.3. Structure de l'holoenzyme Holo-2

Deux jeux de données de l'holoenzyme ont été collectés à partir des cristaux en forme de plaque. La description de la structure de l'holo-enzyme (avec  $NAD^+$ ) décrite ci-après s'appuie sur le modèle affiné à une résolution de 2,5 Å.

Monomères	A	B	C	D
A		0.283	0.288	0.155
B			0.199	0.269
C				0.231
D				

**Tableau III.11: Valeurs des écarts quadratiques moyens en Å correspondant à la superposition des monomères de la structure de l'holoenzyme.**

Les superpositions des monomères entre eux ont été effectuées uniquement par superposition des atomes de carbone  $\alpha$ .

La structure de l'holoenzyme, désignée par Holo-2, est un homotétramère dont les monomères sont superposables les uns aux autres par rotation de  $180^\circ$  selon trois axes 2 perpendiculaires deux à deux (Tableau ). Le repliement de la structure est comparable à celles des aldéhyde deshydrogénases non CoA-dépendantes déposées dans la PDB (Tableau ).

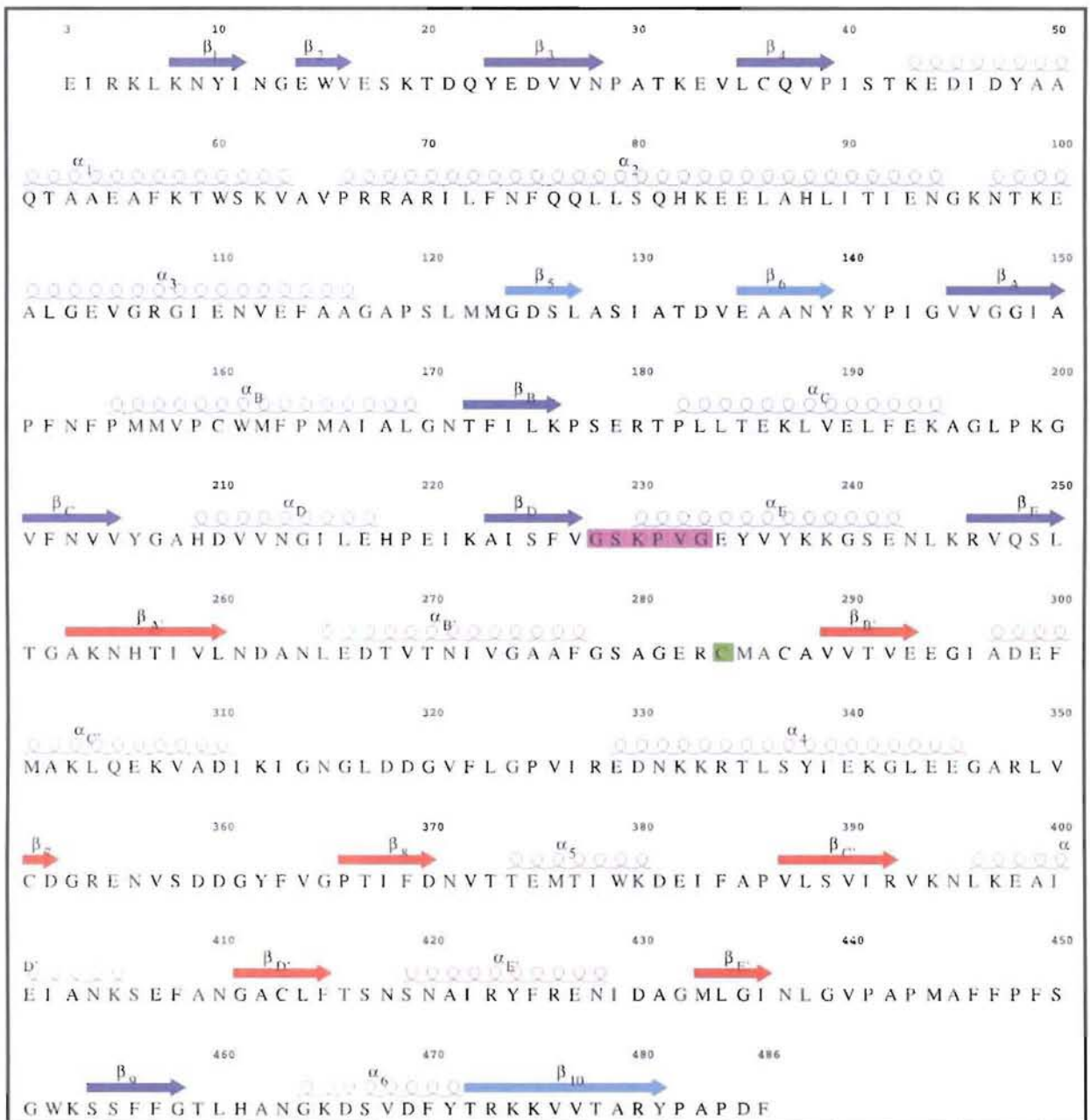
ALDH	Organismes	PDB	r.m.s (Å)
ALDH2	<i>Bos taurus</i>	1a4z	1,42
RALDH	<i>Rattus norvegicus</i>	1bi9	1,45
ALDH1	<i>Ovis aries</i>	1bxs	1,55
ALDH2	<i>Homo sapiens</i>	1o01	1,38
BADH	<i>Gadus calliarias</i>	1bpw	1,38
GAPN	<i>Streptococcus mutans</i>	2euh	1,72
ALDH	<i>Vibrio harveyi</i>	1ez0	2,48
$\eta$ -cristalline	<i>Elephantulus edwardii</i>	1o9j	1,48
ADLH	<i>Escherichia coli</i>	1wnb	1,69
GAPN	<i>Thermoproteus tenax</i>	1ky8	1,75
ALDH-like	<i>Thermus thermophilus</i>	2bhp	1,49

**Tableau III.12 : Valeurs des écarts quadratiques moyens en Å correspondant à la superposition des monomères A de la structure Holo-2 et des structures des ALDHs tétramériques.**

Les superpositions ont été effectuées à partir des structures disponibles dans PDB avec le l'utilitaire *MSDlite* de la banque de données de structure de macromolécule de l'EBI disponible en ligne <http://www.ebi.ac.uk/msd/index.html>.

La chaîne principale de la protéine est bien définie dans la carte de densité électronique à l'exception des extrémités amino- et carboxy- terminales. De ce fait, les résidus Met1, Ala2 et Asn487 n'ont pu être modélisés dans les quatre monomères.

### 2.3.1. Le monomère



**Figure III.13 :** Structure primaire annotée des structures secondaires de la *Bs\_MSDH*.

Le domaine de fixation du cofacteur s'étend des résidus aminoacyls 1-123 et 141-251 et les structures secondaires qui le composent sont en bleu foncé. Les résidus aminoacyls 252 à 470 composent le domaine catalytique dont les structures secondaires sont en rouge. Celles du domaine d'oligomérisation (résidus aminoacyls 124-140 et 471-486) sont en bleu clair.

La « cystéine catalytique » en position 284 est surlignée en vert, et la structure primaire signature du site de fixation du  $\text{NAD}^+$  est surlignée en mauve.

La représentation de la structure primaire a été réalisée avec le logiciel Alscript (version locale) de Barton (1993).

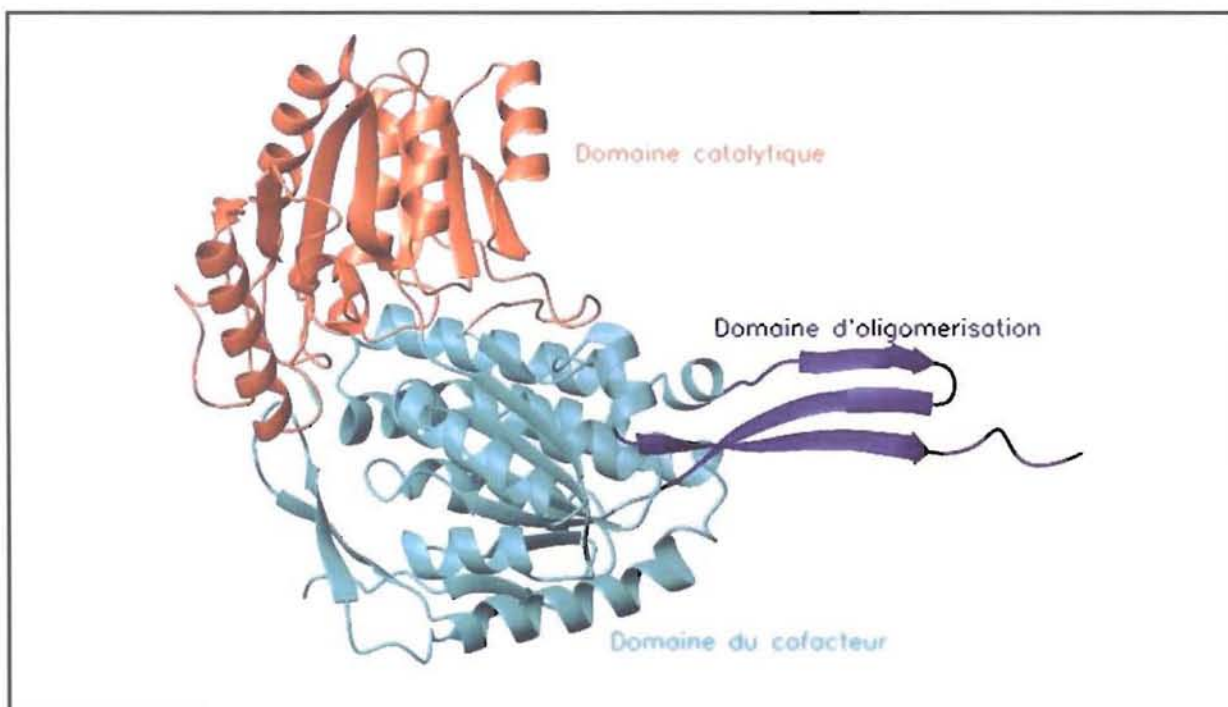
Un monomère est composé de dix-huit brins répartis en trois feuillets  $\beta$  principaux et de quatorze hélices  $\alpha$  qui s'organisent autour de deux des feuillets  $\beta$  principaux (Figure ). Le monomère se subdivise en trois domaines : de fixation du cofacteur, catalytique et



d'oligomérisation (Figure ). La structure tertiaire des deux premiers domaines est de type  $\alpha/\beta$  plan. Ces domaines sont assimilables au « repliement de Rossmann » qui est la structure tertiaire fréquemment rencontrée pour le domaine de fixation du cofacteur de type NAD(P)<sup>+</sup>. La chaîne polypeptidique débute dans le domaine de fixation du cofacteur et se poursuit successivement dans les domaines d'oligomérisation, de fixation du cofacteur, catalytique et de fixation du cofacteur pour terminer dans le domaine d'oligomérisation.

### 2.3.1.1. Le domaine de fixation du cofacteur

Le domaine de fixation du cofacteur est principalement composé d'un feuillet  $\beta$  mixte constitué des brins  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_C$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_A$ ,  $\beta_D$ ,  $\beta_E$  et  $\beta_9$ . Le brin  $\beta_1$  représente la première structure secondaire de la *Bs\_MSDH* (extrémité amino-terminale). Les hélices du domaine sont disposées de part et d'autre du feuillet  $\beta$  mixte. Les hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_D$  et  $\alpha_E$  sont situées sur une même face du feuillet tandis que les hélices  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_B$  et  $\alpha_C$  sont sur l'autre face. Le domaine présente également un feuillet  $\beta$  antiparallèle secondaire à deux brins,  $\beta_3$  et  $\beta_4$ , en amont du brin  $\beta_2$ . Les brins et les hélices annotés par une lettre correspondent aux brins et aux hélices du repliement de Rossmann canonique par opposition aux brins et aux hélices qui portent un chiffre en indice.



**Figure III.14 :** Représentation en ruban de la structure tertiaire du monomère de *Bs\_MSDH*.  
Dessin réalisé avec le logiciel MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

### 2.3.1.2. Le domaine catalytique

Un feuillet  $\beta$  mixte à sept brins ( $\beta_{A'}$ ,  $\beta_{B'}$ ,  $\beta_{C'}$ ,  $\beta_{D'}$ ,  $\beta_{E'}$ ,  $\beta_7$  et  $\beta_8$ ) constitue la base de la topologie du domaine catalytique. Une des faces de ce feuillet est composée des hélices  $\alpha_{A'}$  et  $\alpha_{B'}$  tandis que les hélices  $\alpha_{D'}$ ,  $\alpha_{E'}$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  sont situées sur l'autre face. Ce domaine s'achève par l'hélice  $\alpha_6$ . Le repliement de ce domaine étant de type  $\alpha/\beta$  plan, la nomenclature utilisée

s'appuie sur celle du domaine de fixation du cofacteur où l'annotation par des lettres désigne les brins et les hélices du repliement de Rossmann canonique et celle par des chiffres spécifie les brins et les hélices propres aux aldéhyde deshydrogénases.

### 2.3.1.3. Le domaine d'oligomérisation

Le domaine d'oligomérisation est uniquement composé des trois brins ( $\beta_5$ ,  $\beta_6$  et  $\beta_{10}$ ) disposés en un feuillet  $\beta$  antiparallèle. Le brin  $\beta_{10}$  se poursuit au-delà du feuillet et correspond à l'extrémité carboxy-terminale de la *Bs\_MSDH*.

### 2.3.1.4. Organisation spatiale des trois domaines

Dans un plan, les trois domaines des aldéhyde deshydrogénases et de la *Bs\_MSDH* s'organisent les uns par rapport aux autres pour former un monomère en forme de « L » (Figure ). Les deux domaines  $\alpha/\beta$  plans se font face, de telle sorte que la boucle, entre  $\alpha_B$  et  $\beta_B$ , qui porte la cystéine catalytique soit orientée vers la boucle, entre  $\beta_D$  et  $\alpha_E$ , qui porte la séquence signature de la fixation du cofacteur  $\text{NAD}^+$ . Ainsi associés, le domaine de fixation du cofacteur et le domaine catalytique constituent le premier segment de la forme en « L ». Le domaine d'oligomérisation forme le second segment de la forme en « L » qui est situé dans l'espace à proximité du domaine de fixation du cofacteur du premier segment.

## 2.3.2. L'association oligomérique

Comme dans le cas des aldéhyde deshydrogénases, le tétramère de la *Bs\_MSDH* est un dimère de dimère où les monomères A et B forment un dimère, et par conséquent les monomères C et D constituent l'autre dimère (Tableau ).

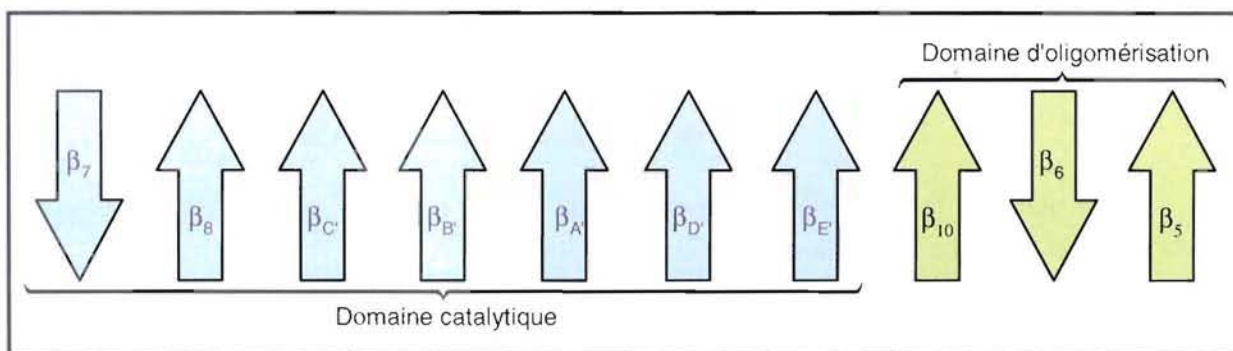
Domaines	Brins des domaines	Monomères		Oligomérisation
Catalytique	$\beta_7, \beta_8, \beta_C, \beta_B, \beta_A, \beta_D$ et $\beta_E$	B	A	Dimères
Oligomérisation	$\beta_{10}, \beta_6$ et $\beta_5$	A	B	AB
Oligomérisation	$\beta_{10}, \beta_6$ et $\beta_5$	D	C	Dimères
Catalytique	$\beta_7, \beta_8, \beta_C, \beta_B, \beta_A, \beta_D$ et $\beta_E$	C	D	CD

**Tableau III.15 :** Oligomérisation de la *Bs\_MSDH*.

Les brins  $\beta_E$  et  $\beta_{10}$  sont impliqués dans la dimérisation et les brins  $\beta_5$  dans la tétramérisation.

Les monomères s'associent en dimère par formation de deux feuillets  $\beta$  mixte inter-chaînes à dix brins, via les brins  $\beta_E$  (Gly432-Asn437) et  $\beta_{10}$  (Lys474-Arg480). Chaque feuillet  $\beta$  ainsi formé (Tableau ) résulte de l'association du feuillet  $\beta$  mixte du domaine catalytique ( $\beta_7, \beta_8, \beta_C, \beta_B, \beta_A, \beta_D$  et  $\beta_E$ ) avec le feuillet  $\beta$  antiparallèle du domaine d'oligomérisation ( $\beta_{10}, \beta_6$  et  $\beta_5$ ). Et d'autre part, la dimérisation est relayée par les hélices  $\alpha_E$  (Lys230-Asn243) des domaines de fixation du cofacteur.





**Tableau III.16 :** Schéma représentant un des deux feuilletts  $\beta$  à dix brins à l'origine de la dimérisation. Le code couleur sera conservé tout au long des résultats. Le monomère A et B sont respectivement en bleu et en vert.

Les dimères AB et CD s'associent en tétramère par les brins  $\beta_5$  (Gly124-Leu127). Le brin  $\beta_5$  du monomère A est en interaction avec le brin  $\beta_5$  du monomère D, et celui du monomère B est en interaction avec le brin  $\beta_5$  du monomère C. Les brins  $\beta_5$  sont en interaction entre eux, par liaison hydrogène, uniquement en leur centre via les résidus aminoacyls Gly124 et Asp125 ; ils ne sont pas parallèles l'un à l'autre. Ainsi, les quatre monomères sont associés les uns aux autres par deux pseudo-feuilletts  $\beta$  mixtes (à 20 brins) inter-chaînes.

Au niveau du domaine d'oligomérisation (Tableau ), la boucle de connexion (Ala128-Glu135) entre les brins  $\beta_5$  et  $\beta_6$ , ainsi que l'extrémité carboxy-terminale du brin  $\beta_{10}$  (Tyr481-Phe486), sont en interactions avec les hélices  $\alpha_{D'}$  et  $\alpha_{E'}$  d'un monomère d'un autre dimère (par exemple A avec C). Les hélices  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  d'un monomère sont en interactions avec leurs homologues dans le tétramère. Tous ces contacts (récapitulés dans le Tableau ) s'effectuent avec le monomère dont le domaine d'oligomérisation n'est pas impliqué dans le feuillet  $\beta$  antiparallèle à 20 brins ; c'est-à-dire le monomère C pour le domaine d'oligomérisation du monomère A.

Monomères	A	C	A	C	A	C
Structures secondaires	$\beta_{10}$ (Ct)	$\alpha_{E'}$ et $\alpha_{D'}$	boucle $\beta_5$ - $\beta_6$	$\alpha_{E'}$	$\alpha_2$ et $\alpha_3$	$\alpha_2$ et $\alpha_3$
Résidus aminoacyls	Pro484 Phe486	Leu396 Lys397 Tyr434	Ala128 CO Ala128 CO Ser129 OG Asp133 NH Val134 NH Glu135 OE1 Glu135 OE2 Glu135 OE2	NH1 Arg423 NH2 Arg423 NH1 Arg423 NH1 Arg423 NH1 Arg423 NH2 Arg426 NH2 Arg426 NH2 Arg423	Val65 à Asn94	Thr98 à Gly117
Types d'interactions	hydrophobes		liaisons hydrogène		hydrophobes et liaisons hydrogène	

**Tableau III.17 :** Interactions inter-dimères du domaine d'oligomérisation de type A/C. Ces interactions sont également valables pour tous les domaines d'oligomérisation du tétramère.  $\beta_{10}$  (Ct) pour la partie carboxy-terminale du brin  $\beta_{10}$ .



### 2.3.3. Les sites importants

#### 2.3.3.1. Le site de fixation du cofacteur NAD<sup>+</sup>

Quel que soit le monomère, la molécule de NAD<sup>+</sup> est bien définie dans la densité électronique et a pu être complètement modélisée (Figure ).

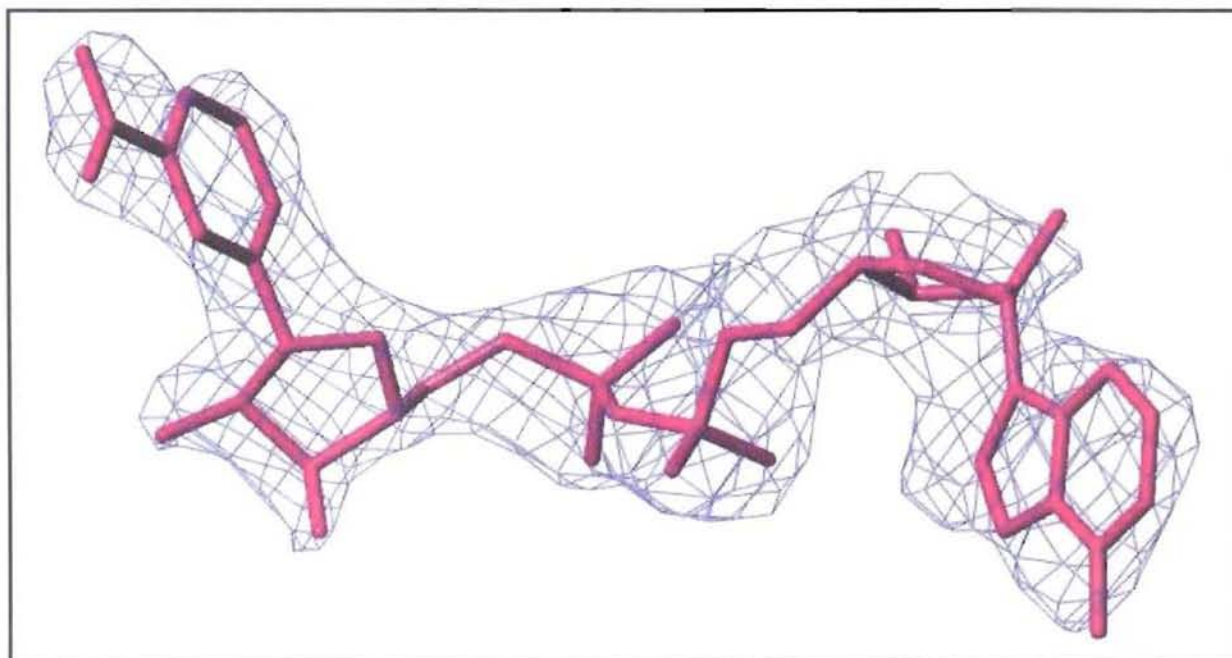
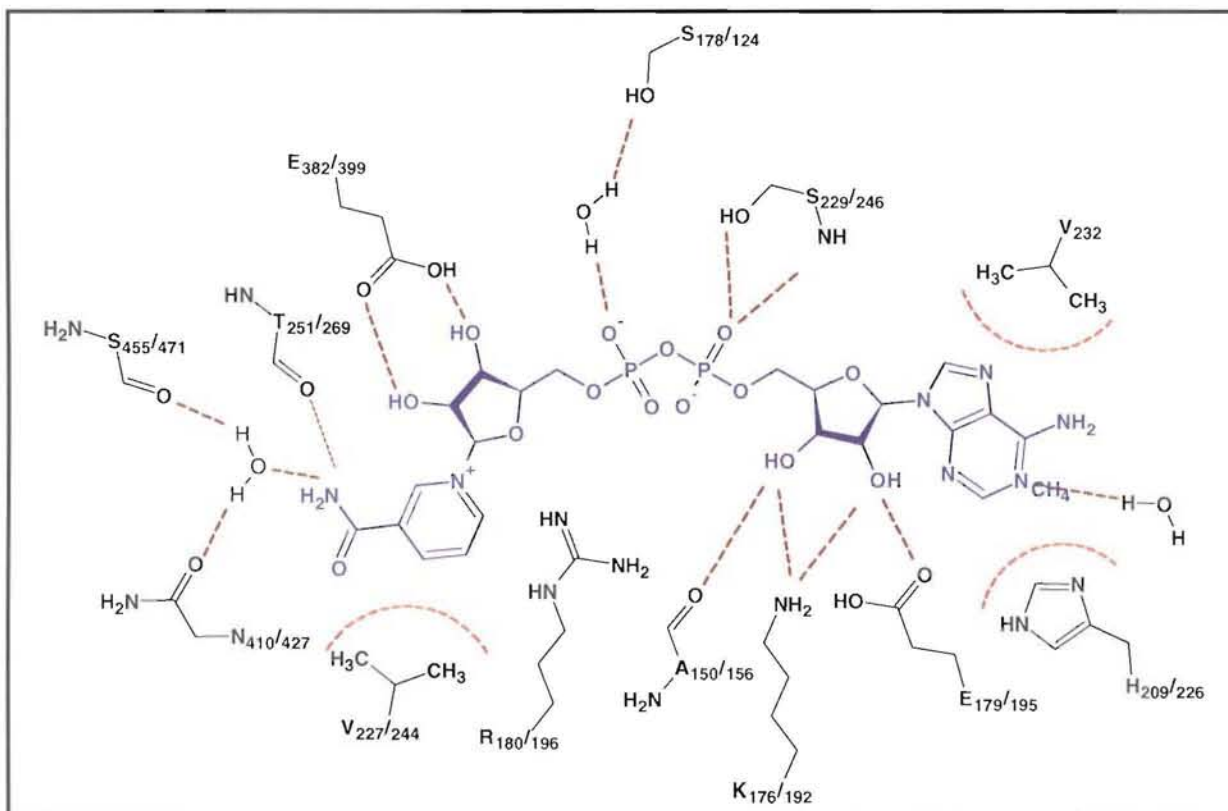


Figure III.18 : Modélisation de la molécule de NAD<sup>+</sup> dans la densité électronique de la structure de la *Bs\_MSDH* sous forme holo-enzyme.

La carte de densité électronique est du type 2fo-fc avec un niveau de contour à 1,2 sigma.

Le site de fixation du cofacteur est principalement composé par des résidus aminoacyls du domaine de fixation du cofacteur. L'adénine du NAD<sup>+</sup> s'insère entre les extrémités amino-terminales des hélices  $\alpha_D$  et  $\alpha_E$ , et se pose sur les brins  $\beta_A$ ,  $\beta_B$  et  $\beta_D$ . Les résidus His209 et Val232 stabilisent le cycle par des contacts de van der Waals. Les groupements hydroxyles du ribose de l'adénosine sont stabilisés par des liaisons hydrogène établies avec les résidus Lys176 du brin  $\beta_B$ , Glu179 de la boucle entre  $\beta_B$  et  $\alpha_C$  et Ala150 du brin  $\beta_A$  (Figure ). Le site de fixation du groupement pyrophosphate, de structure primaire **GSKPVG** (Gly228 à Gly233), est bien situé entre l'extrémité carboxy-terminale du brin  $\beta_D$  (Ala223-Val227) et l'extrémité amino-terminale de l'hélice  $\alpha_E$  (Lys230-Asn244). Les atomes d'oxygène AOP1 et NOP1 (voir annexe 1) des deux groupements phosphate établissent des liaisons hydrogène avec les résidus Ser178 et Ser229 des deux boucles qui relient respectivement les brins  $\beta_B$  et  $\beta_C$  aux hélices  $\alpha_C$  et  $\alpha_D$ . Les groupements hydroxyles du ribose lié au cycle nicotinamide sont stabilisés par le résidu Glu382 de la boucle qui relie l'hélice  $\alpha_5$  au brin  $\beta_C$  du domaine catalytique. Le nicotinamide est positionné entre deux boucles, l'une connecte le brin  $\beta_D$  à l'hélice  $\alpha_E$  dans le domaine de fixation du cofacteur et l'autre porte la cystéine catalytique en position 284 (entre l'hélice  $\alpha_B$  et le brin  $\beta_B$ ). Le NH primaire du groupement carboxamide du nicotinamide établit une liaison hydrogène directe avec le résidu

Thr251 du domaine de fixation du cofacteur et deux liaisons hydrogène via une molécule d'eau avec les résidus Asn410 et Ser455 du domaine catalytique. Le nicotinamide est dans une position compatible avec le transfert d'hydrure. L'atome de carbone en position NC4 du nicotinamide est en moyenne à 3,1 Å de l'atome de soufre du résidu Cys284. Toutes les interactions effectuées par le NAD<sup>+</sup> sont récapitulées et détaillées dans la Figure .



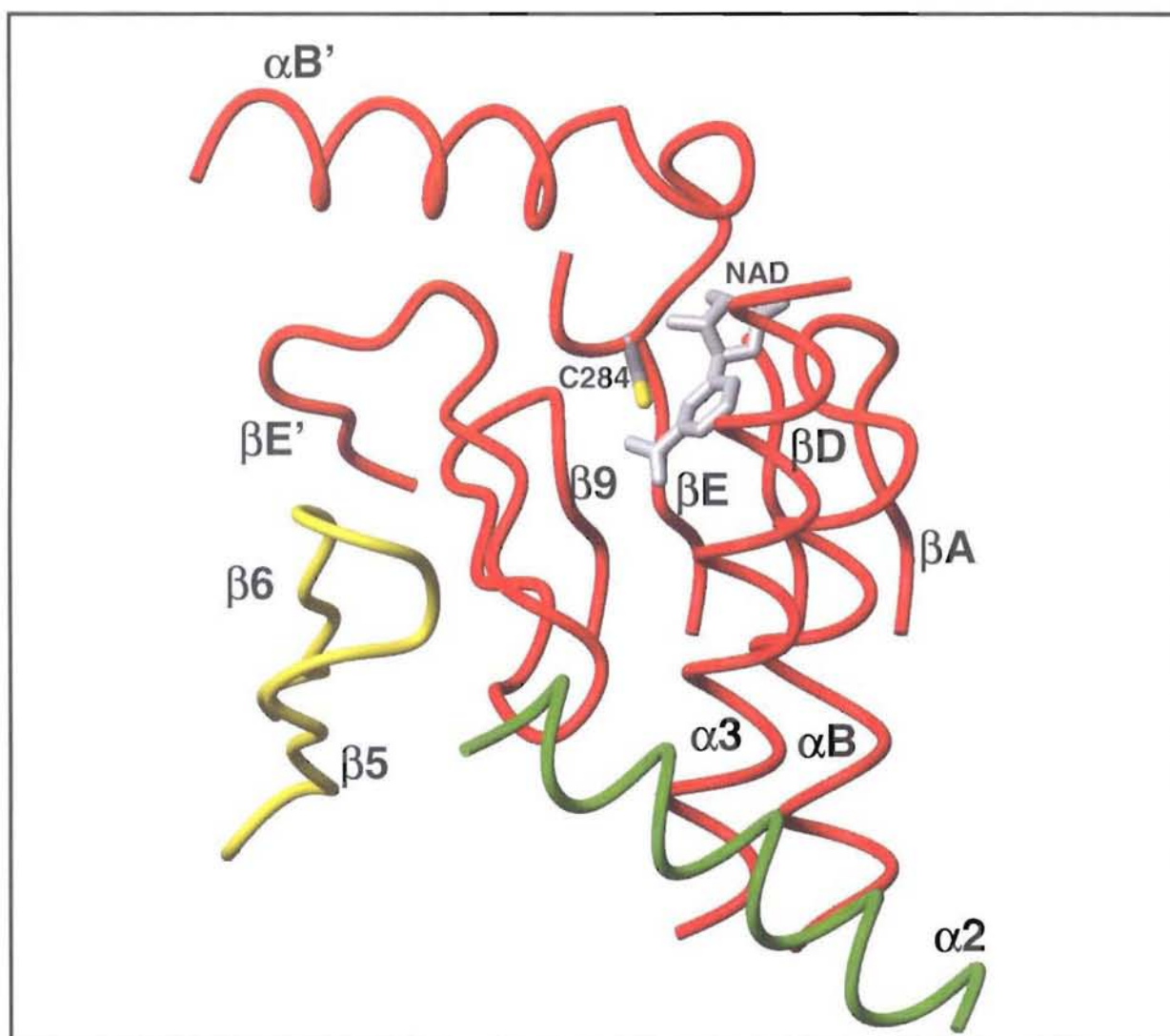
**Figure III.19 :** Description des interactions entre la *Bs\_MSDH* et le NAD<sup>+</sup>. Les lignes pointillées rectilignes représentent les liaisons hydrogène identifiées qui sont établies entre le site de fixation du cofacteur de la *Bs\_MSDH* et le NAD<sup>+</sup>. Les résidus aminoacyles His209, Val212 et Val232 représentent la poche de fixation de l'adénine du NAD<sup>+</sup>. Le résidu arginyl 180 (Arg180) n'établit pas de liaison hydrogène avec le cofacteur, mais est à proximité du groupement pyrophosphate. Les lignes courbes en pointillées indiquent les interactions de van der Waals. En indice des résidus aminoacyles sont indiqués les positions qu'ils occupent respectivement dans le *Bs\_MSDH* et les ALDH.

### 2.3.3.2. Le site actif

La « cystéine catalytique » appartient à la boucle qui lie l'hélice  $\alpha_B$  (Asn264-Phe277) et le brin  $\beta_B$  (Ala288-Glu293). Pour décrire le site actif de la *Bs\_MSDH* (Figure ), le tétramère est orienté de sorte que les brins  $\beta_A$ ,  $\beta_D$ ,  $\beta_E$  et  $\beta_9$  du domaine de fixation du cofacteur soient en arrière plan et que la cystéine catalytique soit en avant de ces brins. Le tunnel, qui s'étend du domaine de fixation du cofacteur au domaine catalytique, est obstrué par le nicotinamide du NAD<sup>+</sup> au niveau de la cystéine catalytique (Cys284). Cette dernière est entourée de chaînes latérales hydrophobes des résidus aminoacyles suivants : Phe154, Met157, Trp161, Met285, Arg283 (partie aliphatique) et Phe449 (Figure ). L'hélice  $\alpha_B$  surplombe la



cystéine catalytique. Deux résidus asparagyls, Asn153/169\* et Asn410/427, sont positionnés à équidistance de Cys284/302. Le résidu Asn153 correspond au résidu asparagyl caractéristique du site oxyanion (Asn169 chez les ALDH1 et ALDH2) qui est essentiel à la catalyse enzymatique. De la cystéine catalytique à la surface de l'enzyme, les contours du site actif sont définis par les hélices  $\alpha_B$  (Phe154-Gly170) et  $\alpha_3$  (Thr98-Gly117) situées du même côté que le NAD<sup>+</sup> et du côté opposé, par la boucle (Asn437-Ser455) qui connecte les brins  $\beta_E$  et  $\beta_9$ . La boucle (Ala128-Val134), qui relie les brins  $\beta_5$  et  $\beta_6$  du monomère qui compose le dimère, compose la dernière face du site actif, en opposition au résidu Cys284. L'entrée du site actif est restreinte par l'hélice  $\alpha_2$  (Val65-Asn94) d'un monomère de l'autre dimère. Par exemple, l'hélice  $\alpha_2$  du monomère C réduit l'entrée du site actif du monomère A. Le résidu leucyl Leu250 occupe une position équivalente à celle du résidu glutamyl 268 catalytique des aldéhyde deshydrogénases.



**Figure III.20 :** Représentation des structures secondaires qui définissent le site actif de la *Bs\_MSDH*. Les chaînes principales sont représentées en lacet. Le code couleur est le suivant : rouge pour le monomère A, jaune pour le monomère B et vert pour le monomère C. Les monomères A et B constituent un dimère du tétramère.

\* Les numéros correspondent aux positions occupées respectivement chez la *Bs\_MSDH* et les ALDH.

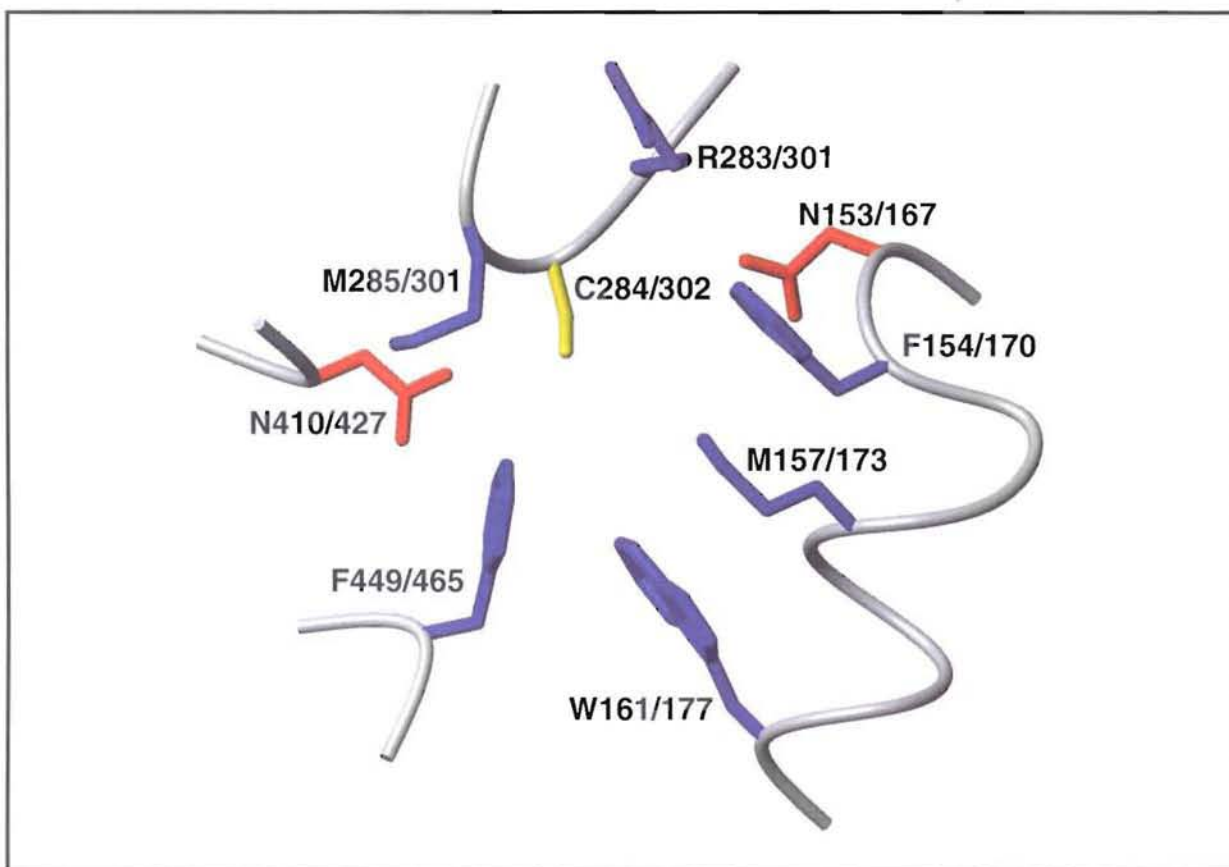


Figure III.21 : Représentation des résidus aminoacyls du site actif de la *Bs\_MSDH*. La chaîne principale est représentée sous forme de lacet de couleur grise. Le NAD<sup>+</sup> n'est représenté pas. Les numéros correspondent aux positions occupées respectivement chez la *Bs\_MSDH* et les ALDH.

## 2.4. Structure de l'acylenzyme (Mmsa-1)

### 2.4.1. Généralités

Les cristaux d'acylenzyme ont été obtenus par trempage de cristaux d'holo-enzyme (enzyme/NAD<sup>+</sup>), pendant 10 minutes, dans la solution de cristallisation enrichie en substrat (5mM), le méthylmalonate semialdéhyde (MMSA).

La structure de l'enzyme acylée est un homotétramère dont les monomères sont superposables les uns aux autres par rotation de 180° selon trois axes 2 perpendiculaires deux à deux (Tableau ). La structure est comparable à celle de l'Holo-2 avec 0,269 Å de rms correspondant à la superposition des monomères A. Les extrémités N-terminale (Met1 et Ala2) et C-terminale (Asn487) n'ont pu être modélisées en raison de l'absence de densité électronique.

Monomères	A	B	C	D
A		0,257	0,270	0,231
B			0,244	0,273
C				0,266
D				

**Tableau III.22 :** Valeurs des écarts quadratiques moyens en Å correspondant aux superpositions de la structure de l'acylenzyme.

Les superpositions des monomères entre eux ont été effectuées uniquement par superposition des atomes de carbone  $\alpha$ .

Holo-2 A désigne le monomère A de la structure Holo-2.

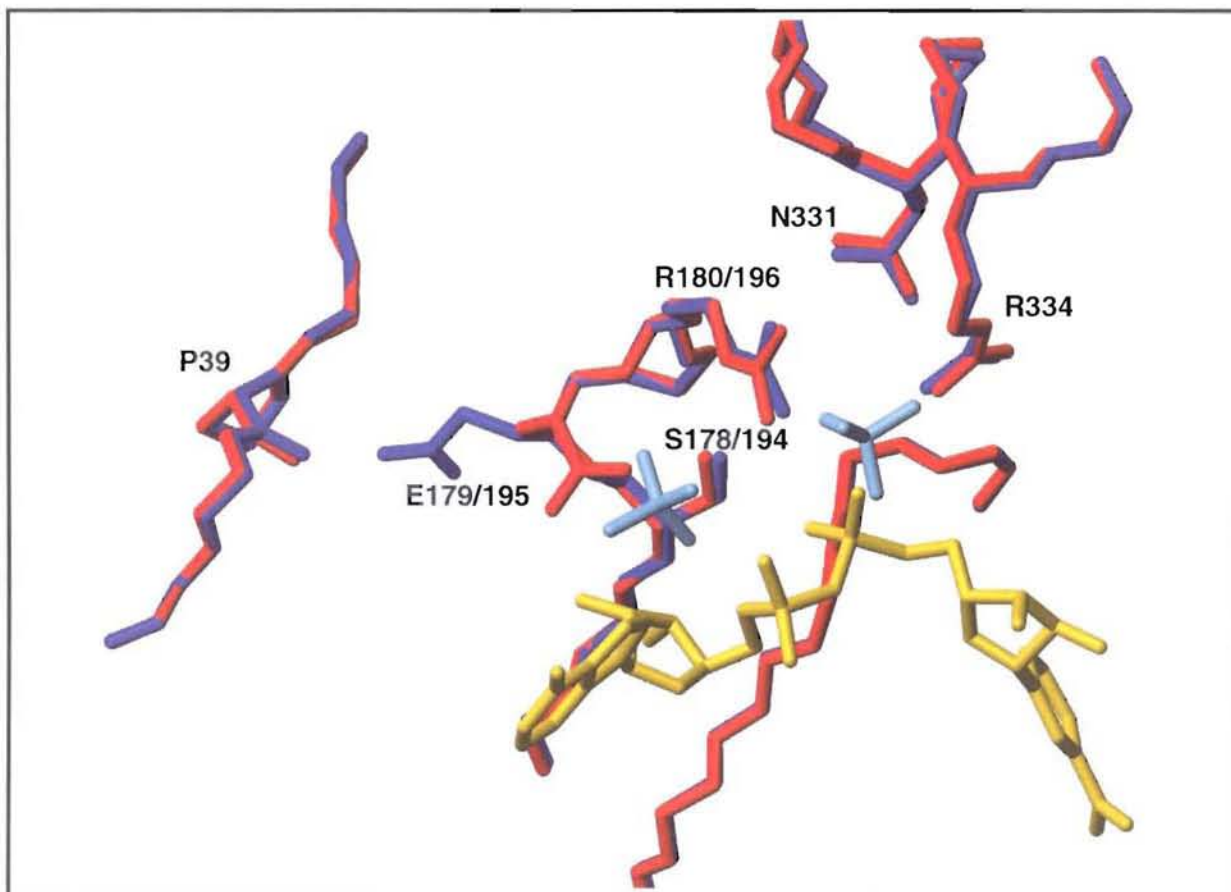
## 2.4.2. Particularités de la structure Mmsa-1

### 2.4.2.1. Le site de fixation du cofacteur

La carte de densité électronique résiduelle  $fo-fc$  révèle que les quatre sites de fixation du cofacteur sont dépourvus de  $\text{NAD}^+$  ou de  $\text{NADH}$ . Le départ des quatre molécules de  $\text{NADH}$  n'a pas affecté la conformation globale de la protéine et des sites de fixation du cofacteur. Toutefois, deux changements notables ont été observés au niveau de l'orientation des chaînes latérales des résidus aminoacyls qui composent le site de fixation du cofacteur. Le résidu Glu179, impliqué dans la stabilisation du ribose de l'adénosine via sa chaîne latérale, adopte une conformation différente en l'absence de cofacteur (Figure ). A noter, un des deux groupements sulfate occupe la même position que celle adoptée par la chaîne latérale du résidu Glu179 dans la structure Holo-2. L'orientation de la fonction acide en direction des chaînes latérales des résidus Val38 et Ile40 tend à supposer que la fonction existe sous sa forme carboxylique (non chargée). De plus, un des atomes d'oxygène de la fonction acide est à une distance de 2,7 Å de la fonction carbonyle du résidu Pro39 qui est compatible avec la formation d'une liaison hydrogène.

Dans la structure Holo-2 (Figure ), la chaîne latérale du résidu Arg180 est orientée en direction du phosphate lié au ribose du nicotinamide. Compte tenu de la qualité des cartes de densité électronique autour de ce résidu, aucune interaction n'a été envisagée dans la structure Holo-2. Par contre, les cartes de densité électronique sont bien définies autour du résidu Arg180 dans la structure Mmsa-1. La conformation de la chaîne latérale de ce résidu est modélisée avec certitude. Le groupement guanidinium de la chaîne latérale du résidu Arg180 est alors en interaction avec les molécules de sulfate présentées ci-dessous.





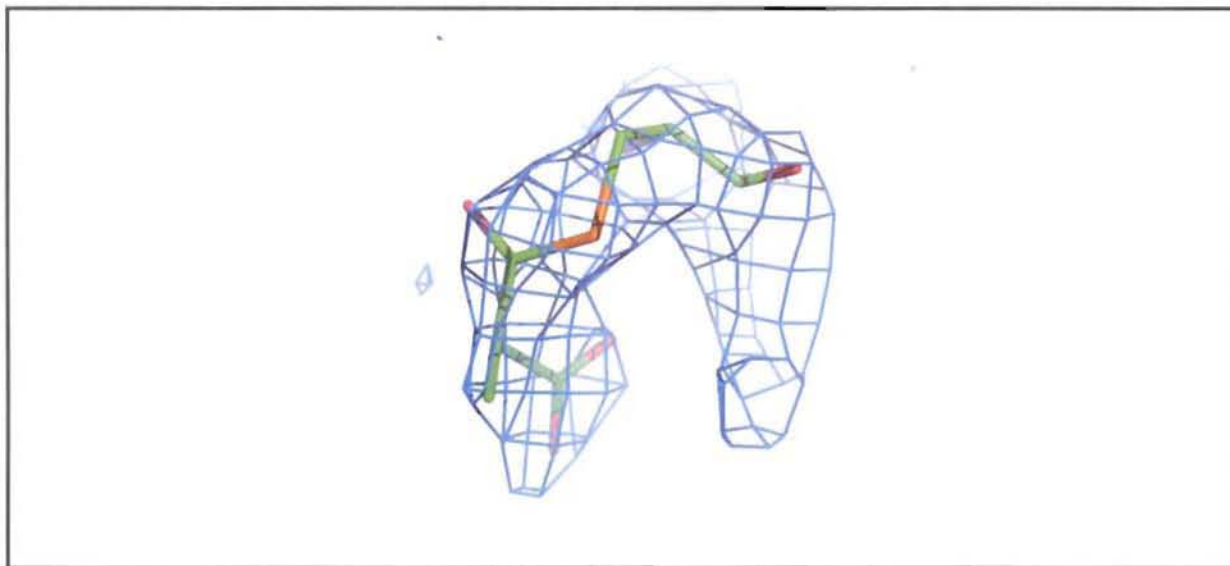
**Figure III.23 :** Représentation en bâtons de la superposition partielle des sites de fixation du cofacteur des structures Holo-2 et Mmsa-1.

Les structures Holo-2 et Mmsa-1 sont respectivement colorées en rouge et en bleu. La molécule de NAD<sup>+</sup> est de couleur or, tandis que les groupements sulfate sont de couleur turquoise. Les numéros correspondent aux positions occupées respectivement chez la *Bs\_MSDH* et les ALDH.

Deux groupements sulfate sont modélisés dans chaque site. Ceux-ci n'occupent pas la même position que les groupements phosphate du cofacteur. Les atomes d'oxygène du premier groupement sulfate établissent des liaisons hydrogène avec le groupement –NH– de la chaîne principale et le groupement guanidinium du résidu Arg180, et avec la fonction hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Ser178 (Figure ). Le second groupement sulfate est moins bien défini dans la carte de densité électronique. Il est stabilisé dans sa position par des liaisons hydrogène qui impliquent les chaînes latérales des résidus Arg180, Asn331 et Arg334 (Figure ).

#### 2.4.2.2. Le site actif

Les quatre résidus cystéyls en position 284 sont acylés par le substrat. Chacun d'eux présente un taux d'occupation d'une valeur de 1. La densité électronique autour du résidu acylé est bien définie dans deux monomères (B et C) sur quatre. Seul le stéréoisomère *S*- du MMSA se modélise dans la densité électronique de la structure (Figure ).



**Figure III.24 :** Représentation du résidu cystéyl 284 acylé par le méthylmalonate semialdéhyde (L) modélisé dans la densité électronique.

La carte de densité électronique est du type  $2fo-fc$  avec un niveau de contour à 1,2 sigma.

La Figure rend compte de la position du substrat dans le site actif ainsi que des interactions qu'il effectue avec l'enzyme.

La fonction carbonyle est orientée vers le résidu asparginyl 153, l'équivalent du résidu Asn169 caractéristique du site oxyanion des aldéhyde deshydrogénases. L'atome d'oxygène de la fonction établit respectivement deux liaisons hydrogène de 3,0 et 2,7 Å avec le  $-NH_2$  de la chaîne latérale de Asn153 et le  $-NH-$  de la chaîne principale du résidu cystéyl acylée 284. Le groupement méthyle se positionne dans une poche hydrophobe constituée des résidus aminoacyls Trp161 et Phe449.

Un des deux atomes d'oxygène de la fonction acide terminale forme une liaison hydrogène avec le  $-NH-$  de la chaîne principale du résidu méthionyl 285 (I/303). Cette interaction fixe l'orientation et la position de cette fonction acide en direction de la chaîne latérale des résidus aminoacyls Arg107/124 et Arg283/301. Les cartes de densité électronique permettent de modéliser le résidu Arg107 avec certitude. Ce résidu aminoacyl est invariant chez les méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénases (voir alignement à la fin de ce chapitre). Dans les monomères B et C, la chaîne latérale du résidu Arg107 est en interaction avec la fonction acide du substrat. Aucune liaison hydrogène ne peut être considérée avec le résidu arginyl 283.

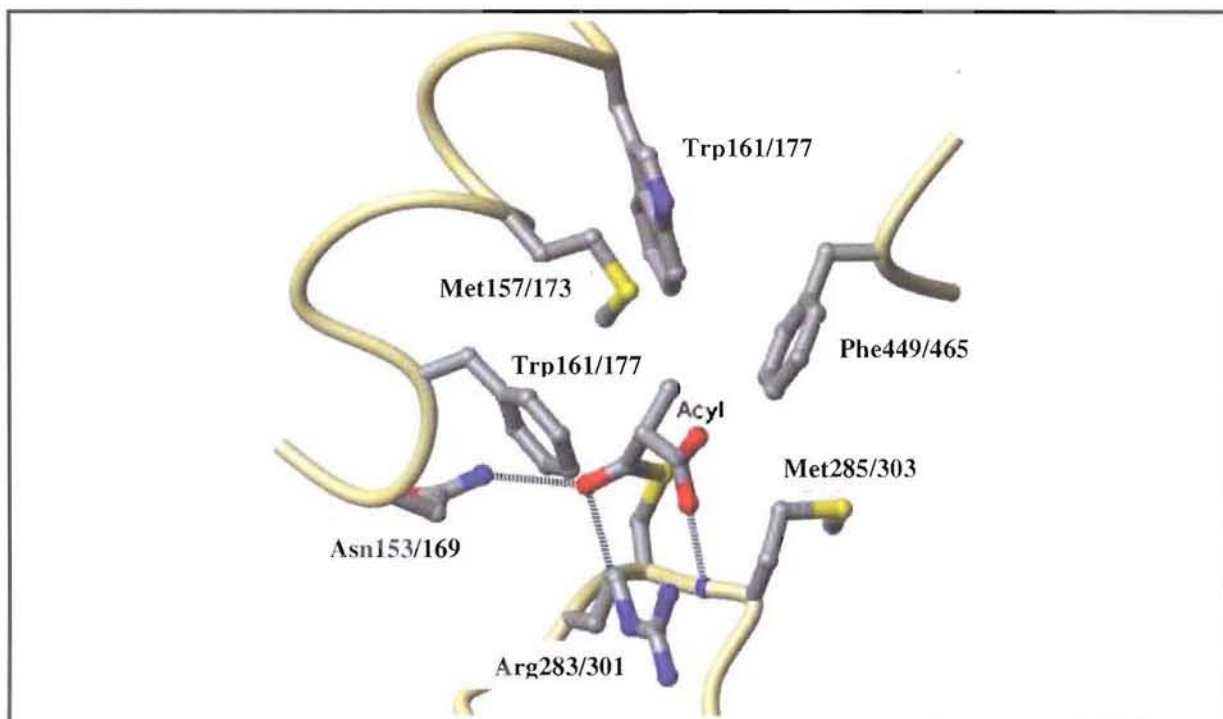


Figure III.25 : Description des interactions entre la *Bs\_MSDH* et le substrat.

La chaîne principale est représentée en lacet. Les lignes pointillées rendent compte des liaisons hydrogène constatées. Les numéros correspondent aux positions occupées respectivement chez la *Bs\_MSDH* et les ALDH.

## 2.5. Structure du complexe CoA-NAD

### 2.5.1. Généralités

Les cristaux de la *Bs\_MSDH* complexée aux cofacteurs  $\text{NAD}^+$  et CoA ont été obtenus par cocrystallisation. L'enzyme est préalablement incubée 30 minutes à  $30^\circ\text{C}$  dans le tampon phosphate (50 mM, pH 8,2) supplémenté en CoA (40 mM) et  $\text{NAD}^+$  (20 mM). Les conditions d'obtention des cristaux sont identiques à celles utilisées pour former les cristaux d'holoenzyme.

La structure de ce complexe, appelée structure CoA-NAD, est un homotétramère dont les monomères sont superposables les uns aux autres par rotation de  $180^\circ$  selon trois axes 2 perpendiculaires deux à deux (Tableau ). La structure est comparable à celle de l'Holo-2, 0,218 Å de rms (superposition des monomères A). Les deux tétramères présents dans l'unité asymétrique sont superposables entre eux (0,144 Å de rms). Les extrémités N-terminale (Met1 et Ala2) et C-terminale (Asn487) n'ont pu être modélisées en raison de l'absence de densité électronique.



Monomères	A	B	C	D	Monomères	E	F	G	H
A		0,257	0,270	0,231	E		0,269	0,263	0,233
B			0,244	0,273	F			0,234	0,263
C				0,266	G				0,250
D					H				

**Tableau III.26 :** Valeurs des écarts quadratiques moyens en Å correspondant à la superposition des monomères de la structure CoA-NAD.

Les superpositions des monomères entre eux ont été effectuées uniquement par superposition des atomes de carbone  $\alpha$ . Les monomères A, B, C et D constituent un tétramère, tandis que le second est composé des monomères E, F, G et H.

L'affinement de la structure CoA-NAD étant en cours d'achèvement, les résultats structuraux préliminaires sont présentés ci-dessous.

## 2.5.2. Particularité de la structure CoA-NAD

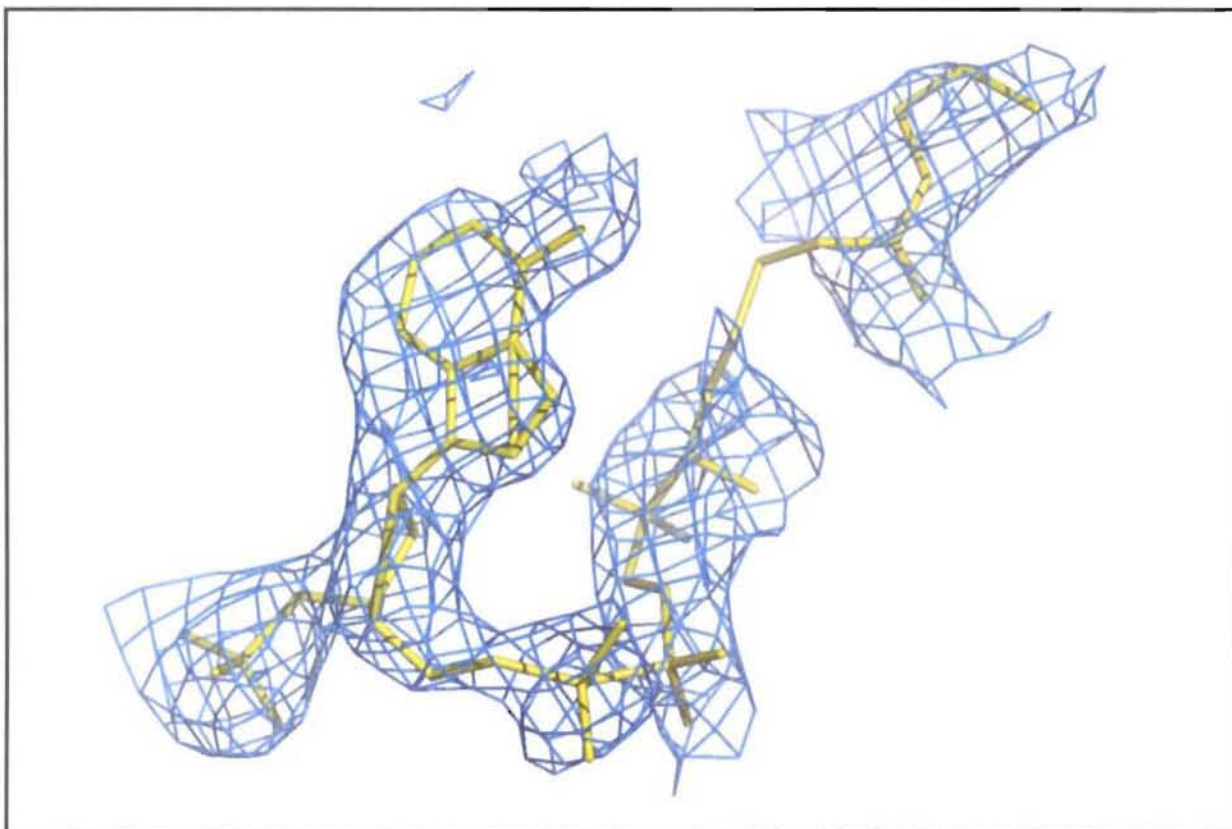
### 2.5.2.1. Le site de fixation du cofacteur

La carte de densité électronique résiduelle  $fo-fc$  indique que les quatre sites de fixation du cofacteur des deux tétramères sont occupés par des molécules de  $\text{NAD}^+$ . A ce niveau d'avancement de l'affinement, les molécules de cofacteur semblent présenter un taux d'occupation d'une valeur de 1. Les molécules  $\text{NAD}^+$  occupent la même position dans leur site que celle observée dans la structure Holo-2. Ils présentent une conformation étendue avec le cycle nicotinamide en position de transfert d'hydrure. Les contacts entre l'enzyme et le cofacteur sont les mêmes que ceux décrits dans la structure Holo-2 (voir paragraphe 2.3.3.1 page 85).

### 2.5.2.2. Le site de fixation du CoA

Au niveau de tous les sites actifs, la carte de densité électronique résiduelle  $fo-fc$  révèle la présence d'une molécule de CoA (Figure ). La densité électronique n'est pas continue sur toute la longueur de la molécule, mais elle est suffisante pour modéliser l'ensemble. La molécule de CoA adopte une conformation non étendue où le motif pantéthéine est en position *syn* par rapport au motif adénosine (voir la nomenclature et la description du CoA en annexe).

A ce niveau d'avancement de l'affinement, le CoA a été modélisé dans un seul des huit monomères indépendants. Le site de fixation de la molécule de CoA coïncide avec le site actif (voir paragraphe 2.3.3.2 page 86). L'ensemble des structures secondaires qui définissent ce site sont impliquées dans la stabilisation du CoA (Figure ).



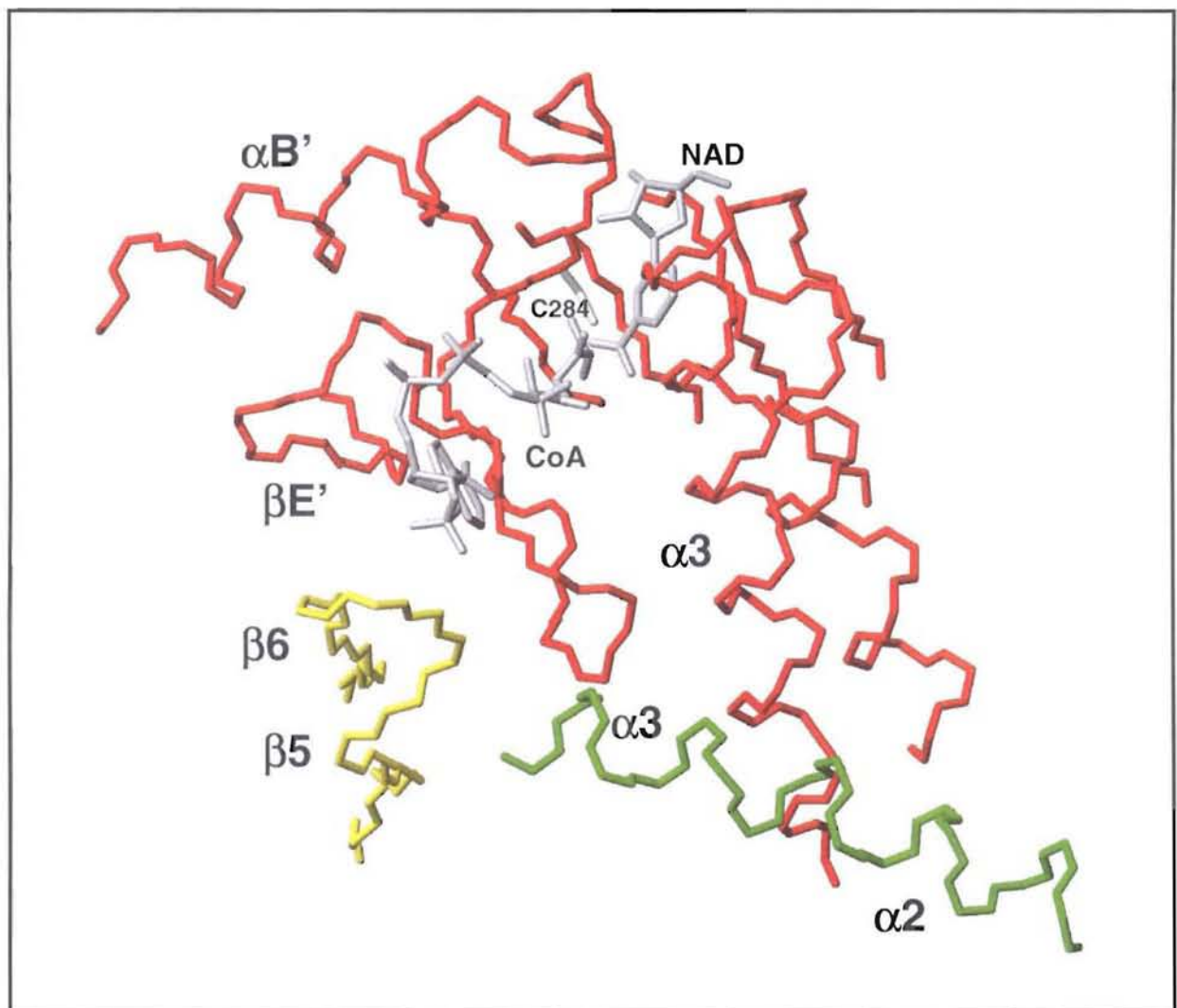
**Figure III.27 :** Modélisation de la molécule de CoA dans la densité électronique de la structure CoA-NAD.  
La carte de densité électronique est du type 2fo- $f_c$  avec un niveau de contour à 1,2 sigma.

Le motif adénosine se situe en bordure extérieure du site actif, avec la fonction amine secondaire en direction de la boucle qui relie les brins  $\beta_E$  et  $\beta_9$ . Le groupement phosphate en position 3' du ribose de l'adénosine est orienté vers la surface du site actif en direction de l'hélice  $\alpha_2$  d'un monomère de l'autre dimère. Le groupement pyrophosphate se positionne parallèlement à l'hélice  $\alpha_B$ . La partie pantéthéine (« bras ») adopte une conformation étendue et occupe le centre du tunnel du site actif. La première fonction carbamide (équivalente à une liaison peptidique) présente une conformation *trans* alors que la seconde adopte une conformation *cis*. Le CoA est placé dans le site de sorte que l'atome de soufre terminal du bras pantéthéine soit à 2,9 Å de celui du résidu Cys284/302. Du groupement pyrophosphate à la seconde fonction carbamide, la molécule de CoA n'est pas bien définie dans la densité électronique (Figure ).

Le cycle adénine se fixe dans une poche majoritairement hydrophobe définie par les résidus aminoacyles Leu438 et Thr478 du monomère concerné et par Ile130, Ala131 et Val134 de l'autre monomère du dimère. Le CoA établit avec certitude quatre liaisons hydrogène. Les deux premières concernent la fonction amine primaire de l'adénine. Elle est en interaction avec les fonctions carbonyles des chaînes principales des résidus Val440 et Ala442. La troisième interaction de type liaison hydrogène implique l'atome d'oxygène de la seconde fonction carbonyle du CoA et une fonction amine en position epsilon de la chaîne latérale du résidu Arg283/301. La dernière liaison hydrogène recensée concerne un atome d'oxygène du groupement phosphate qui succède le ribose et le  $-NH_2$  de la chaîne latérale du résidu



Asn271. La première fonction carbamide est située à proximité du groupement guanidinium du résidu Arg107/124. Contrairement à ce qui est observé dans la structure Holo-2, la chaîne latérale de ce résidu est bien définie dans les cartes de densité électronique. Ici, la conformation du résidu Arg107/124 est stabilisée par formation d'une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Glu110. Le groupement phosphate en position 3' du ribose peut potentiellement être en interaction avec le groupement guanidinium du résidu Arg67 d'un monomère de l'autre dimère. A titre d'exemple, le résidu Arg67 du monomère C se situe non loin du groupement phosphate du CoA fixé dans le site actif du monomère A. Les interactions définies entre le CoA et la *Bs\_MSDH* sont récapitulées dans la Figure .



**Figure III.28 :** Représentation de la molécule de CoA dans le site actif dans la structure CoA-NAD. Les chaînes principales sont représentées en lacet. Le code couleur est le suivant : rouge pour la monomère A, jaune pour le monomère B et vert pour le monomère C. Les monomères A et B constituent un dimère du tétramère.

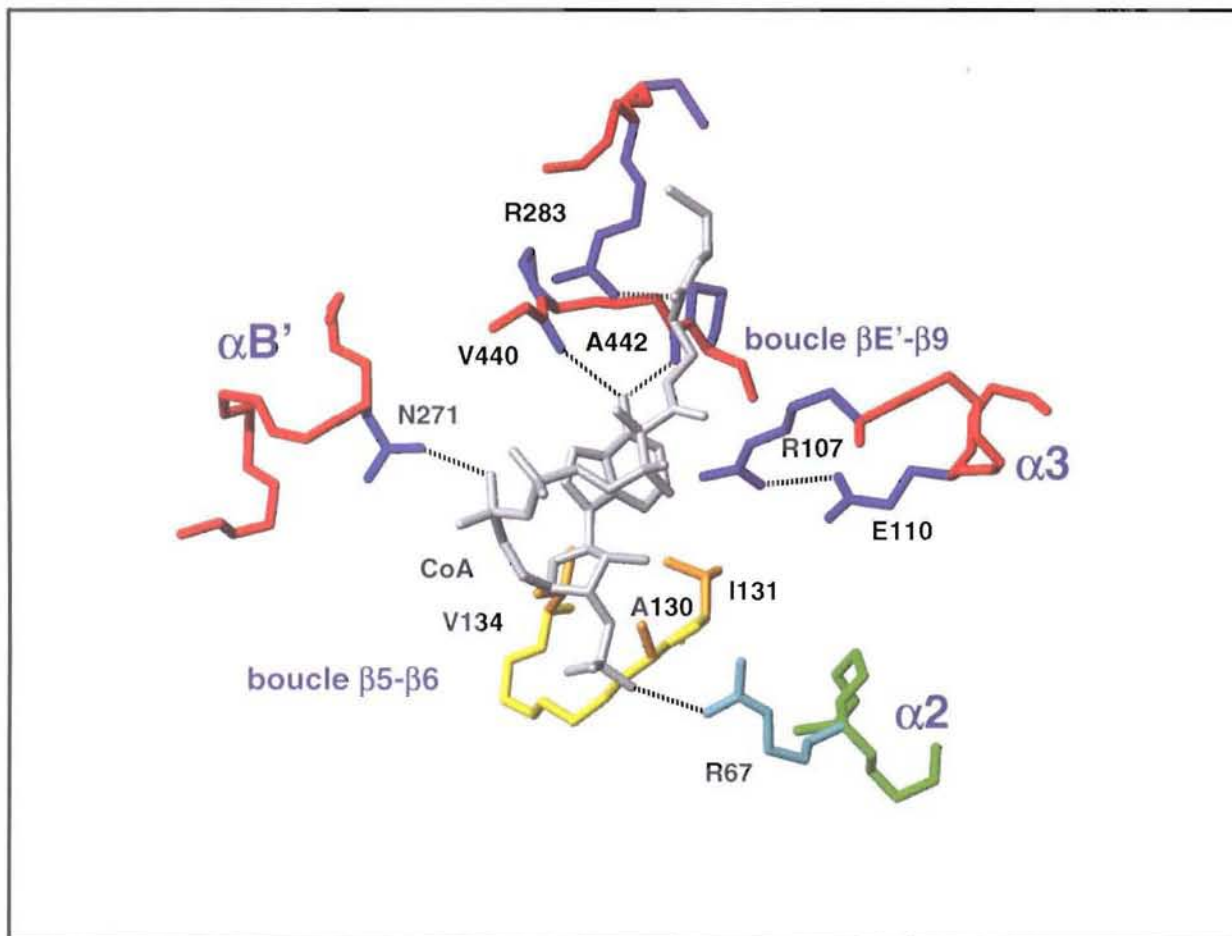


Figure III.29 : Description des interactions entre la *Bs\_MSDH* et le CoA.

Les chaînes principales sont représentées en lacet. Le code couleur est le suivant : rouge pour le monomère A, jaune pour le monomère B et vert pour le monomère C. Les monomères A et B constituent un dimère du tétramère.

## 2.6. Structure du complexe CoA

Les cristaux de la *Bs\_MSDH* complexée au coenzymeA ont été obtenus par cocristallisation. L'enzyme est préalablement incubée 30 minutes à 30°C dans le tampon phosphate (50 mM, pH 8,2) supplémenté en CoA (40 mM). Les conditions d'obtention des cristaux sont identiques à celles utilisées pour former les cristaux d'holoenzyme.

La structure de ce complexe, appelée structure CoA, est un homotétramère dont les monomères sont superposables les uns aux autres par rotation de 180° selon trois axes 2 perpendiculaires deux à deux (Tableau ). La structure est comparable à celle de l'Holo-2, 0,191 Å de rms (superposition des monomères A). Les extrémités N-terminale (Met1 et Ala2) et C-terminale (Asn487) n'ont pu être modélisées en raison de l'absence de densité électronique.

Monomères	A	B	C	D
A		0,303	0,278	0,193
B			0,213	0,286
C				0,259
D				

**Tableau III.30 :** Valeurs des écarts quadratiques moyens en Å correspondant à la superposition des monomères de la structure du complexe CoA.

Les superpositions des monomères entre eux ont été effectuées uniquement par superposition des atomes de carbone  $\alpha$ .

## 2.6.1. Les particularités de la structure CoA

### 2.6.1.1. Le site de fixation du NAD<sup>+</sup>

La carte de densité électronique résiduelle *fo-fc* révèle que les quatre sites de fixation du cofacteur sont occupés par deux groupements sulfate. Ceux-ci n'occupent pas la même position que les groupements phosphate du cofacteur. Ils adoptent les mêmes positions et forment les mêmes interactions que celles observées dans la structure Mmsa-1 (voir paragraphe 2.4.2.1 page 89 et Figure III.23 page 90). Détail remarquable, la chaîne latérale du résidu Arg334 est bien définie dans les cartes de densité électronique contrairement à ce qui est observé dans la structure Mmsa-1. Cette différence peut s'expliquer par les modes opératoires d'obtention des cristaux. Dans le cas de la structure Mmsa-1, les groupements sulfate ne peuvent se placer dans le site de fixation du NAD<sup>+</sup> qu'après le départ de celui-ci. Or, les cristaux sont obtenus suite à l'incubation de l'enzyme avec du cofacteur, puis le substrat est diffusé dans les cristaux. Pour la structure CoA, les groupements sulfate de la structure CoA peuvent se placer dans le site dès l'établissement de la goutte de cristallisation, bien avant la formation des cristaux.

### 2.6.1.2. Le site de fixation du CoA

La carte de densité résiduelle *fo-fc* révèle la présence d'une molécule de CoA dans le site actif de chaque monomère. Seul le motif adénosine est bien défini dans les cartes de densité électronique. Le CoA adopte les mêmes conformation et position que celles déterminées dans la structure CoA-NAD (voir paragraphe 2.5.2.2 page 93 et Figure page 95). Cette structure confirme que le CoA se fixe dans le site actif bien que le NAD<sup>+</sup> ne soit pas présent. La limite de résolution de la structure ainsi que la qualité de la carte de densité électronique n'apportent pas d'informations complémentaires à celles obtenues par la structure CoA-NAD sur la fixation du CoA.

## 3. Modélisation moléculaire

### 3.1. Objectif de la modélisation moléculaire

Les structures de l'holoenzyme et l'acylenzyme ont été respectivement obtenues en 2003 et 2005. Dans l'intervalle, des travaux de modélisation ont été entrepris pour tenter de déterminer la stéréospécificité de l'enzyme vis-à-vis du MMSA. Trois directions de travail ont été envisagées pour répondre à cette interrogation :

- 1 – Le « docking » moléculaire du substrat.
- 2 – La modélisation moléculaire sur un intermédiaire réactionnel.
- 3 – La dynamique moléculaire avec le substrat placé dans le site actif.

Après considération du mécanisme enzymatique de la *Bs*\_MSDH et de la structure à notre disposition, la modélisation moléculaire d'un intermédiaire réactionnel a été retenue. Le choix reste à faire entre l'intermédiaire thiohémiacétal (qui précède le transfert d'hydrure) et l'acylenzyme. Celui-ci s'est porté sur l'intermédiaire thiohémiacétal étant donné les suppositions (par les connaissances enzymologiques sur la *Bs*\_MSDH) de stabilisation et de position de ce dernier dans le site actif. En effet, l'atome d'oxygène non protoné de cet intermédiaire est stabilisé sous sa forme hydroxylate par le site oxyanion (Figure ). Cet atome doit être à une distance compatible avec la formation de liaisons hydrogène avec le  $-NH_2$  de la chaîne latérale du résidu Asn153 et le  $-NH-$  de la chaîne principale du résidu Cys284. De plus, l'atome d'hydrogène impliqué dans le transfert d'hydrure doit être orienté en direction du carbone NC4 du nicotinamide du  $NAD^+$  sur lequel il est par la suite transféré. De ce fait, le modèle obtenu par modélisation moléculaire peut être analysé et critiqué plus aisément.



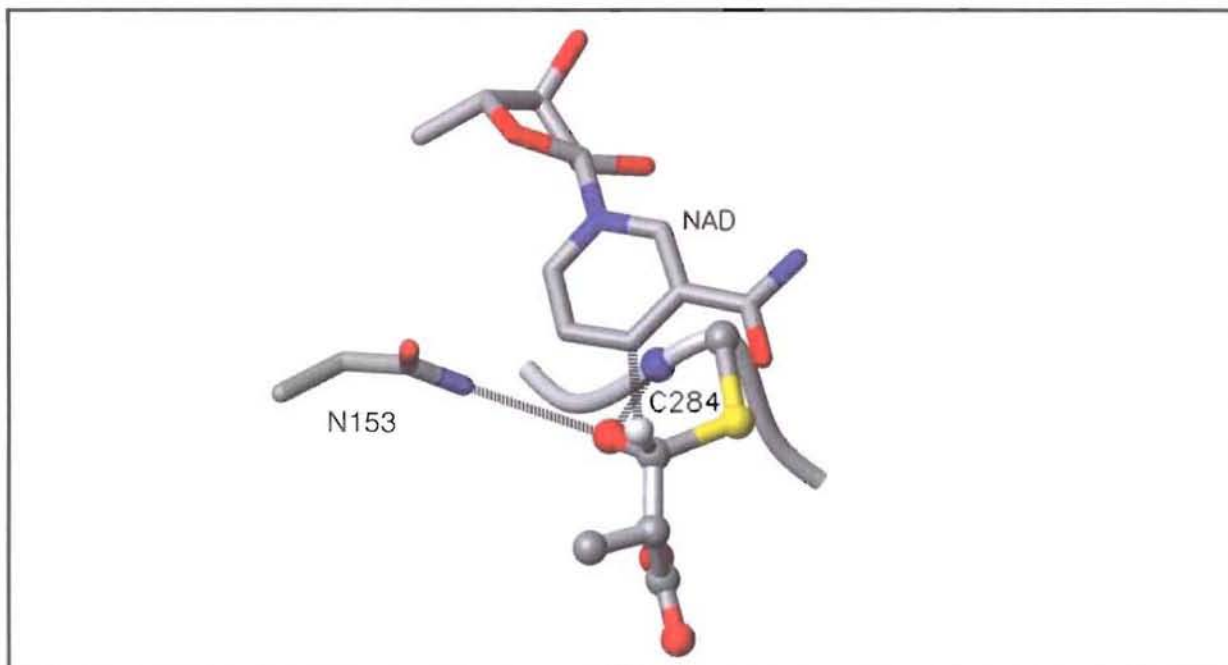


Figure III.31 : Interactions supposées pour la stabilisation de l'intermédiaire thiohémiacétal en vue de la modélisation moléculaire.

## 3.2. Modélisation des intermédiaires *R*- et *S*-

### 3.2.1. Préparation en vue de la modélisation

Le logiciel Amber version 8.0 (Case *et al.*, 2004) a été utilisé pour effectuer la modélisation moléculaire des intermédiaires *R*- et *S*- de l'hémithioacétal. Les bibliothèques d'acides aminés de ce logiciel ne proposent pas de résidu cystéyl acylé et celles d'atomes ne définissent pas d'atome d'oxygène chargé négativement lié à un atome de carbone. Les bibliothèques de topologie et de paramètres du résidu cystéyl acylé par le MMSA ont été préalablement créées en utilisant le programme *leap* du logiciel. Ce programme ne calcule pas les charges des atomes. Celles-ci ont été calculées avec le logiciel Gaussian 98 (Frisch *et al.*, 1998) avec une charge globale de « -2 » pour un acide aminé modifié qui correspond à une « cystéine acylée » par le MMSA. Cette charge globale résulte de l'addition de la charge négative de la fonction carboxylate terminale et de celle de l'atome d'oxygène lié au carbone en hybridation  $sp_3$ . La géométrie des acides aminés modifiés *R*- et *S*- a été au préalable optimisée par le logiciel Gaussian 98.

### 3.2.2. Minimisation des modèles

#### 3.2.2.1. La procédure de minimisation

Le programme *sander* en mode minimisation du logiciel Amber a été utilisé pour minimiser les modèles de la *Bs\_MSDH*. Les algorithmes du « steepest descent » et du gradient conjugué ont été successivement employés. Les paramètres de minimisation sont décrits dans le Tableau .

Paramètres de minimisation	Valeurs assignées	Descriptions des paramètres
imin	1	mode minimisation
ntb	0	
maxcyc	3000	nombre du cycles de SD et GC
ncyc	2000	nombre de cycles de SD
scee	1,2	
dielc	4,0	constante diélectrique
cut	12,0	cut off
ntmin	1	

**Tableau III.32 :** Description des critères de minimisation des modèles des stéréoisomères de l'intermédiaire thiohémicétal.

Les termes « SD » et « GC » désignent respectivement les algorithmes de minimisation « steepest descent » et gradient conjugué. Pour le « cut off » se reporter au chapitre *Matériel & Méthodes*.

#### 3.2.2.2. Modèles obtenus par la modélisation moléculaire

Les modèles obtenus à l'issu de l'affinement vérifient les critères définis au préalable. L'atome d'oxygène, chargé négativement porté par le premier atome de carbone asymétrique, est orienté vers la chaîne latérale du résidu Asn153. L'atome d'hydrogène porté par le même atome de carbone est orienté en direction du cycle nicotinamide du NAD<sup>+</sup> et la distance qui le sépare de l'atome de carbone NC4 est compatible avec le transfert d'hydrure.

Les modèles obtenus révèlent que la couronne de résidus aminoacyls hydrophobes du site actif est compétente pour stabiliser le groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) de la cystéine acylée. Cette couronne est composée des résidus Phe154, Met157, Trp161, Arg283 (la partie aliphatique de la chaîne latérale), Met285 et Phe449. Cette modélisation semble indiquer que les deux stéréoisomères de l'intermédiaire thiohémicétal peuvent exister dans le site actif de l'enzyme (Figure ).

Quel que soit le modèle, aucune liaison hydrogène n'a été constatée entre la fonction acide et l'enzyme. Les chaînes latérales des résidus Arg107 et Arg283 adoptent des conformations différentes selon le modèle. Elles sont à proximité de la fonction acide sans pour autant être en interaction avec les atomes d'oxygène de celle-ci.



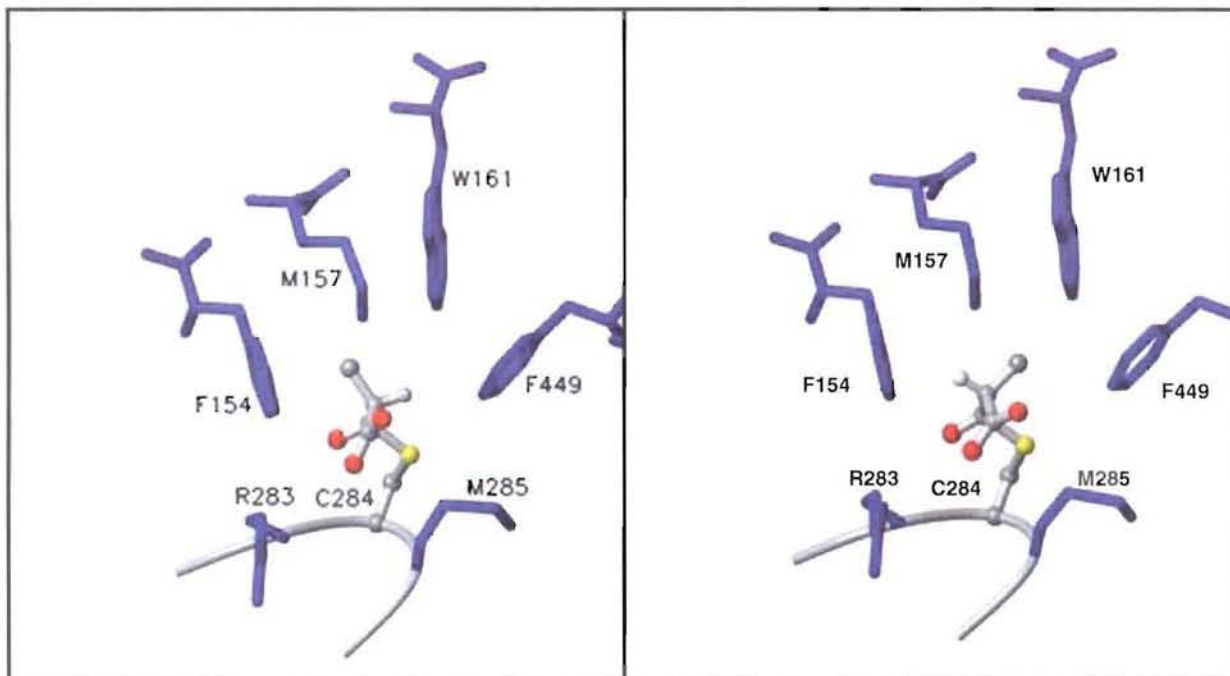
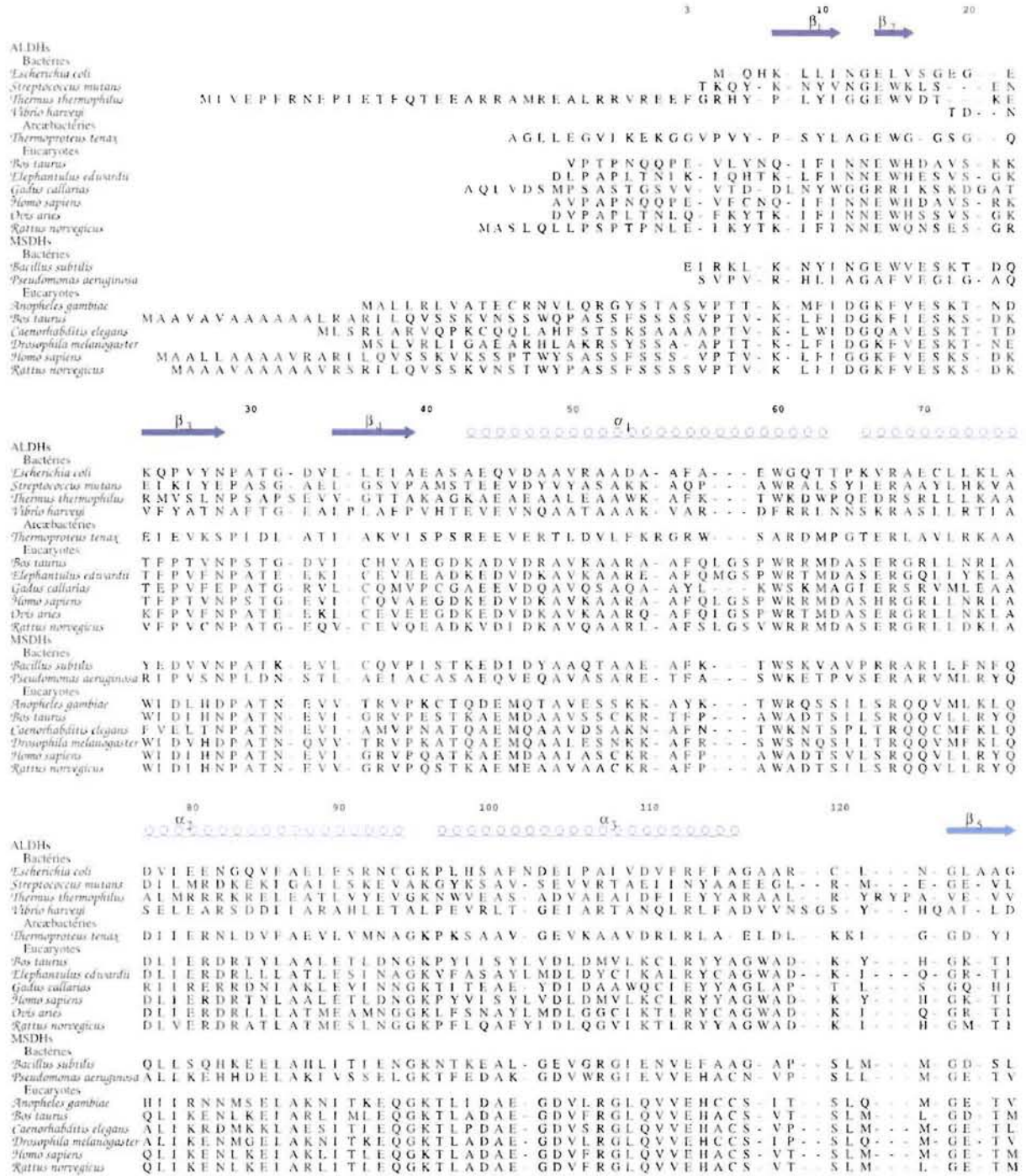


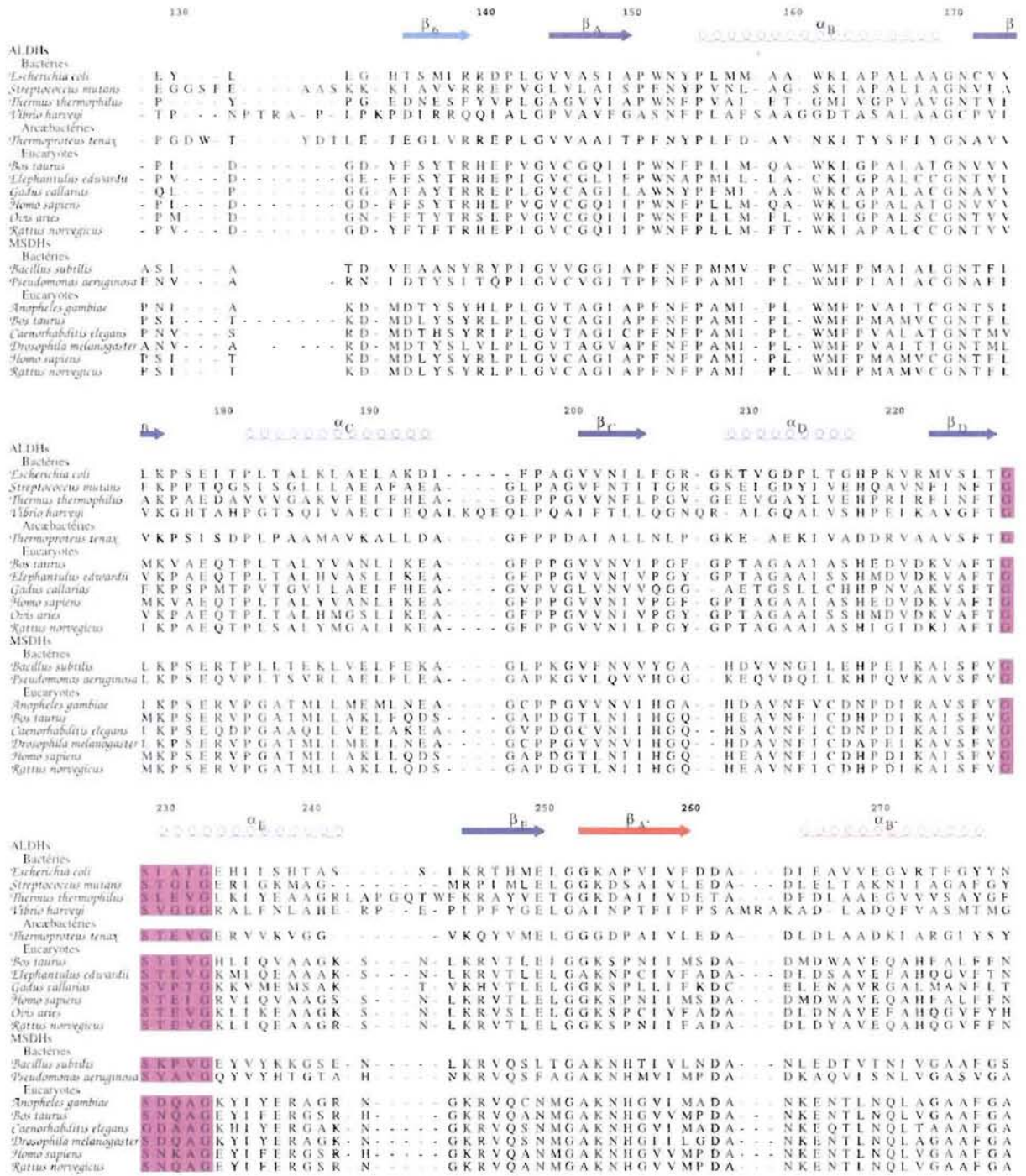
Figure III.33 : Résultats de la modélisation des stéréoisomères *R*- et *S*- de l'intermédiaire thiohémiacétal.  
La figure de gauche représente le stéréoisomère *R*- tandis que celle de droite représente le stéréoisomère *S*-.

## 4. Alignement de structures primaires

L'alignement de structures primaires présenté ci-dessous a été réalisé avec le logiciel Modeller (Sali *et* Blundell, 1993; Marti-Renon *et al.*, 2000 ; Fiser *et al.*, 2000). L'alignement de la structure primaire de la *Bs*\_MSDH avec celles des aldéhydes deshydrogénases (disponibles dans le PDB) résulte de l'alignement des structures tridimensionnelles de ces enzymes. Les structures primaires de méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénases ont été prises dans la banque de données Swiss-Prot TrEMBL.

Le logiciel Alscript (version locale) a été utilisé pour représenter l'alignement (Barton, 1993).







	280	290	300	310	320	330	$\alpha_4$
		$\beta_{1c}$		$\alpha_C$			
ALDHs							
Bactéries							
<i>Escherichia coli</i>	A G Q D	T A A C R I Y A O K G	I Y D T L V E K L	G A A V A T L K S G A P	D D E S T E L G F L S S L A H L E R V G K A		
<i>Streptococcus mutans</i>	S G Q R	T A V K R V L V M E S	V A D E I V E K I	R E K V I A L T I G N P E D D	A D I T P L I D T K S A D Y V I G L		
<i>Thermus thermophilus</i>	Q G Q K	S A A S R L I L T Q G	A Y E P V L F R V L K	R A E R L S V G P A E E N	P D L G P V V S A E Q E R K V L S Y		
<i>Vibrio harveyi</i>	C G Q F	T K P G V V F A L N T P	E T Q A F I E T A Q S L I	R Q Q S P - - - - -	S - T L L T P G I R D S Y Q S Q		
Acétabactéries							
<i>Thermoproteus tenax</i>	A G Q R	D A I K I V L A E R P	V Y G K L V E E V A K R L S	S L R V G D P R D P T V D V G P L I	S P S A V D E M M A A		
Eucaryotes							
<i>Bos taurus</i>	Q G Q C	C A G S R T F V Q I D	I Y A E F V E R S	V A R A K S R V V G N P F	D S R T E Q G P Q V D E T Q F K K V I G Y		
<i>Elephantulus edwardsi</i>	Q G Q S	I A A S R L I V F E A	I Y D E F V Q R S	V E R A K K Y V F G N P L T	P G V N I G P Q I N K A Q H N K I M E L		
<i>Galus callarius</i>	Q G Q V	T N G T R V I V Q K E	I M P Q I L E E L V	K R T K A I V V G D P L L T	E T R M G G L I S K P Q L D K V I G F		
<i>Homo sapiens</i>	Q G Q C	C A G S R T F V Q E D	I Y D E F V E R S	V A R A K S R V V G N P F	D S K T E O G P Q V D E T Q F K K I L G Y		
<i>Ovis aries</i>	Q G Q C	I A A S R I F V E E S	I Y D E F V R R S	V E R A K K Y V L G N P L T	P G V S Q G P Q I D R E Q Y E K I L D L		
<i>Rattus norvegicus</i>	Q G Q C	T A G S R I F V E E S	I Y E E F V K R S	V E R A K K R I V G S P F	D P T T E Q G P Q I D K K Q Y N K I L E L		
MSDH							
Bactéries							
<i>Bacillus subtilis</i>	A G E R	M A C A V V T V E E G	I A D E F M A K I	Q E K V A D I K I G N G L D D G V F L	G P V I R E D N K K R T I S Y		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A G Q R	M A I S - V A V I V G	A A R E W I P E I R D A L	A K V R P G P W D S G A S Y G P V I	N P Q A K A R I E R I		
Eucaryotes							
<i>Anopheles gambiae</i>	A G Q R	M A L S - T A V F V G	E A R N W I P D L V E R	A R K L K V N A G H L P	G T D L G P V I S P O S K Q R I N E I		
<i>Bos taurus</i>	A G Q R	M A L S - T A I L V G	E A K K W L P E L V E R	A K K L R V N A G D Q P	G A D L G P L I T P Q A K E R V C N L		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	A G Q R	M A L T - T A V I V G	E A R A W L P E L V E R	A K K L R V N A G W K P	D T D I G P L I S K Q S K A R V L R L		
<i>Drosophila melanogaster</i>	A G Q R	M A L S - T A V I V G	D A Q A W I P D L V E R	A K K L R V N A G H V	P G T D V G P I S A A S R Q R I N D L		
<i>Homo sapiens</i>	A G Q R	M A L S - T A V I V G	E A K K W L P E L V E H	A K N L R V N A G D Q P	G A D L G P L I T P Q A K E R V C N L		
<i>Rattus norvegicus</i>	A G Q R	M A L S - T A V I V G	E A K K W L P E L V E R	A K N L R V N A G D Q P	G A D L G P L I T P Q A K E R V C N L		

	340	350	360	370	380
		$\beta_2$		$\beta_3$	$\alpha_5$
ALDHs					
Bactéries					
<i>Escherichia coli</i>	V E E A K A T G H I	K V I T G G E K - R K - - - -	G N G Y Y Y A P T L L	A G A L - - - -	Q D D - A I V Q K E V F G P
<i>Streptococcus mutans</i>	I N D A N D K G -	A T A L I E I K R - E - - - -	G - N L I C P I L I	F D K V T - - - -	T D M - R I A W E E E P F G P
<i>Thermus thermophilus</i>	I E I G K N E -	Q Q L V L G G K R - L E - - - -	G E G Y F I A P T V F	T E V P - - - -	P K A - R I A Q E E I F G P
<i>Vibrio harveyi</i>	V V S R G S D D	G I D Y T F S - Q - - - -	A E - - - -	S - P C V A S A L F V -	T S S E N W R K H P A W - E E E I F G P
Acétabactéries					
<i>Thermoproteus tenax</i>	I E D A V E K G -	G R V L A G G R R - L G - - - -	P - T Y V Q P T L V E -	A P A D R V K D M -	V L Y K R E V F A P
Eucaryotes					
<i>Bos taurus</i>	I K S G K E E G -	I K L I C G G G A - A A - - - -	D R G Y F I Q P T V F	G D L Q - - - -	D G M - T I A K E E I F G P
<i>Elephantulus edwardsi</i>	I E S G K K E G -	A K L I C G G G P - W G - - - -	N K G Y F I Q P T V F	S N V T - - - -	D D M - R I A K E E I F G P
<i>Galus callarius</i>	V A Q A K K E G -	A R V L C G G E P - L T P S D P K L	K N G Y F M S P C V L	D N C R - - - -	D D M - T C Y K E E I F G P
<i>Homo sapiens</i>	I N T G K O E G -	A K I L C G G G I - A A - - - -	D R G Y F I Q P T V F	G D V Q - - - -	D G M - T I A K E E I F G P
<i>Ovis aries</i>	I E S G K K E G -	A K L I C G G G P - W G - - - -	N K G Y F I Q P T V F	S D V T - - - -	D D M - R I A K E E I F G P
<i>Rattus norvegicus</i>	I Q S G V A E G -	A K I E C G G K G - L G - - - -	R K G F E I E P T V F	S N V T - - - -	D D M - R I A K E E I F G P
MSDH					
Bactéries					
<i>Bacillus subtilis</i>	I E K G L E E G -	A R L V C D G R E N V S - - - -	D D G Y F V G P T I	F D N V T - - - -	T E M - T I W K D E I F A P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I G Q G V E E G -	A Q I L I D G R G Y K V - - - -	E G Y P D G N W V G P T	L F A G V R - - - -	P D M - A I Y R E E V F G P
Eucaryotes					
<i>Anopheles gambiae</i>	V E S G A K E G -	A K I V L D G R N I K V - - - -	E G F E K G N F V G P T	I I S D V T - - - -	P N M - K C Y T E E I F G P
<i>Bos taurus</i>	I E S G K K E G -	A S I L I D G R S I K V - - - -	K G Y E N G N I V G P T	I I S N V K - - - -	P N M - T C Y K E E I F G P
<i>Caenorhabditis elegans</i>	I E S A K K E G -	A Q V P L D G S N I T V - - - -	P G F E N G N F V G P T	I L A G V K - - - -	P N M - T C Y T E E I F G P
<i>Drosophila melanogaster</i>	I E S G Y K E G -	A K I L I D G R K I T V - - - -	P G Y E D G Y I V G P T	I L S D V T - - - -	P S M - K C Y T E E I F G P
<i>Homo sapiens</i>	I D S G T K E G -	A S I L I D G R K I K V - - - -	K G Y E N G N F V G P T	I I S N V K - - - -	P N M - T C Y K E E I F G P
<i>Rattus norvegicus</i>	I D S G A K E G -	A S I L I D G R K I K V - - - -	K G Y E N G N F V G P T	I I S N V K - - - -	P S M - T C Y K E E I F G P

	390	400	410	420	430
	$\beta_2$	$\alpha_D$	$\beta_{1D}$	$\alpha_E$	$\beta_2$
ALDHs					
Bactéries					
<i>Escherichia coli</i>	V V S V T P F D N E E	Q V V N W A N D S Q - Y G L A S S V W T R - -	D V G R A H R V S A R L - -	Q Y G C T W V N T - H	
<i>Streptococcus mutans</i>	V L P I I R V T S V E E	A I E I S N K S E - Y G L Q A S I F T N - -	D F P R A F G I A E Q L - -	E V G I V H I N N - - K	
<i>Thermus thermophilus</i>	V I S V I R V K D F A F A I	E V A N D T P - Y G L T G G V Y S R - -	K R E H L E W A R R E F - -	H V G N I Y F N R - K	
<i>Vibrio harveyi</i>	Q S L I V V C E N V A D M L	S L S E M L A - G S L T A T I H A T E E D Y P	Q V S Q L I P R L E E I	A G R L V F N G - W	
Acétabactéries					
<i>Thermoproteus tenax</i>	V A S A V E V K D I D Q A I	F L A N G R P - Y G L D A A V F G R - -	D V V K I R R A V R L L - -	E V G A I Y I N D - M	
Eucaryotes					
<i>Bos taurus</i>	V M Q I L L K E K S M E F	V V G R A N N S K - Y G L A A A V F T K - -	D I D K A N Y L S Q A L - -	Q A G T V W V N C - Y	
<i>Elephantulus edwardsi</i>	V Q Q I M K F K S L D E V I	K R A N N T Y - Y G L V A G V F T K - -	D L D K A V T V S S A L - -	Q A G T V W V N C - Y	
<i>Galus callarius</i>	V M S V L P F D T E E E V L	Q R A N N T F - F G L A S G V F T R - -	D I S R A H R V A A N L - -	E A G T C Y I N T - Y	
<i>Homo sapiens</i>	V M Q I L L K F K T I E E V	V G R A N N T - Y G L A A A V F T K - -	D L D K A N Y L S Q A L - -	Q A G T V W V N C - Y	
<i>Ovis aries</i>	V Q Q I M K F K S I D D V I	K R A N N T F - Y G L S A G I F T N - -	D I D K A I T V S S A L - -	Q S G T V W V N C - Y	
<i>Rattus norvegicus</i>	V Q E I L R F K T M D E V I	E R A N N S D F G L - V A A V F T N - -	D I N K A L M V S S A M - -	Q A G T V W I N C Y G	
MSDH					
Bactéries					
<i>Bacillus subtilis</i>	V L S V I R V K N L K E A I	E I A N K S E - F A N G A C L F T S - -	N S N A I R Y F R E N I - -	D A G M L G I N L - G	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	V I C L A E V D S L E Q A I	R L I N E S P - Y G N G T S I F T S - -	S G A A A R I F Q H H I - -	E V G Q V G I N I - P	
Eucaryotes					
<i>Anopheles gambiae</i>	V I V C L S V D T I D E A I	E L I N N N P - Y G N G T A I F T T - -	N G A T A R K F V N D I - -	D V G Q V G V N V - P	
<i>Bos taurus</i>	V I V V L E I D T I D E A I	K I V N D N P - Y G N G T A I F T T - -	N G A T A R K Y S H L V - -	D V G Q V G V N V - P	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	V I V V M E A E N I N E A I	E I I N N N P - Y G N G T A I F T T - -	N G A T A R K F T N E V - -	D V G Q I G I N V - P	
<i>Drosophila melanogaster</i>	V I V I L K A D T L D D A I	G I V N A N P - Y G N G T A V F T T - -	N G A A R K F V N E I - -	D A G Q V G V N V - P	
<i>Homo sapiens</i>	V I V L E T E T L D E A I	Q I V N N P - Y G N G T A I F T T - -	N G A T A R K Y A H L V - -	D V G Q V G V N V - P	
<i>Rattus norvegicus</i>	V I V V L E T E T L D E A I	K I V N D N P - Y G N G T A I F T T - -	N G A I A R K Y A H M V - -	D V G Q V G V N V - P	

	440		450		460		470		480
				β <sub>9</sub>			α <sub>6</sub>		β <sub>10</sub>
<p><b>ALDH8</b>                  Bactéries  <i>Escherichia coli</i> - F M L - V S - - E M P H G G Q K L S G - Y - - G K D M S L Y G L E D Y T V V R H V M V K H  <i>Streptococcus mutans</i> - T Q R G T D - - N - F P F L G A K K S G - A - - G I Q G V K Y S I E A M T T V K S V V F D I K  <i>Thermus thermophilus</i> I T G A - I V - - G V Q P F G G F K L S G T - N A K T G A L D Y L R I F L E M K A V A E R F  <i>Vibrio Harveyi</i> P T G V - E V G - Y A M V H G G P Y P A S T H S A S T S V G A E A I H R W L R P V A Y Q A L P E S L I F D S L K A F N P                  Actinobactéries  <i>Thermoplasma tenax</i> - P R H - G I - G Y - Y P F G G R K K S G - V - - F R E G I G Y A V E A V T A Y K T I V F N Y K G K G V W K Y F                  Eucaryotes  <i>Bos taurus</i> - D V F - G A - - Q S P F G G Y K L S G - S - - G R E L G E Y G L Q A Y T E V K T V T V R V P Q K N S  <i>Elephantulus edwardsii</i> - I A A - S A - - Q S P A G G F K M S G - H - - G R E M G E Y G I H E Y T E V K T V T M K I S E R N S  <i>Galus gallinarius</i> - S I S - P V - - E Y P F G G Y K M S G - F - - G R E N G Q A T V D Y Y S Q L K T V I V E M G D V D S L F  <i>Homo sapiens</i> - D V F - G A - - Q S P F G G Y K M S G - S - - G R E L G E Y G L Q A Y T E V K T V T V K V P Q K N S  <i>Ovis aries</i> - S V V - S A - - Q C P E G G F K M S G - N - - G R E L G E Y G F H E Y T E V K T V T I K I S Q K N S  <i>Rattus norvegicus</i> - E F G L R E Y S E V K T V T V K I P Q K N S</p>									
<p><b>MSDH</b>                  Bactéries  <i>Bacillus subtilis</i> - V P A P M A - - F - F P E S G W K S S F F G - T I H A N G K D S V D F Y T R K K V V T A R Y P A P D F  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - I P V P L P - - F - F S F T G W K G S F Y G - D L H A Y G K Q G V R F Y T E T K I V T A R W F D S D S V A G T N F S I                  Eucaryotes  <i>Anopheles gambiae</i> - I P V P L P - - M - F S F T G S R G S F L G - D C H F Y G K Q G I K F Y T Q T K T V T Q L W R E G D - V S H T K A A V  <i>Bos taurus</i> - I P V P L P - - M - F S F T G S R A S F R G - D T N F Y G K Q G I Q F Y T Q L K T I T S Q W K E E D - A S L S S P A V  <i>Ctenorhynchus elegans</i> - I P V P L P - - M - F S F T G S R G S F L G - D L N F Y G K A G I Q F Y T Q W K T V T Q Y W N E S - - L T E L K P Q M  <i>Drosophila melanogaster</i> - I P V P L P - - M - F S F T G T R G S F R G - D H H F Y G K Q G I K F Y T Q T K T V T Q L W R K T D - V T H T Q A A V  <i>Homo sapiens</i> - I P V P L P - - M - F S F T G S R S S F R G - D T N F Y G K Q G I Q F Y T Q L K T I T S Q W K E E D - A T L S S P A V  <i>Rattus norvegicus</i> - I P V P L P - - M - F S F T G S R S S F R G - D T N F Y G K Q G I Q F Y T Q L K T I T S Q W K E E D - A T L S S P A V</p>									
<p><b>ALDH8</b>                  Bactéries  <i>Escherichia coli</i>  <i>Streptococcus mutans</i>  <i>Thermus thermophilus</i>  <i>Vibrio harveyi</i> I F I A R A V D G K A A                  Actinobactéries  <i>Thermoplasma tenax</i>                  Eucaryotes  <i>Bos taurus</i>  <i>Elephantulus edwardsii</i>  <i>Galus gallinarius</i>  <i>Homo sapiens</i>  <i>Ovis aries</i>  <i>Rattus norvegicus</i>  <b>MSDH</b>                  Bactéries  <i>Bacillus subtilis</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Q M R                  Eucaryotes  <i>Anopheles gambiae</i> A M P T M K  <i>Bos taurus</i> V M P T M G R  <i>Ctenorhynchus elegans</i> S F P Q L K  <i>Drosophila melanogaster</i> A M P T M K  <i>Homo sapiens</i> V M P T M G R  <i>Rattus norvegicus</i> V M P T M G R</p>									

# *Discussion*

# Sommaire

<b>1. PREAMBULE.....</b>	<b>106</b>
1.1. MECANISME ENZYMATIQUE DES ALDHS .....	106
1.2. MECANISME ENZYMATIQUE DE LA <i>BS</i> _MSDH .....	107
<b>2. L'APPORT DES STRUCTURES RESOLUES DE LA <i>BS</i>_MSDH VERSUS SON MECANISME ENZYMATIQUE.....</b>	<b>107</b>
<b>3. CE QUI DISTINGUE LA <i>BS</i>_MSDH DES ALDHS AU NIVEAU STRUCTURAL .....</b>	<b>110</b>
3.1. L'ASSOCIATION OLIGOMERIQUE .....	110
3.2. LE SITE DE FIXATION DU NAD <sup>+</sup> .....	112
3.3. LE SITE ACTIF.....	114

Le travail de thèse s'est organisé dans l'objectif de découvrir les éléments structuraux qui sont probablement à l'origine du mécanisme enzymatique singulier de la méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis*, par rapport au mécanisme consensus établi pour les aldéhydes deshydrogénases non CoA-dépendantes. Les mécanismes enzymatiques des ALDHs et de la *Bs*\_MSDH sont récapitulés dans le préambule. Cette discussion ne peut se faire sans la connaissance des acides aminés conservés. Aussi, l'alignement des structures primaires entre les ALDHs et les MSDHs, est présenté à la fin du chapitre *Résultats*.

# 1. Préambule

## 1.1. Mécanisme enzymatique des ALDHs

Les ALDHs catalysent l'oxydation d'aldéhydes en leurs acides correspondants par attaque nucléophile d'un résidu cystéyl (Cys302) conservé, du site actif sur la fonction chimique réactive du substrat. Le mécanisme cinétique est de type séquentiel ordonné à deux étapes et avec passage par un intermédiaire réactionnel covalent, l'acylenzyme. Le substrat se fixe uniquement après la fixation du cofacteur, NAD(P)<sup>+</sup>, pour former un complexe ternaire compétent pour réaliser l'étape d'acylation. Lors de cette première étape, l'attaque nucléophile est assistée par un site oxyanion défini principalement par la chaîne latérale du résidu asparginyl conservé (Asn169) et par le -NH- de la chaîne principale du résidu Cys302. L'attaque nucléophile conduit à la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal, tétraédrique, puis à celle d'un intermédiaire thioacylenzyme et du NADH. Dans l'enzyme, le cofacteur réduit n'occupe plus le même site que celui de la forme oxydée. Dans cet état conformationnel, le cofacteur n'entrave pas le processus catalytique de désacylation. Lors de cette seconde étape, une molécule d'eau activée par un résidu glutamyl conservé (Glu268), effectue une attaque nucléophile sur l'acylenzyme pour former l'acide. La molécule de cofacteur réduit (NAD(P)H) est libérée en dernier. Pour les ALDHs tétramériques, la désacylation est l'étape limitante de la catalyse.



## 1.2. Mécanisme enzymatique de la *Bs*\_MSDH

La *Bs*\_MSDH appartient à la famille des aldéhyde deshydrogénases. Elle a la particularité de produire des acyls transthioestérifiés par une molécule de coenzymeA à partir d'aldéhydes, et de décarboxyler ses substrats. Au niveau de la structure primaire, la *Bs*\_MSDH se distingue des ALDHs par l'absence du résidu Glu268 essentiel à l'étape de désacylation. La cinétique enzymatique de la *Bs*\_MSDH est de type ping-pong à trois étapes principales, l'acylation, la décarboxylation et la désacylation. Cette première étape procède selon le même schéma que celui des ALDHs à l'exception de l'issue de la réaction. L'étape d'acylation s'achève par le départ du NADH en plus de la formation de l'acylenzyme. Deux molécules de NADH sont libérées par molécule d'enzyme. Aussi, la *Bs*\_MSDH présente une réactivité de demi-site. Le départ du NADH est suivi par la décarboxylation de l'acylenzyme qui est l'étape limitante de la catalyse. L'acylation et la décarboxylation ne nécessitent pas la présence de CoA. Le produit est libéré, suite à la fixation du CoA, par attaque nucléophile de celui-ci sur l'acylenzyme lors de l'étape de désacylation.

## 2. L'apport des structures résolues de la *Bs*\_MSDH versus son mécanisme enzymatique

La structure de la *Bs*\_MSDH sous sa forme holo-enzyme (Holo-2) est la première structure d'aldéhyde deshydrogénase CoA-dépendante et décarboxylante. Elle confirme que le site actif ne présente pas de résidu qui pourrait jouer le rôle de base, à l'instar du résidu Glu268, pour activer une molécule d'eau nécessaire à l'étape de désacylation. Les structures Mmsa-1, CoA-NAD et CoA correspondent respectivement aux structures de l'acylenzyme, du complexe enzyme/NAD<sup>+</sup>/CoA et du complexe enzyme/CoA.

La structure de l'holoenzyme confirme que le NAD<sup>+</sup> se fixe bien dans le site de fixation supposé. La densité électronique montre que les quatre sites du NAD<sup>+</sup> sont occupés et que le taux d'occupation des molécules de cofacteurs est de 1. Ce résultat est inattendu sachant que la *Bs*\_MSDH présente une réactivité de demi-site. En effet, deux sites occupés sur les quatre ou un taux d'occupation moyen de ½ au global étaient attendus. Ce résultat peut être expliqué par le temps de mise en contact entre l'enzyme et le NAD<sup>+</sup> qui est de l'ordre du jour alors que, dans le cas des tests enzymatiques, ce temps est de l'ordre de la demi-heure. La densité est continue tout le long de la molécule. Le nicotinamide est bien défini dans la densité électronique. Il adopte une conformation compatible avec le transfert d'hydrure.

Les cristaux d'acylenzyme ont été obtenus par diffusion du MMSA dans les cristaux d'holoenzyme. La densité électronique de la structure déterminée indique que les quatre monomères sont acylés par le substrat et que les quatre molécules de  $\text{NAD}^+$  ne sont plus présentes sur l'enzyme. L'absence de cofacteur dans la structure de l'acylenzyme est un résultat structural qui va dans le sens du mécanisme enzymatique à cinétique de type ping-pong où le cofacteur une fois réduit est libéré par l'enzyme. Quatre acyls avec un taux d'occupation de 1 ont été modélisés dans le tétramère. Tout comme pour l'occupation des sites de fixation du cofacteur, la réactivité de demi-site devait se traduire par un taux d'occupation moyen de  $\frac{1}{2}$  ou par l'acylation de deux résidus de « cystéine catalytique » par tétramère. Les conditions expérimentales sont probablement à l'origine de la divergence des résultats obtenus. La fonction carbonyle de l'acyl est orientée vers le résidu Asn153 qui correspond au résidu asparaginyl du site oxyanion chez les aldéhyde deshydrogénases. Cette fonction est également stabilisée par liaison hydrogène avec le  $-\text{NH}-$  de la chaîne principale de la « cystéine catalytique » (Cys284/302). La structure révèle clairement que l'acylenzyme est toujours carboxylée. Cette structure va dans le sens de la cinétique enzymatique où l'étape de décarboxylation est l'étape limitante de la réaction. Cette structure répond également à une question à laquelle il est difficile de répondre par des tests enzymatiques : la stéréospécificité de la *Bs*\_MSDH. En effet, l'atome d'hydrogène sur le carbone en position 2 est labile en solution ; il y a « racémisation » instantanée. Ici, seul le stéréoisomère *S*- a pu être modélisé dans la structure.

Quant à l'activation du résidu cystéyl catalytique, les observations sont en faveur des suppositions émises par l'équipe d'enzymologie qui collabore sur ce sujet. Le résidu cystéyl serait activé par la chaîne latérale du résidu Asn153 (du site oxyanion) et les  $-\text{NH}-$  de la chaîne principale des résidus voisins (résidus proposés dans la thèse de Claire Chaumeil). De plus, leurs travaux montrent que les fixations du cofacteur puis du substrat contribuent à la diminution de  $pK_{app}$  de la « cystéine catalytique ». Au regard des structures, la fixation du  $\text{NAD}^+$  pourrait restreindre la liberté conformationnelle de la chaîne latérale du résidu cystéyl de sorte que cette dernière soit uniquement orientée en direction du site actif de l'enzyme.

Les structures *Mmsa*-1 et CoA présentent deux groupements sulfate dans leurs sites de fixation du cofacteur. Tout d'abord, nous pouvons exclure la possibilité qui consiste à supposer que des molécules de  $\text{NAD}^+$  puissent être présentes dans le site avec un taux d'occupation moindre. En effet, les groupements sulfate n'occupent en aucun cas la position des groupements phosphate qui composent le motif pyrophosphate du cofacteur. Les conformations des chaînes latérales des résidus Arg180, Glu179 et Arg339 sont différentes dans ces structures par rapport à la structure Holo-2. En outre, un groupement sulfate occupe la position qu'adopte la chaîne latérale du résidu Glu179 dans la structure Holo-2. Pour rappel, ce résidu aminoacyl est invariant chez les aldéhyde deshydrogénases non CoA- et CoA-dépendantes et stabilise le ribose de l'adénosine chez ces enzymes tétramériques. Au vu de tous ces résultats structuraux et bien que l'absence de la structure de l'enzyme sous sa forme apo ne permettent pas de valider cette hypothèse, le temps de latence de la *Bs*\_MSDH pourrait être lié à la réorientation des chaînes latérales des résidus aminoacyls cités

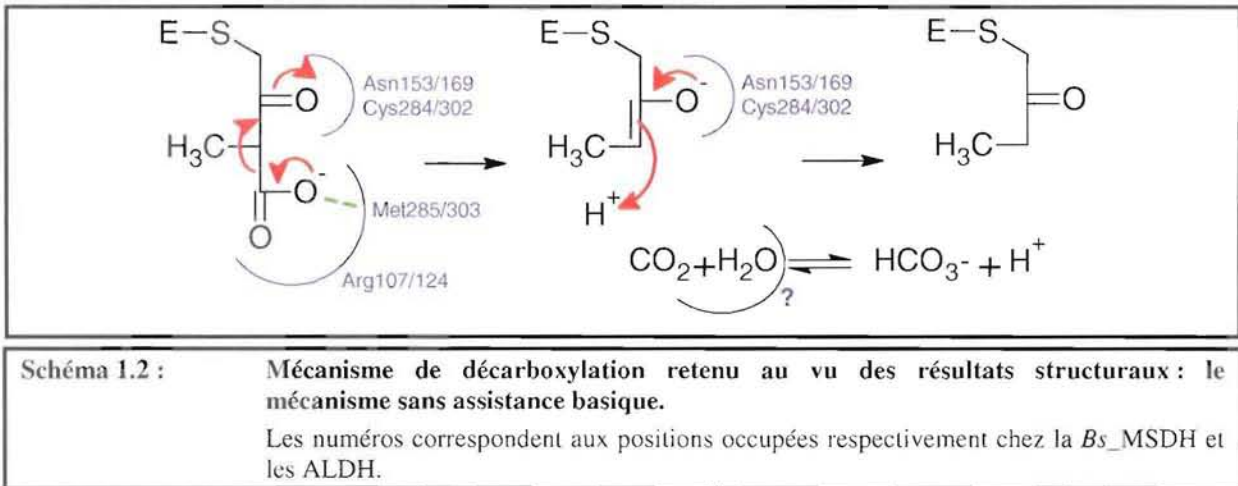
précédemment. Cette réflexion peut encore être amenée plus loin sachant que le processus de purification de la *Bs\_MSDH* (Dubourg *et al.*, 2004) procède via une phase de précipitation au sulfate d'ammonium. Aussi, au cours de cette phase, des groupements sulfate peuvent intégrer le site de  $\text{NAD}^+$  et la phase de latence observée uniquement à l'initiation de la réaction enzymatique pourrait correspondre à l'expulsion des groupements du site par les molécules de  $\text{NAD}^+$  apportées lors de la phase d'incubation.

La structure *Mmsa-1* est importante pour la compréhension du mécanisme enzymatique. En plus, elle a été obtenue sans utiliser un mutant de l'enzyme comme cela est le cas dans toutes les autres structures d'intermédiaire réactionnel. Ce sont les propriétés enzymatiques intrinsèques de l'enzyme qui ont permis ce résultat.

La formation de l'acylenzyme est bien indépendante de la fixation du CoA puisque les cristaux d'acylenzyme n'ont jamais été mis en contact avec ce cofacteur.

La structure confirme que l'acylation conduit à la libération du cofacteur réduit NADH. Les cristaux ont été obtenus par diffusion du substrat MMSA dans les cristaux d'holoenzyme. Ces conditions expérimentales rendent quasi improbables la réoccupation des sites de fixation du cofacteur par des molécules de  $\text{NAD}^+$  comme cela est proposé pour la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) à mécanisme ping-pong (Harrigan *et* Trentham, 1974).

Pour finir sur cette structure, le substrat MMSA lié de façon covalente à l'enzyme présente toujours sa fonction acide terminale. Cette observation est en accord avec le mécanisme enzymatique déterminé où l'étape de décarboxylation correspond à l'étape limitante et fait suite à la libération du NADH. A ce jour, les avancées sur la connaissance du mécanisme enzymatique de la *Bs\_MSDH* sont telles que deux hypothèses peuvent être proposées quant au processus de décarboxylation. La première fait intervenir une molécule d'eau qui attaque, sous forme activée, l'atome de carbone de la fonction acide, tandis que la seconde suppose une  $\beta$ -décarboxylation par assistance du site oxyanion (voir le paragraphe 2.3.3.2.2 dans le chapitre *Introduction*). Dans les deux hypothèses, la fonction acide est sous forme carboxylate. En effet, la structure indique que les résidus Arg107 et Arg283 sont à proximité de cette fonction, la contraignant à exister sous sa forme carboxylate. Dans la structure *Mmsa-1*, un des deux atomes de la fonction acide du substrat est en interaction, via une liaison hydrogène, avec le  $-\text{NH}-$  de la chaîne principale du résidu Met285. Cette liaison est en accord avec la seconde hypothèse proposée sur la base du mécanisme enzymatique de la méthylmalonylCoA décarboxylase (Benning *et al.*, 2000) où la fonction acide effectue également une liaison hydrogène avec un résidu aminoacyl de l'enzyme. Ce mécanisme est conforté par la nature des résidus aminoacyls qui composent le site actif ; aucun d'entre eux ne peut jouer le rôle de base activatrice de la molécule d'eau proposé dans la première hypothèse (Schéma 1.2).



La structure CoA-NAD montre que les molécules de CoA et de NAD<sup>+</sup> peuvent concomitamment se fixer à la *Bs*\_MSDH. Dans cette structure, le NAD<sup>+</sup> occupe le site de fixation du cofacteur et ce dans la même position que celle qu'il a dans la structure Holo-2. Quant au CoA, celui-ci occupe le site actif de l'enzyme. En considérant uniquement cette structure, des doutes subsistent sur le site de fixation du CoA qui, à ce stade d'avancement des résultats enzymatiques, ne peut être identifié. De plus, la cinétique enzymatique de type ping-pong de l'enzyme est différente de celle des aldéhyde deshydrogénases non CoA-dépendante. Une des hypothèses proposées par l'équipe d'enzymologie est que le NADH est libéré pour que le site de fixation du cofacteur accueille le CoA. Les conditions expérimentales d'obtention des cristaux enzyme/CoA/NAD<sup>+</sup> aurait pu contraindre le CoA à occuper un autre site que celui de fixation du NAD<sup>+</sup>. La résolution de la structure CoA a permis de conclure : le site actif est également le site de fixation du CoA.

### 3. Ce qui distingue la *Bs*\_MSDH des ALDHs au niveau structural

#### 3.1. L'association oligomérique

Quelle que soit la structure de la *Bs*\_MSDH, celle-ci est globalement superposable aux structures des ALDHs tétramériques. La Figure montre que les feuilletts des domaines du site de fixation du cofacteur et du site actif sont structuralement équivalents. Les principales différences sont localisées au niveau des boucles, des hélices  $\alpha$  et du feuillet du domaine d'oligomérisation. Ce feuillet composé des brins  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  et  $\beta_{10}$  ne présente pas de courbure ou « twist » comme cela est observé dans les structures d'ALDHs connues. Cette particularité a une incidence directe sur la dimérisation qui s'effectue via les brins  $\beta_{10}$  et  $\beta_E$  (domaine catalytique) des monomères. Des informations intéressantes sont obtenues lorsque l'on superpose un monomère sur les quatre (par exemple le monomère A) de la *Bs*\_MSDH avec un

monomère (par exemple le monomère A) d'une ALDH tétramérique et que l'on s'intéresse aux différences sur l'ensemble des tétramères. Cette procédure permet de montrer en particulier que seul l'un des deux pseudo-feuillets à vingt brins des tétramères est superposable. La superposition via les monomères B donne le résultat inverse avec l'autre pseudo feuillet à vingt brins bien superposé. Ces différences sont probablement dues à l'absence de twist dans le feuillet du domaine d'oligomérisation.

La différence locale la plus remarquable correspond à la partie carboxy-terminale (Ct) de la *Bs\_MSDH* qui adopte une conformation unique par rapport aux structures d'ALDHs. Dans ces dernières, cette extrémité suit la boucle de connexion entre les deux autres brins ( $\beta_5$  et  $\beta_6$ ) du domaine. Dans la structure de la *Bs\_MSDH*, la partie carboxy-terminale (Ct) est orientée vers un autre monomère de l'autre dimère. Cette extrémité (Ala483-Phe486) est seulement stabilisée par des contacts de van der Waals. La boucle entre les brins  $\beta_5$  et  $\beta_6$  dans la structure de la *Bs\_MSDH* est essentielle dans la stabilisation du groupement adénine du CoA.

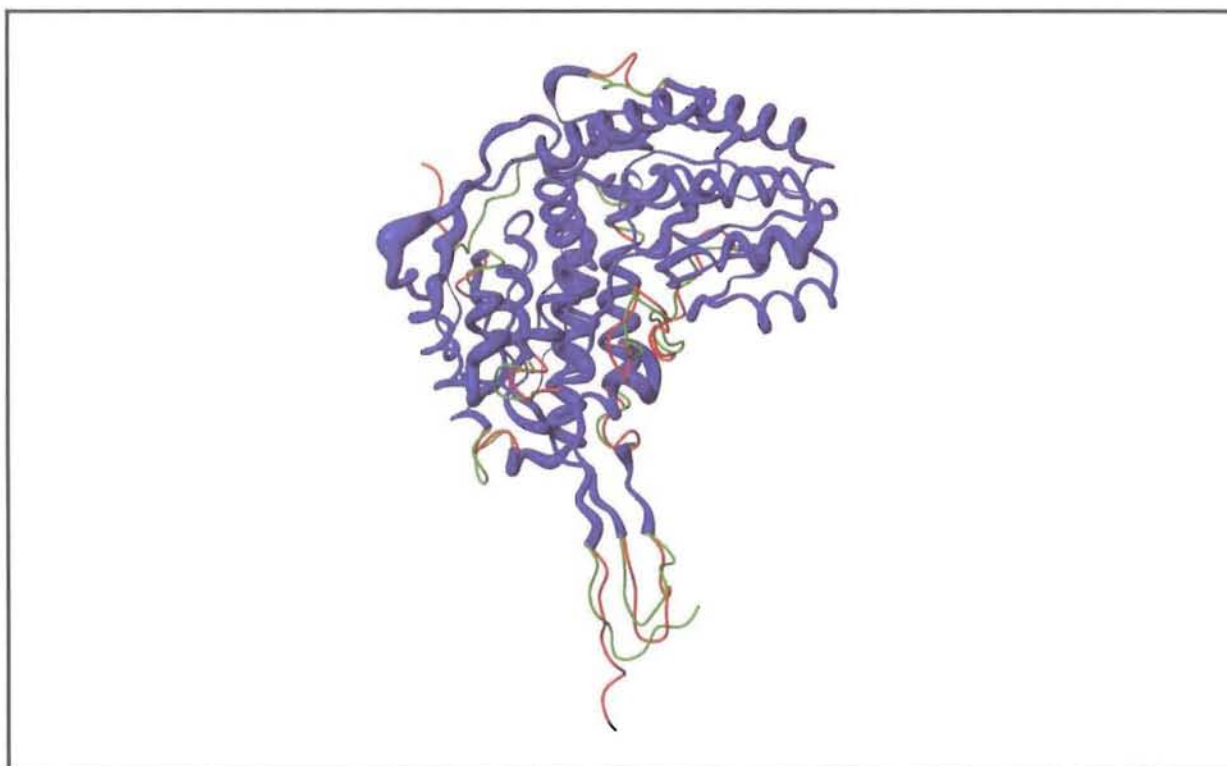


Figure IV.2 :

**Superposition d'un monomère de la structure Holo-2 avec l'un de la structure de l'ALDH2 de bovin (Steinmetz *et al.*, 1997).**

Le rayon du lacet coloré en bleu est proportionnel à l'écart qu'il existe entre les monomères. Les régions avec deux lacets (rouge pour Holo-2 et vert pour l'ALDH2) représentent des boucles présentant des insertions ou des délétions.



## 3.2. Le site de fixation du NAD<sup>+</sup>

Chez la *Bs*\_MSDH le site de fixation du cofacteur est comparable à celui des autres ALDHs dont les structures ont été déterminées. Néanmoins, le cofacteur dans la structure de la *Bs*\_MSDH est bien défini dans sa totalité dans les cartes de densité électronique alors que ce n'est pas le cas dans les structures d'ALDHs à l'exception de celle de l' $\eta$ -cristalline (Bateman *et al.*, 2000). Cette exception est expliquée par le rôle non fonctionnel mais structural de l' $\eta$ -cristalline (voir le paragraphe 1.2.3.2 dans le chapitre *Introduction*).

Dans les structures Holo-2 et CoA-NAD, le NAD<sup>+</sup> adopte la position de transfert d'hydrure (Steinmetz *et al.*, 1997 ; Perez-Miller et Hurley, 2003) et établit des interactions comparables à celles observées dans les ALDHs tétramériques. Ces interactions ne permettent pas d'expliquer la différence de type de cinétique enzymatique entre les MSDHs et les ALDHs tétramériques. La *Bs*\_MSDH présentant un mécanisme de type ping-pong, le cofacteur réduit est libéré avant l'étape de décarboxylation qui précède l'étape de désacylation (Stines-Chaumeil *et al.*, 2006). Chez les ALDHs le mécanisme est du type séquentiel ordonné, ce qui veut dire que le NADH est libéré en dernier à l'issue de l'étape de désacylation. Les analyses structurales des ALDHs tétramériques ont clairement montré que le motif nicotinamide mononucléotide ne pouvait pas avoir la même conformation dans ses états oxydé et réduit. Une fois réduit celui-ci doit changer de conformation pour rendre le résidu Glu268 (numérotation ALDHs et Leu250 dans la *Bs*\_MSDH) compétent pour activer une molécule d'eau responsable de la désacylation.

Les études structurales de l'ALDH2 humaine en complexe avec NAD<sup>+</sup> et NADH (Perez-Miller et Hurley, 2003) et de l'intermédiaire acylenzyme du mutant E268A de GAPN (D'Ambrosio *et al.*, 2006) ont permis l'observation de ce changement conformationnel. Ces derniers auteurs mettent en évidence une cavité située à la surface de l'enzyme jouant le rôle de site de fixation du motif nicotinamide mononucléotide réduit. Cette cavité composée de résidus invariants est présente dans la structure de la *Bs*\_MSDH. L'absence de cette cavité aurait permis d'expliquer pourquoi les ALDHs et les MSDHs présentent des types de mécanisme différents.

L'analyse approfondie du site de fixation de l'adénine du cofacteur dinucléotidique a permis d'apporter des éléments de réponse. L'analyse des facteurs d'agitation thermique (B), au vu des résultats rapportés sur l' $\eta$ -cristalline (Bateman *et al.*, 2000), a révélé la particularité de la *Bs*\_MSDH. Le NAD<sup>+</sup> de cette enzyme est le seul à avoir un B moyen pour le cycle adénine légèrement supérieure à celui du cycle nicotinamide et il est surtout nettement supérieur au B moyen de la protéine (Tableau ).

	Facteur d'agitation thermique B (Å <sup>2</sup> )		
	Adénine	Nicotinamide	Enzyme
ALDH1 de mouton	21,6	41,7	29,0
ALDH2 humaine	29,0	60,2	30,9
η-cristalline	20,0	24,1	23,3
Holo-2	44,0	40,0	30,1

**Tableau IV.3 :** Moyenne des facteur d'agitation isotrope de déplacement atomique ou facteur d'agitation thermique B des cycles adénine et nicotinamide.

Ces observations signifient que le cofacteur est globalement moins bien fixé dans son site de fixation dans la *Bs*\_MSDH que dans les ALDHs. La superposition des structures holoenzymes des ALDHs avec celle de la *Bs*\_MSDH confirme que cette dernière est l'enzyme où le cycle adénine est le plus exposé au solvant. L'analyse de la poche de fixation de l'adénine permet d'expliquer ces différences. Le cycle adénine s'insère entre les extrémités amino-terminales des hélices  $\alpha_D$  et  $\alpha_E$ , et se pose sur les brins  $\beta_A$ ,  $\beta_B$  et  $\beta_D$ . Le cycle adénine est principalement stabilisé de part et d'autre par les chaînes latérales des résidus His209 et Val232 des hélices  $\alpha_D$  et  $\alpha_E$ . Le résidu Val232 (également Val232 dans les ALDHs) est conservé dans les ALDHs et les MSDHs alors que le résidu His209 est conservé dans les MSDHs. Ces dernières présentent par rapport aux ALDHs tétramériques une délétion au niveau N-terminal de l'hélice  $\alpha_D$  de telle sorte que l'hélice débute par le résidu His209. Tandis que chez les ALDHs, cette hélice présente un pas de plus tel que le résidu N-terminal Pro226 (numérotation ALDHs) de l'hélice occupe une position comparable de la chaîne latérale du résidu His209. La différence la plus importante se situe au niveau du résidu Val212 qui est strictement conservé chez les MSDHs. Ce résidu correspond au résidu Gly229 chez les ALDHs tétramériques à l'exception de celle de *Thermoproteus tenax* qui présente un résidu alanyl. Le résidu Val212 réduit la profondeur de la poche de fixation du cycle adénine, affaiblissant ainsi les contacts de van der Waals. Ces différences structurales pourraient expliquer le type de mécanisme original de la *Bs*\_MSDH dans la famille des aldéhyde déshydrogénases non-phosphorylantes.

Un autre élément de réponse provient peut-être du fait que les mécanismes catalytiques des ALDHs et des MSDHs diffèrent après l'étape d'acylation et impliquent donc des résidus différents. Les études enzymatique et structurale de la *Bs*\_MSDH n'ont pas mis en évidence de résidus essentiels pour le mécanisme autour de la position 250 (résidu Glu268 dans les ALDHs). Les chaînes principales autour de cette position sont superposables dans les structures des ALDHs et de la *Bs*\_MSDH. Cette position 250/268 se trouve à proximité du site de fixation du cofacteur, et donc moins accessible au solvant en présence de celui-ci. Dans le cas des ALDHs, le cofacteur réduit, présent lors de l'étape de désacylation, pourrait contribuer à l'augmentation de la réactivité du résidu Glu268 en le rendant ainsi apte à l'activation d'une molécule d'eau. Par contre, dans le cas des MSDHs, la présence de cofacteur dans les étapes suivant l'acylation ne doit pas être nécessaire.

### 3.3. Le site actif

Dans les ALDHs, les résidus Asn169/153 (ALDHs/MSDHs), Glu268/250 et Cys302/284 sont indispensables au mécanisme enzymatique. Les aldéhyde déshydrogénases non-phosphorylantes ne présentant pas de résidu glutamyl en position 268 ne sont pas classées dans les ALDHs qui présentent une étape de désacylation hydrolytique (Hempel *et al.*, 1993). Cette position est occupée par un résidu leucyl ou asparaginylyl chez les MSDHs. Le site actif de la *Bs*\_MSDH est globalement superposable à celui des autres ALDHs, ceci signifiant que les atomes de carbones  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) des résidus en positions 169/153, 268/250, 302/284 se superposent. La couronne de résidus hydrophobes au cœur du site actif est présente dans toutes les structures d'aldéhyde déshydrogénases non-phosphorylantes connues. Il est difficile par simple mesure de distances inter- $C\alpha$  de révéler des différences entre les sites.

Les résidus Arg124/107 et Arg301/283 sont uniquement invariants chez les MSDHs et les GAPNs. Dans ces dernières, les structures du complexe ternaire (mutant C302A/NAD<sup>+</sup>/G3P) et de l'acylenzyme obtenue à partir du mutant E268A (Cobessi *et al.*, 2000 ; Marchal *et* Branlant, 2002 ; D'Ambrosio *et al.*, 2006) indiquent que ces deux résidus arginylyls sont impliqués dans la stabilisation du groupement phosphate du substrat glycéraldéhyde-3-phosphate. Un troisième résidu arginylyl participe également à la stabilisation du substrat et est uniquement conservé chez les GAPNs. Le groupement guanidinium du résidu Arg107 de la *Bs*\_MSDH est impliqué à la fois dans la stabilisation du substrat et du CoA alors que celui du résidu Arg283 forme uniquement une liaison hydrogène avec le CoA.

Notre intérêt s'est porté en premier sur un résidu asparaginylyl, Asn410, qui est le résidu symétrique du résidu Asn153 par rapport à la « cystéine catalytique ». Ce résidu Asn410 est conservé chez les MSDHs et correspond systématiquement à un résidu leucyl chez les ALDHs. De plus, sa substitution par un autre résidu aminoacyl affecte de façon drastique l'activité enzymatique (C. Chaumeil, communication personnelle).

Le site actif est non seulement le site de fixation du substrat mais il est aussi celui du CoA. Le CoA s'ancre essentiellement dans ce site par formation de deux liaisons hydrogène entre la fonction amine primaire de l'adénine et les fonctions carbonyles de la chaîne principale des résidus Val440 et Ala442. Les deux résidus Pro441, Ala ou Val442 et Pro443 constituent une triade de résidus aminoacyls uniquement conservés chez les MSDHs. Les résidus Pro contraignent les fonctions carbonyles des résidus Val440 et Ala442 de telle sorte qu'elles forment le site de stabilisation de la fonction amine primaire de l'adénine du CoA. Ces résidus appartiennent à la boucle de spécificité du substrat. Dans le cas des MSDHs, la triade PxP de cette boucle, où « x » correspond à un résidu Ala ou Val, pourrait représenter la structure primaire signature de la fixation du CoA. Toutes les structures secondaires qui composent le site actif participent à la stabilisation du CoA dans la *Bs*\_MSDH. Or le site actif des ALDHs est composé de ces mêmes structures secondaires, mais elles ne peuvent fixer le CoA (Seegmiller, 1953 ; Rottschild *et* Guzman Barron, 1954 ; GAPN de *Streptococcus mutans*, communication personnelle F. Talfournier).



*Conclusions et  
Perspectives*

Les structures déterminées durant cette thèse ont tout d'abord permis de confirmer les résultats obtenus en enzymologie sur la *Bs*\_MSDH. A savoir :

- l'implication des résidus Asn153 et Cys284 dans l'ensemble du mécanisme enzymatique.
- l'implication du résidu Arg107 dans la stabilisation de l'acylenzyme et dans l'étape de décarboxylation.
- la cinétique enzymatique de type ping-pong où le départ du cofacteur réduit précède la fixation du CoA essentiel à l'étape finale de désacylation.

Au cours de la discussion, une réflexion est menée sur l'existence d'une phase de latence lors du premier cycle catalytique de l'enzyme. Cette phase consisterait en l'éviction de deux groupements sulfate du site de fixation du  $\text{NAD}^+$  et en la réorientation de la chaîne latérale du résidu Glu179. La modélisation du stéréoisomère *S*-MMSA dans la structure de l'acylenzyme indiquerait que la *Bs*\_MSDH est une enzyme stéréospécifique. Mais les modèles *R*- et *S*- de l'intermédiaire thiohémiacétal, obtenus par modélisation moléculaire, laissent à penser que la *Bs*\_MSDH pourrait ne pas être stéréospécifique. L'analyse des structures apporte également des éléments de réponse au sujet du processus de décarboxylation. Ainsi, le mécanisme de  $\beta$ -décarboxylation sans assistance basique (de la part de l'enzyme) semble être le plus probable. Ce travail a surtout permis d'identifier le site de fixation du CoA et de déterminer les éléments structuraux (résidus aminoacyls et structures secondaires) impliqués dans sa fixation. En effet, une séquence primaire signature semble se révéler au regard des résidus aminoacyls qui stabilisent le CoA. Cette séquence signature appartient à la boucle qui est définie comme la boucle de spécificité du substrat (oxydé au cours de la réaction) chez les aldéhyde deshydrogénases non CoA-dépendantes. Dans le cas de la *Bs*\_MSDH et probablement des autres MSDHs, la triade PA/VP pourrait constituer la structure primaire signature de la fixation du CoA.

Même si d'un point de vue global, la structure de la *Bs*\_MSDH est comparable à celle des ALDHs tétramériques, l'originalité de son mécanisme peut être expliquée par sa structure. En ce qui concerne l'étape d'acylation, la *Bs*\_MSDH présente tous les éléments indispensables à son accomplissement déjà mis en évidence chez les ALDHs. Le départ du  $\text{NADH}$  avant l'arrivée du CoA est dû à une mauvaise fixation de la totalité de la molécule de  $\text{NAD}^+$ . En effet, le cycle adénine est plus exposé au solvant dans la *Bs*\_MSDH que dans les autres ALDHs où, la zone d'interaction majeure entre l'enzyme et son cofacteur se situe au niveau de ce cycle. Le résidu Val212 (Gly229 chez les ALDHs) empêche le cycle adénine de s'ancrer dans l'enzyme. Ce résidu étant conservé chez les MSDHs, le mécanisme enzymatique de cinétique de type ping-pong peut être supposé pour toutes ces enzymes. Le site de fixation du CoA est principalement défini par la boucle de spécificité de substrat (entre les brins  $\beta_E$  et  $\beta_9$ ), la boucle qui relie les brins  $\beta_5$  et  $\beta_6$  de l'autre monomère du dimère concerné et aussi par l'hélice  $\alpha_2$  d'un monomère de l'autre dimère. Ce constat indique pourquoi le domaine d'oligomérisation de la *Bs*\_MSDH a une conformation particulière.

Dans la perspective de valider l'hypothèse énoncée pour expliquer la phase de latence, la résolution de la structure de la *Bs*\_MSDH sous sa forme apoenzyme paraît indispensable. Pour confirmer le rôle primordial de la structure primaire signature PxP dans la fixation du CoA, la production d'enzymes modifiées par mutagenèse dirigée des résidus prolyl impliqués et la résolution des structures correspondantes restent à entreprendre. Quant à la poche de fixation du cycle adénine du NAD<sup>+</sup>, des travaux de mutagenèse dirigée ont déjà été initiés dans le but de vérifier si le résidu Val212 est bien le résidu clef, à l'origine de la cinétique enzymatique de type ping-pong chez la *Bs*\_MSDH. Les structures de ces enzymes modifiées devront ensuite être déterminées. Le dernier point concerne le résidu Asn410, spécifique des MSDHs et remarquable par sa position dans le site actif, dont le rôle n'est pas encore connu. Seule la poursuite de l'investigation, au niveau enzymatique et structural, d'une MSDH pourra peut-être permettre de découvrir le rôle de ce résidu aminoacyl.

Le mécanisme enzymatique de la *Bs*\_MSDH proposé à la suite des ces résultats est présenté dans le schéma V.1 ci-après.

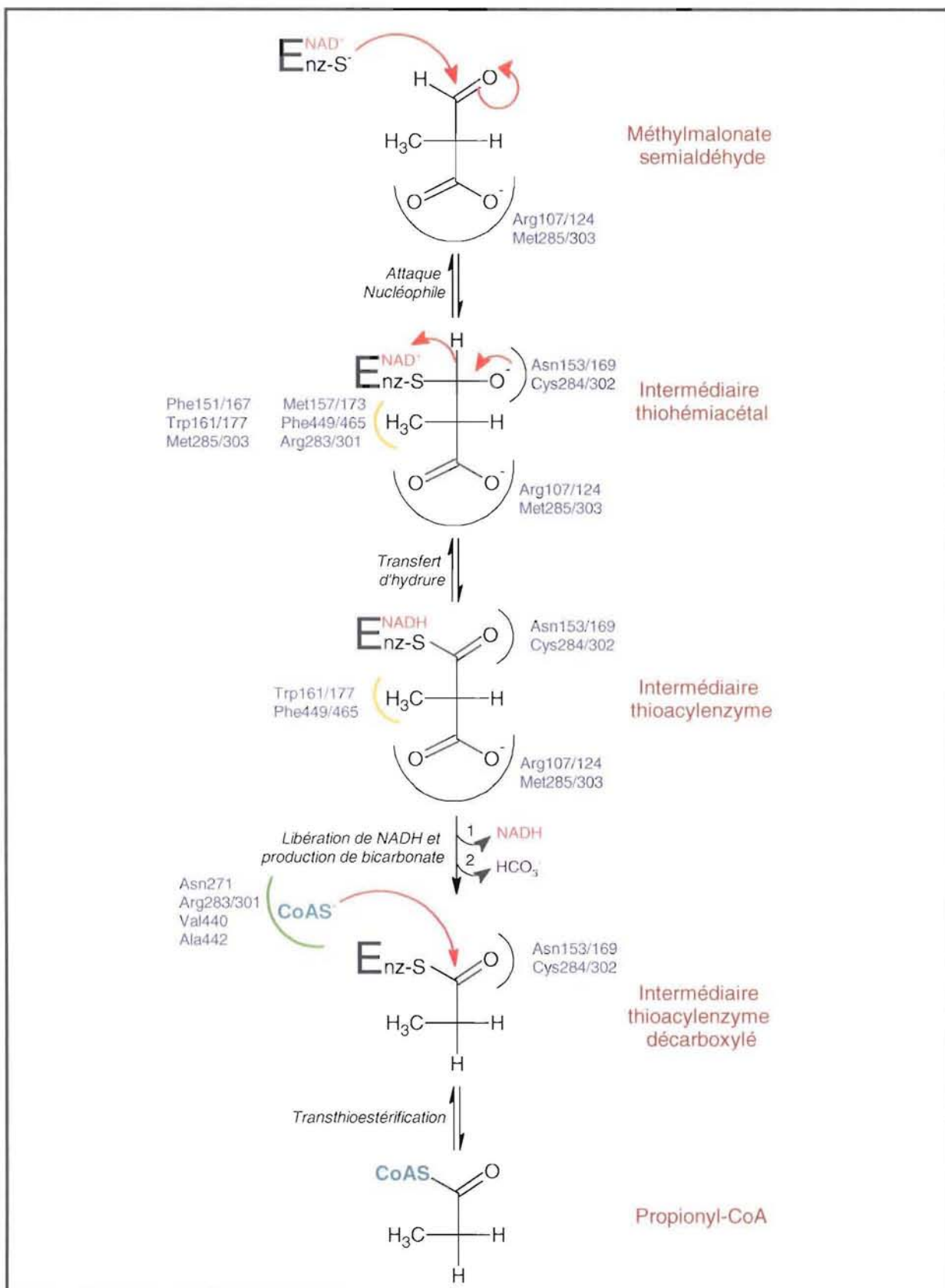


Schéma V.1 : Mécanisme réactionnel de la *Bs*\_MSDH vis-à-vis du substrat MMSA proposé. Les numéros correspondent aux positions occupées respectivement chez la *Bs*\_MSDH et les ALDH.

# *Bibliographie*

A

**Abriola D.P., Fields R., Stein S., MacKerell A.D. Jr. and Pietruszko R.**

Active site of human liver aldehyde dehydrogenase.

*Biochemistry.*, 1987 Sep 8; **26**(18): 5679-84.**Abriola D.P., MacKerell A.D. Jr and Pietruszko R.**

Correlation of loss of activity of human aldehyde dehydrogenase with reaction of bromoacetophenone with glutamic acid-268 and cysteine-302 residues. Partial-sites reactivity of aldehyde dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1990 Feb 15; **266**(1): 179-87.**Adams P.D., Pannu N.S., Read R.J. and Brunger A.T.**

Cross-validated Maximum Likelihood Enhances Crystallographic Simulated Annealing Refinement.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; **94**, 5018-5023.**Ahmed H., Ettema T.J., Tjaden B., Geerling A.C., van der Oost J. and Siebers B.**

The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation.

*Biochem J.*, 2005 Sep ; **390**(Pt 2): 529-40.**Ahvazi B., Coulombe R., Delarge M., Vedadi M., Zhang L., Meighen E. and Vrielink A.**Crystal structure of the NADP+-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity.*Biochem J.*, 2000 Aug 1; **349**(Pt 3): 853-61.**Ambroziak W. and Pietruszko R.**

Human aldehyde dehydrogenase: metabolism of putrescine and histamine.

*Alcohol Clin Exp Res.*, 1987 Dec; **11**(6): 528-32**Ambroziak W., Kosley L.L. and Pietruszko R.**

Human aldehyde dehydrogenase: coenzyme binding studies.

*Biochemistry.*, 1989 Jun 27; **28**(13): 5367-73.**Antononkov V.D., Pirozhkov S.V. and Panchenko L.F.**

Intraparticulate localization and some properties of a clofibrate-induced peroxisomal aldehyde dehydrogenase from rat liver.

*Eur J Biochem.*, 1985 May 15; **149**(1): 159-67.**Arnaud P.**

Chimie organique - Cours, QCM and Applications

Editeur(s) : *Dunod 2004*

17e éd. / rev. and augm. par Brigitte Jamart, Jacques Bodiguel, Nicolas Brosse

ISBN : 2100070355 - EAN : 9782100070350

B

**Bannerjee D., Sanders L.E. and Sokatch J.R.**Properties of purified methylmalonate semialdehyde dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*.*J Biol Chem.*, 1970 Apr 10; **245**(7): 1828-35.**Barton G. J.**

ALSCRIPT: A Tool to Format Multiple Sequence Alignments.

*Protein Engineering.*, Volume 6, No. 1, pp. 37-40.**Barrett M.C. and Dawson A.P.**

The reaction of choline dehydrogenase with some electron acceptors.

*Biochem J.*, 1975 Dec; **151**(3): 677-83.**Basse C.W., Lottspeich F., Steglich W. and Kahmann R.**Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*.*Eur J Biochem.*, 1996 Dec 15; **242**(3): 648-56.

**Bateman O. A., Purkiss A. G., van Montfort R., Slingsby C., Graham C. and Wistow G.**

Crystal structure of eta-crystallin: adaptation of a class 1 aldehyde dehydrogenase for a new role in the eye lens.  
*Biochemistry*, 2003; **42**(15): 4349-4556.

**Bennett A.F., Buckley P.D. and Blackwell L.F.**

Proton release during the pre-steady-state oxidation of aldehydes by aldehyde dehydrogenase. Evidence for a rate-limiting conformational change.  
*Biochemistry*, 1982 Aug 31; **21**(18): 4407-13.

**Bennett A.F., Buckley P.D. and Blackwell L.F.**

Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions.  
*Biochemistry*, 1983 Feb 15; **22**(4): 776-84.

**Benning M.M., Haller T., Gerlt J.A. and Holden H.M.**

New reactions in the crotonase superfamily: structure of methylmalonyl CoA decarboxylase from *Escherichia coli*.  
*Biochemistry*, 2000 Apr 25; **39**(16): 4630-9.

**Bessman S.P., Rossen J. and Layne E.C.**

Gamma-Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain.  
*J Biol Chem.*, 1953 Mar; **201**(1): 385-91.

**Betts G.F., Poole P.L., Springham M.G. and Bostian K.A.**

Kinetic and spectroscopic evidence of cation-induced conformation changes in yeast K<sup>+</sup>-activated aldehyde dehydrogenase.  
*Biochem J.*, 1979 Dec 1; **183**(3): 633-46.

**Black S.**

Yeast aldehyde dehydrogenase.  
*Arch Biochem.*, 1951 Nov; **34**(1): 86-97.

**Blackwell L.F., Motion R.L., MacGibbon A.K., Hardman M.J. and Buckley P.D.**

Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase.  
*Biochem J.*, 1987 Mar 15; **242**(3): 803-8.

**Bostian K., Betts G.F., Man W.K. and Hughes M.N.**

Thallium activation and inhibition of yeast aldehyde dehydrogenase.  
*FEBS Lett.*, 1975 Nov 1; **59**(1): 88-91.

**Bostian K.A. and Betts G.F.**

Rapid purification and properties of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem J.*, 1978 Sep 1; **173**(3): 773-86.

**Bostian K.A. and Betts G.F.**

Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem J.*, 1978 Sep 1; **173**(3): 787-98.

**Bostian K.A., Betts G.F., Man W.K. and Hughes M.N.**

Multiple binding of thallium and rubidium to potassium-activated yeast aldehyde dehydrogenase. Influences on tertiary structure, stability and catalytic activity.  
*Biochem J.*, 1982 Oct 1; **207**(1): 73-80.

**Boyd L.A., Adam L., Pelcher L.E., McHughen A., Hirji R. and Selvaraj G.**

Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH.  
*Gene.*, 1991 Jul 15; **103**(1): 45-52.

**Boyd D. A., Cvitkovitch D. G. and Hamilton I. R.**

Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*.  
*J Bacteriol*, 1995; **177**(10): 2622-2627.

**Bradbury S.L. and Jakoby W.B.**

Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1971 Mar 25; **246** (6): 1834-40.

**Bradbury S.L. and Jakoby W.B.**

Ligand interactions with yeast aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1971 Nov 25; **246**(22): 6929-32.

**Bradbury S.L. and Jakoby W.B.**

Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1972 Sep; **69**(9): 2373-6

**Braun T., Bober E., Singh S., Agarwal D.P. and Goedde H.W.**

Evidence for a signal peptide at the amino-terminal end of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase.  
*FEBS Lett.*, 1987 May 11; **215**(2): 233-6. Erratum in: *FEBS Lett* 1988 Jun 20; **233**(2):440.

**Breitkreuz K.E., Allan W.L., Van Cauwenberghe O.R., Jakobs C., Talibi D., Andre B. and Shelp B.J.**

A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency.  
*J Biol Chem.*, 2003 Oct 17; **278**(42): 41552-6.

**Brooks P.J. and Theruvathu J.A.**

DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis.  
*Alcohol.*, 2005 Apr; **35**(3): 187-93. Review

**Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Yocum C.F. and Hanson A.D.**

Evidence for a Ferredoxin-Dependent Choline Monooxygenase from Spinach Chloroplast Stroma.  
*Plant Physiol.*, 1989 May; **90**(1): 322-329.

**Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T. and Warren G.L.**

Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 1998 Sep 1; **54**(Pt 5): 905-21.

**Brünger A.T., Kuriyan J. and Karplus M.**

Crystallographic R factor Refinement by Molecular Dynamics.  
*Science*, 1987; **235**: 458-460.

**Brünger A.T., Krukowski A. and Erickson J.**

Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing.  
*Acta Cryst.*, 1990; **A46**: 585-593.

**Brünger A.T.**

The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures.  
*Nature*, 1992; **355**: 472-474.

**Bunting K.D., Lindahl R. and Townsend A.J.**

Oxazaphosphorine-specific resistance in human MCF-7 breast carcinoma cell lines expressing transfected rat class 3 aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1994 Sep 16; **269**(37): 23197-203.

**Burton R.M. and Stadtman E.R.**

The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A.  
*J Biol Chem.*, 1953 Jun; **202**(2): 873-90.



**Bustos D.M. and Iglesias A.A.**

Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins.

*Plant Physiol.*, 2003 Dec; **133**(4): 2081-8.

**Byers D. and Meighen E.**

*Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. Partial reversal of aldehyde oxidation and its possible role in the reduction of fatty acids for the bioluminescence reaction.

*J Biol Chem.*, 1984 Jun 10; **259**(11): 7109-14.

C

**Carter Jr. C.W.**

Chapter : Experimental design, quantitative analysis, and cartography of crystal growth.

Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach (2nd edition). Edited by A. Ducruix and R. Giegé. Oxford University Press, 1999.

**Carugo O. and Argos P.**

NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding.

*Proteins.*, 1997 May; **28**(1): 10-28.

**Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Merz K.M., Wang B., Pearlman D.A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J.W., Ross W.S. and Kollman P.A.**

Amber8, 2004, University of California, San Francisco.

**Chambliss K.L. and Gibson K.M.**

Succinic semialdehyde dehydrogenase from mammalian brain: subunit analysis using polyclonal antiserum.

*Int J Biochem.*, 1992 Sep; **24**(9): 1493-9.

**Chambliss K.L., Gray R.G., Rylance G., Pollitt R.J. and Gibson K.M.**

Molecular characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency.

*J Inherit Metab Dis.*, 2000 Jul; **23**(5): 497-504.

**Chen Y.M., Zhu Y. and Lin E.C.**

NAD-linked aldehyde dehydrogenase for aerobic utilization of L-fucose and L-rhamnose by *Escherichia coli*.

*J Bacteriol.*, 1987 Jul; **169**(7): 3289-94.

**Cheng J.B. and Russell D.W.**

Mammalian Wax Biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions.

*J Biol Chem*, 2004; **279**(36): 37789-37797.

**Chern M.K. and Pietruszko R.**

Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase.

*Biochem Biophys Res Commun.*, 1995 Aug 15; **213**(2): 561-8.

**Chern M.K. and Pietruszko R.**

Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme.

*Biochem Cell Biol.*, 1999; **77**(3): 179-87.

**Choudhary S., Xiao T., Vergara L. A., Srivastava S., Nees D., Piatigorsky J. and Ansari N. H.**

Role of aldehyde dehydrogenase isozymes in the defense of rat lens and human lens epithelial cells against oxidative stress.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005; **46**(1): 259-267.

**Clark J.F. and Jakoby W.B.**

Yeast aldehyde dehydrogenase. 3. Preparation of three homogeneous species.

*J Biol Chem.*, 1970 Nov 25; **245**(22): 6065-71.

**Clark J.F and Jakoby W.B.**

Yeast aldehyde dehydrogenase. IV. Dissociation and reassociation of native and hybrid forms.  
*J Biol Chem.*, 1970 Nov 25; **245**(22): 6072-7.

**Clark D.P. and Cronan J.E. Jr.**

Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli*.  
*J Bacteriol.*, 1980 Oct; **144**(1): 179-84.

**Cleland W.W.**

The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1963 Jan 8; **67**: 104-37.

**Cleland W.W.**

The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1963 Feb 12; **67**: 173-87.

**Cleland W.W.**

The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1963 Feb 12; **67**: 188-96.

**Cobessi D., Tete-Favier F., Marchal S., Azza S., Branlant G. and Aubry A.**

Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.  
*J Mol Biol.*, 1999 Jul 2; **290**(1): 161-73.

**Cobessi D., Tete-Favier F., Marchal S., Branlant G. and Aubry A.**

Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.  
*J Mol Biol.*, 2000 Jun 30; **300**(1): 141-52.

**Cook R.J., Lloyd R.S. and Wagner C.**

Isolation and characterization of cDNA clones for rat liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1991 Mar 15; **266**(8): 4965-73.

**Crabb D.W., Edenberg H.J., Bosron W.F. and Li T.K.**

Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant.  
*J Clin Invest.*, 1989 Jan; **83**(1): 314-6.

**Craig, S. A.**

Betaine in human nutrition.  
*Am J Clin Nutr*, 2004; **80**(3): 539-549.

**Csonka L.N. and Hanson A.D.**

Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology.  
*Annu Rev Microbiol.*, 1991; **45**: 569-606. Review

**D****D'Ambrosio K., Pailot A., Talfournier F., Didierjean C., Benedetti E., Aubry A., Branlant G. and Corbier C.**

The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis.  
*Biochemistry.*, 2006 Mar 7; **4**(9): 2978-86.

**Damon M., Fautrel A., Guillouzo A. and Corcos L.**

Genetic analysis of the phenobarbital regulation of the cytochrome P-450 2b-9 and aldehyde dehydrogenase type 2 mRNAs in mouse liver.  
*Biochem J.*, 1996 Jul 15; **317**( Pt 2): 481-6.

**Deitrich R.A., Hellerman L. and Wein J.**

Diphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase. I. Specificity and sigma-rho function.  
*J Biol Chem.*, 1962 Feb; **237**: 560-4.

**DeLano W.L.**

The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

**De Laurenzi V., Rogers G.R., Hamrock D.J., Marekov L.N., Steinert P.M., Compton J.G., Markova N. and Rizzo W.B.**

Sjogren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene.  
*Nat Genet.*, 1996 Jan; **12**(1): 52-7.

**Del Rio D., Stewart A.J. and Pellegrini N.**

A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.  
*Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 2005 Aug; **15**(4): 316-28.

**Dib M., Garrel C., Favier A., Robin V. and Desnuelle C.**

Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease?  
*J Neurol.*, 2002 Apr; **249**(4): 367-74.

**Dickinson F.M. and Hart G.J.**

Effects of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase.  
*Biochem J.*, 1982 Aug 1; **205**(2): 443-8.

**Dickinson F.M. and Haywood G.W.**

The role of the metal ion in the mechanism of the K<sup>+</sup>-activated aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem J.*, 1987 Oct 15; **247**(2): 377-84.

**Dickinson, F. M.**

The purification and some properties of the Mg<sup>2+</sup>-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem J.*, 1996; **315**(Pt 2): 393-399.

**Dockham P.A., Lee M.O. and Sladek N.E.**

Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde.  
*Biochem Pharmacol.*, 1992 Jun 9; **43**(11): 2453-69.

**Dockham P.A., Sreerama L. and Sladek N.E.**

Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorines.  
*Drug Metab Dispos.*, 1997 Dec; **25**(12): 1436-41.

**Dubochet J. and Schultz P.**

Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens.  
*Q. Rev. Biophys.*, 1988; **21**: 129-228.

**Dubourg H., Stines-Chaumeil C., Didierjean C., Talfournier F., Rahuel-Clermont S., Branlant G. and Aubry A.**

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2004 Aug; **60**(Pt 8): 1435-7.

**Doudna J.A., Grosshans C., Gooding A. and Kundrot C.E.**

Crystallization of ribozymes and small RNA motifs by a sparse matrix approach.  
*Proc Natl Acad Sci. USA*, 1993 Aug 15; **90**(16), 7829-33.

**Duester G.**

Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid.

*Eur J Biochem.*, 2000 Jul; **267**(14): 4315-24. Review.

**Duncan R.J. and Tipton K.F.**

Kinetic studies with pig brain aldehyde dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1970 Oct; **119**(5): 63-64.

**Dunn T.J., Koleske A.J., Lindahl R. and Pitot H.C.**

Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat. cDNA sequence and regulation of the mRNA by phenobarbital in responsive rats.

*J Biol Chem.*, 1989 Aug 5; **264**(22): 13057-65.

**E****Eckfeldt J., Mope L., Takio K. and Yonetani T.**

Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isozymes.

*J Biol Chem.*, 1976 Jan 10; **251**(1): 236-40.

**Eckfeldt J.H. and Yonetani T.**

Kinetics and mechanism of the F1 isozyme of horse liver aldehyde dehydrogenase.

*Arch Biochem Biophys.*, 1976 Mar; **173**(1): 273-81.

**El Akawi Z. and Napoli J.L.**

Rat liver cytosolic retinal dehydrogenase: comparison of 13-cis-, 9-cis-, and all-trans-retinal as substrates and effects of cellular retinoid-binding proteins and retinoic acid on activity.

*Biochemistry*, 1994 Feb 22; **33**(7): 1938-43.

**Engel C. and Wierenga R.**

The diverse world of coenzyme A binding proteins.

*Curr Opin Struct Biol.*, 1996 Dec; **6**(6): 790-7. Review.

**Erwin V.G. and Deitrich R.A.**

Brain aldehyde dehydrogenase. Localization, purification, and properties.

*J Biol Chem.*, 1966 Aug 10; **241**(15): 3533-9.

**Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H.**

Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.

*Free Radic Biol Med*, 1991; **11**(1): 81-128.

**Evces S. and Lindahl R.**

Characterization of rat cornea aldehyde dehydrogenase.

*Arch Biochem Biophys.*, 1989 Nov 1; **274**(2): 518-24.

**F****Farres J., Julia P. and Pares X.**

Aldehyde oxidation in human placenta. Purification and properties of 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1988 Dec 1; **256**(2): 461-7.

**Farres J., Guan K.L. and Weiner H.**

Primary structures of rat and bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases deduced from cDNA sequences.

*Eur J Biochem.*, 1989 Mar 1; **180**(1): 67-74.

**Farres J., Wang X., Takahashi K., Cunningham S.J., Wang T.T. and Weiner H.**

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.*, 1994 May 13; **269**(19): 13854-60.

**Farres J., Wang T.T., Cunningham S.J. and Weiner H.**

Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis.

*Biochemistry.*, 1995 Feb 28; **34**(8): 2592-8.

**Feldman R.I. and Weiner H.**

Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity.

*J Biol Chem.*, 1972 Jan 10; **247**(1): 267-72.

**Fink R.M., Fink K. and Henderson R.B.**

beta-amino acid formation by tissue slices incubated with pyrimidines.

*J Biol Chem.*, 1953 Mar; **201**(1): 349-55.

**Fiser A., Do R.K. and Sali A.**

Modeling of loops in protein structures.

*Protein Science.*, 2000; **9**: 1753-1773.

Frisch M. J.T., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Zakrzewski V. G., Montgomery J. A., Jr., Stratmann R. E., Burant J. C., Dapprich S., Millam J. M., Daniels A. D., Kudin K. N., Strain M. C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G. A., Ayala P. Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Cioslowski J., Ortiz J. V., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P. M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Andres J. L., Gonzalez C., Head-Gordon M., Replogle E. S., Pople J. A.

(1998) Gaussian Inc., Pittsburgh, PA.

**Fry J.D. and Saweikis M.**

Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*.

*Genet Res.*, 2006 Apr; **87**(2): 87-92.

**Fry J., Wood M. and Poole P.S.**

Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness.

*Mol Plant Microbe Interact.*, 2001; **14**(8): 1016-25.

G

**Gakhar L. and Wiencek J. M.**

A possible additional role of mineral oil in successful flash cooling

*J Appl Cryst.*, 2005; **38**(6): 945-950.

**Garman E.**

Cool data: quantity and quality.

*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 1999 Oct; **55**(Pt 10): 1641-53.

**Garman E.F. and Owen R.L.**

Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography.

*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2006 Jan; **62**(Pt 1):32-47. Review.

**Garman E.F. and Schneider T.R.**

Macromolecular Cryocrystallography.

*J. Appl. Cryst.*, 1997; **30**, 211-237.

**Geraghty M.T., Vaughn D., Nicholson A.J., Lin W.W., Jimenez-Sanchez G., Obie C., Flynn M.P., Valle D. and Hu C.A.**

Mutations in the Delta1-pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia.

*Hum Mol Genet.*, 1998 Sep; **7**(9): 1411-5.

**Gibson K.M., Hoffmann G.F., Hodson A.K., Bottiglieri T. and Jakobs C.**

4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism.

*Neuropediatrics.*, 1998 Feb; **29**(1): 14-22.

**Goedde H.W. and Agarwal D.P.**

Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase (ALDH).

*Pharmacol Ther.*, 1990; **45**(3): 345-71.

**Gojkovic Z., Sandrini M.P. and Piskur J.**

Eukaryotic beta-alanine synthases are functionally related but have a high degree of structural diversity.

*Genetics.*, 2001 Jul; **158**(3): 999-1011.

**Gonzalez-Segura L., Velasco-Garcia R. and Munoz-Clares R.A.**

Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*.

*Biochem J.*, 2002 Feb 1; **361**(Pt 3): 577-85.

**Goodwin G.W., Rougraff P.M., Davis E.J. and Harris R.A.**

Purification and characterization of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from rat liver. Identity to malonate-semialdehyde dehydrogenase.

*J Biol Chem.*, 1989 Sep 5; **264**(25): 14965-71.

**Graham C., Hodin J. and Wistow G.**

A retinaldehyde dehydrogenase as a structural protein in a mammalian eye lens. Gene recruitment of eta-crystallin.

*J Biol Chem.*, 1996 Jun 28; **271**(26): 15623-8.

**Gray R.G., Pollitt R.J. and Webley J.**

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.*, 1987; **38**, (1), 121-124.

**Grima-Pettenati J., Chriqui D., Sarni-Manchado P. and Prinsen E.**

Stimulation of lignification in neofomed calli induced by *Agrobacterium rhizogenes* on bean hypocotyls.

*Plant.Sci.*, 1989; **61**: 179-188.

**Gross G.G. and Kreiten W.**

Reduction of coenzyme A thioesters of cinnamic acids with an enzyme preparation from lignifying tissue of *Forsythia*.

*FEBS Lett.*, 1975 Jun 15; **54**(2): 259-62.

**Gruez A., Roig-Zamboni V., Grisel S., Salomoni A., Valencia C., Campanacci V., Tegoni M. and Cambillau C.**

Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase.

*J Mol Biol.*, 2004 Oct 8; **343**(1): 29-41.

**Grun F., Hirose Y., Kawauchi S., Ogura T. and Umesono K.**

Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development.

*J Biol Chem.*, 2000; **275**: 41210-41218.

**Guan K.L. and Weiner H.**

Sequence of the precursor of bovine liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as determined from its cDNA, its gene, and its functionality.

*Arch Biochem Biophys.*, 1990 Mar; **277**(2): 351-60.

**Guerrillot L. and Vandecasteele J.P.**

Purification and characterization of two aldehyde dehydrogenases from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Eur J Biochem.*, 1977 Nov 15; **81**(1): 185-92.

**Guichardant M., Taibi-Tronche P., Fay L.B. and Lagarde M.**

Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal.  
*Free Radic Biol Med.*, 1998 Dec; **25**(9): 1049-56.

**H****Habenicht A., Hellman U. and Cerff R.**

Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH.  
*J Mol Biol.*, 1994 Mar 18; **237**(1): 165-71.

**Habenicht A., Quesada A. and Cerff R.**

Sequence of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana plumbaginifolia* and phylogenetic origin of the gene family.  
*Gene.*, 1997 Oct 1; **198**(1-2): 237-43.

**Hammen P.K., Allali-Hassani A., Hallenga K., Hurley T.D. and Weiner H.**

Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase.  
*Biochemistry.*, 2002 Jun 4; **4**(22): 7156-68.

**Harrigan P.J. and Trentham D.R.**

Kinetic studies on oxidized nicotinamide--adenine dinucleotide-facilitated reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.  
*Biochem J.*, 1974 Nov; **143**(2): 353-63.

**Hart G.J. and Dickinson F.M.**

Some properties of aldehyde dehydrogenase from sheep liver mitochondria.  
*Biochem J.*, 1977 May 1; **163**(2): 261-7.

**Hart G.J. and Dickinson F.M.**

Kinetic properties of aldehyde dehydrogenase from sheep liver mitochondria.  
*Biochem J.*, 1978; **175**(3): 899-908.

**Haas D.J. and Rossmann M.G.**

Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 degrees C.  
*Acta Crystallogr B.*, 1970 Jul 15; **26**(7): 998-1004.

**Hatter K. and Sokatch J.R.**

Purification of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO.  
*Methods Enzymol.*, 1988; **166**: 389-93.

**Hayaishi O., Nishizuka Y., Tatibana M., Takeshita M. and Kuno S.**

Enzymatic studies on the metabolism of beta-alanine.  
*J Biol Chem.*, 1961 Mar; **236**: 781-90.

**Hempel J., Pietruszko R., Fietzek P. and Jörnvall H.**

Identification of a segment containing a reactive cysteine residue in human liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase (isoenzyme E1).  
*Biochemistry.*, 1982 Dec 21; **21**(26): 6834-8.

**Hempel J., von Bahr-Lindstrom H. and Jörnvall H.**

Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme.  
*Eur J Biochem.*, 1984 May 15; **141**(1): 21-35.



**Hempel J., Harper K. and Lindahl R.**

Inducible (class 3) aldehyde dehydrogenase from rat hepatocellular carcinoma and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated liver: distant relationship to the class 1 and 2 enzymes from mammalian liver cytosol/mitochondria.

*Biochemistry.*, 1989 Feb 7; **28**(3): 1160-7.

**Hempel J., Nicholas H. and Lindahl R.**

Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework.

*Protein Sci.*, 1993 Nov; **2**(11): 1890-900.

**Hill J.P., Blackwell L.F., Buckley P.D. and Motion R.L.**

Steady-state and pre-steady-state kinetics of propionaldehyde oxidation by sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase at pH 5.2. Evidence that the release of NADH remains rate-limiting in the enzyme mechanism at acid pH values.

*Biochemistry.*, 1991 Feb 5; **30**(5): 1390-4.

**Hope H.**

Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method.

*Acta Crystallogr B.* 1988 Feb 1; **44**(Pt 1): 22-6.

**Huang M. and Lindahl R.**

Aldehyde dehydrogenase heterogeneity in rat hepatic cells.

*Arch Biochem Biophys.*, 1990 Mar; **277**(2): 296-300.

**Hurley T.D., Perez-Miller S. and Breen H.**

Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase.

*Chem Biol Interact.*, 2001 Jan 30; **130-132**(1-3): 3-14.

**I****Iddar A., Valverde F., Assobhei O., Serrano A. and Soukri A.**

Widespread occurrence of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase among gram-positive bacteria.

*Int Microbiol.*, 2005 Dec; **8**(4): 251-8.

**Iglesias A.A., Serrano A., Guerrero M.G. and Losada M.**

Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Biochim Biophys Acta.* 1987; **925**: 1-10.

**Inui H., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

Occurrence of oxygen-sensitive, NADP<sup>+</sup>-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*.

*J Biochem. (Tokyo)*, 1984 Sep; **96**(3): 931-4.

**Inui H., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*.

*Arch Biochem Biophys.*, 1985 Mar; **237**(2): 423-9.

**Inui H., Ono K., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

Purification and characterization of pyruvate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Euglena gracilis*.

*J Biol Chem.*, 1987 Jul 5; **262**(19): 9130-5.

**Inui H., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

Pyruvate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *Euglena gracilis*: the kinetic properties of the enzyme.

*Arch Biochem Biophys.*, 1989 Nov 1; **274**(2): 434-42.

**Inui H., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *Euglena gracilis*: mechanism of O<sub>2</sub>-inactivation of the enzyme and its stability in the aerobic.

*Arch Biochem Biophys.*, 1990 Aug 1; **280**(2): 292-8.

**Inui H., Yamaji R., Saidoh H., Miyatake K., Nakano Y. and Kitaoka S.**

Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *Euglena gracilis*: limited proteolysis of the enzyme with trypsin.

*Arch Biochem Biophys.*, 1991 Apr; **286**(1): 270-6.

**Ishige T., Tani A., Takabe K., Kawasaki K., Sakai Y. and Kato N.**

Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase.

*Appl Environ Microbiol.*, 2002 Mar; **68**(3): 1192-5.

J

**Jacobson M.K. and Bernofsky C.**

Mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

*Biochim Biophys Acta.*, 1974 Jun 18; **350**(2): 277-91.

**Jakoby W.B.**

Aldehyde oxidation. I. Dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*.

*J Biol Chem.*, 1958 May; **232**(1): 75-87.

**Jakoby W.B.**

Aldehyde oxidation. II. Evidence for closely juxtaposed sulfhydryl groups on dehydrogenases.

*J Biol Chem.*, 1958 May; **232**(1): 89-97.

**Jancarik J. and Kim S.-H.**

Sparse matrix sampling; a screening method for crystallization of proteins.

*J Appl Cryst.*, 1991; **24**(4), 409-11.

**Jester J.V., Moller-Pedersen T., Huang J., Sax C.M., Kays W.T., Cavangh H.D., Petroll W.M. and Piatigorsky J.**

The cellular basis of corneal transparency: evidence for corneal crystallins.

*J Cell Sci.*, 1999 Mar; **112**(Pt 5): 613-22.

**Johansson K., El-Ahmad M., Ramaswamy S., Hjelmqvist L., Jornvall H. and Eklund H.**

Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution.

*Protein Sci.*, 1998; **7**(10): 2106-2117.

**Johnson G.R., Jain R.K. and Spain J.C.**

Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway.

*J Bacteriol.*, 2002 Aug; **184**(15): 4219-32. Erratum in: *J Bacteriol* 2002 Nov; **184**(21):6084.

**Johnson R.C. and Gilbertson J.R.**

Isolation, characterization, and partial purification of a fatty acyl coenzyme A reductase from bovine cardiac muscle.

*J Biol Chem.*, 1972 Nov 10; **247**(21): 6991-8.

**Jones K.H., Lindahl R., Baker D.C. and Timkovich R.**

Hydride transfer stereospecificity of rat liver aldehyde dehydrogenases.

*J Biol Chem.*, 1987 Aug 15; **262**(23): 10911-3.

**Kabsch W.**

Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.*, 1993; **26**: 795-800.

**Kedishvili N.Y., Popov K.M., Rougraff P.M., Zhao Y., Crabb D.W. and Harris R.A.**

CoA-dependent methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, a unique member of the aldehyde dehydrogenase superfamily. cDNA cloning, evolutionary relationships, and tissue distribution. *J Biol Chem.*, 1992 Sep 25; **267**(27): 19724-9.

**Kedishvili N.Y., Goodwin G.W., Popov K.M. and Harris R.A.**

Mammalian methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase. *Methods Enzymol.*, 2000; **324**: 207-18.

**Kelson T.L., Secor McVoy J.R. and Rizzo W.B.**

Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta.*, 1997 Apr 17; **1335**(1-2): 99-110.

**Kempf B. and Bremer E.**

Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.*, 1998 Oct; **170**(5): 319-30.

**Kitson T.M.**

The inactivation of aldehyde dehydrogenase by disulfiram in the presence of glutathione. *Biochem J.*, 1981 Oct 1; **199**(1): 255-8.

**Kitson T.M.**

Kinetics of p-nitrophenyl pivalate hydrolysis catalysed by cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem J.*, 1989 Jan 15; **257**(2): 573-8.

**Kitson T.M. and Kitson K.E.**

Probing the active site of cytoplasmic aldehyde dehydrogenase with a chromophoric reporter group. *Biochem J.*, 1994 May 15; **300**(Pt 1): 25-30.

**Kleywegt G.J., Henrick K., Dodson E.J. and van Aalten D.M.**

Pound-wise but penny-foolish: How well do micromolecules fare in macromolecular refinement? *Structure.*, 2003 Sep; **11**(9): 1051-1059.

**Kleywegt G.J., Zou J.Y. Kjeldgaard M. and Jones T.A.**

Around O. In: "International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules".

Rossmann M.G. and Arnold E., Editors, 2001. Chapter **17.1**: 353-356, 366-367. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

**Kleywegt G.J. and Jones T.A.**

Databases in protein crystallography.

*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 1998 Nov 1; **54**(Pt 6 Pt 1): 1119-11131. Review.

**Kleywegt G.J. and Jones T.A.**

Model-building and refinement practice.

*Methods in Enzymology.*, 1997; **277**: 208-230.

**Kleywegt G.J.**

Making the most of your search model.

*CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography.*, June 1996; **32**: 32-36.

**Kleywegt G.J.**

Dictionaries for Heteros.

*CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography.*, June 1995; **31**: 45-50.

**Koradi R., Billeter M. and Wüthrich K.**

MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures.  
*J Mol Graphics.*, 1996; **14**: 51-55.

**Kraemer R.J. and Deitrich R.A.**

Isolation and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1968 Dec 250; **243**(24): 6402-8.

**Kurys G., Shah P.C., Kikonygo A., Reed D., Ambroziak W. and Pietruszko R.**

Human aldehyde dehydrogenase. cDNA cloning and primary structure of the enzyme that catalyzes dehydrogenation of 4-aminobutyraldehyde.  
*Eur J Biochem.*, 1993 Dec 1; **218**(2): 311-20.

## L

**Lamb A.L. and Newcomer M.E.**

The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity.  
*Biochemistry.*, 1999 May 11; **38**(19): 6003-11.

**Landfald B. and Strom A.R.**

Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*.  
*J Bacteriol.* 1986 Mar; **165**(3): 849-55.

**Larson H.N., Weiner H. and Hurley T.D.**

Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "asian" variant.  
*J.Biol.Chem.*, 2005; **280**: 30550-30556.

**Lattman E.**

Diffraction methods for biological macromolecules. Use of the rotation and translation functions.  
*Methods Enzymol.*, 1985; **115**: 55-77.

**Lauvergeat V., Lacomme C., Lacombe E., Lasserre E., Roby D. and Grima-Pettenati J.**

Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria.  
*Phytochemistry.*, 2001 Aug; **57**(7): 1187-95.

**Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. and Thornton J.M.**

PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structures.  
*J. Applied Cryocrystallography*, 1993; **26**: 283-291.

**Lee C.Y. and Meighen E.A.**

Cysteine-286 as the site of acylation of the Lux-specific fatty acyl-CoA reductase.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1997 Apr 4; **1338**(2): 215-22.

**Le Rudulier D. and Bouillard L.**

Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae.  
*Appl Environ Microbiol.*, 1983 Jul; **46**(1): 152-9.

**Levy H.R. and Vennesland B.**

The stereospecificity of enzymatic hydrogen transfer from diphosphopyridine nucleotide.  
*J Biol Chem.*, 1957 Sep; **228**(1): 85-96.

**Lin Z., Carney G. and Rizzo W.B.**

Genomic organization, expression, and alternate splicing of the mouse fatty aldehyde dehydrogenase gene.  
*Mol Genet Metab.*, 2000 Nov; **71**(3): 496-505.

**Lin M., Zhang M., Abraham M., Smith S.M. and Napoli J.L.**

Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells.

*J Biol Chem.*, 2003 Mar 14; **278**(11): 9856-61.

**Lindahl R.**

Subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase from 2-acetylaminofluorene-induced rat hepatomas.

*Biochem J.*, 1979 Oct 1; **183**(1): 55-64.

**Lindahl R. and Evces S.**

Rat liver aldehyde dehydrogenase. I. Isolation and characterization of four high *K<sub>m</sub>* normal liver isozymes.

*J Biol Chem.*, 1984 Oct 10; **259**(19): 11986-90.

**Lindahl R. and Evces S.**

Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes.

*J Biol Chem.*, 1984 Oct 10; **259**(19): 11991-6.

**Lindahl R.**

Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis.

*Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 1992; **27**(4-5): 283-335. Review.

**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.**

The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold.

*Nat Struct Biol.*, 1997; **4**(4), 317-326.

**Loomes K. and Jörnvall H.**

Structural organization of aldehyde dehydrogenases probed by limited proteolysis.

*Biochemistry.*, 1991 Sep 10; **30**(36): 8865-70.

**Loomes K.M., Midwinter G.G., Blackwell L.F. and Buckley P.D.**

Evidence for reactivity of serine-74 with trans-4-(N,N-dimethylamino)cinnamaldehyde during oxidation by the cytoplasmic aldehyde dehydrogenase from sheep liver.

*Biochemistry.*, 1990 Feb 27; **29**(8): 2070-5.

**Lorentzen E., Hensel R., Knura T., Ahmed H. and Pohl E.**

Structural Basis of allosteric regulation and substrate specificity of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*.

*J Mol Biol.*, 2004 Aug 13; **341**(3): 815-28.

**Lossos A., Houry M., Rizzo W.B., Gomori J.M., Banin E., Zlotogorski A., Jaber S., Abramsky O., Argov Z. and Rosenmann H.**

Phenotypic variability among adult siblings with Sjogren-Larsson syndrome.

*Arch Neurol.*, 2006 Feb; **63**(2): 278-80.

**Luderitz T. and Grisebach H.**

Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP+ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.).

*Eur J Biochem.*, 1981 Sep; **119**(1): 115-24.

M

**MacGibbon A.K., Buckley P.D. and Blackwell L.F.**

Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1977 Sep 1; **165**(3): 455-62.

**MacGibbon A.K., Buckley P.D. and Blackwell L.F.**

Pre-steady-state kinetic studies on cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1977 Nov 1; **167**(2):469-77.

**MacKerell A.D. Jr, Vallari R.C. and Pietruszko R.**

Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethylthiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram.

*FEBS Lett.*, 1985 Jan 1; **179**(1): 77-81.

**McPherson A., Malkin A.J. and Kuznetsov Y.G.**

The science of macromolecular crystallization.

*Structure.*, 1995 Aug 15; **3**(8): 759-68. Review.

**Mann C.J. and Weiner H.**

Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases.

*Protein Sci.*, 1999 Oct; **8**(10): 1922-9.

**Manning N.J. and Pollitt R.J.**

Tracer studies of the interconversion of *R*- and *S*-methylmalonic semialdehydes in man.

*Biochem J.*, 1985 Oct 15; **231**(2): 481-4

**Manzer R., Qamar L., Estey T., Pappa A., Petersen D.R. and Vasiliou V.**

Molecular cloning and baculovirus expression of the rabbit corneal aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) cDNA.

*DNA Cell Biol.*, 2003 May; **22**(5): 329-38.

**Marchal S., Rahuel-Clermont S. and Branlant G.**

Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.

*Biochemistry*, 2000; **39**(12): 3327-3335.

**Marchal S., Cobessi D., Rahuel-Clermont S., Tete-Favier F., Aubry A. and Branlant G.**

Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.

*Chem Biol Interact.*, 2001; **130-132**(1-3): 15-28.

**Marchal S. and Branlant G.**

Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.

*J. Biol. Chem.*, 2002 Oct; **277**(42): 39235-42.

**Marshall V.D. and Sokatch J.R.**

Regulation of valine catabolism in *Pseudomonas putida*.

*J Bacteriol.*, 1972 Jun; **110**(3): 1073-81.

**Massey L.K., Sokatch J.R. and Conrad R.S.**

Branched-chain amino acid catabolism in bacteria.

*Bacteriol Rev.*, 1976 Mar; **40**(1): 42-54. Review.

**Marti-Renom M.A., Stuart A., Fiser A., Sanchez R., Melo F. and Sali A.**

Comparative protein structure modeling of genes and genomes.

*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000; **29**: 291-325.

**Mayer E.**

Vitrification of Pure Liquid Water.

*J. Microsc.*, 1985, **140**: 1-15.

**Metz J.G., Pollard M.R., Anderson L., Hayes T.R. and Lassner M.W.**

Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed.

*Plant Physiol.*, 2000 Mar; **122**(3): 635-44.

**Mitchell D.Y. and Peterson D.R.**

The oxydation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde deshydrogenases

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987; **87**(3): 403-410

**Modis Y. and Wierenga R.**

Two crystal structures of N-acetyltransferases reveal a new fold for CoA-dependent enzymes.

*Structure.*, 1998 Nov 15; **6**(11): 1345-50. Review.

**Montgomery M.K. and McFall-Ngai M.J.**

The muscle-derived lens of a squid bioluminescent organ is biochemically convergent with the ocular lens. Evidence for recruitment of aldehyde dehydrogenase as a predominant structural protein.

*J Biol Chem.*, 1992 Oct 15; **267**(29): 20999-1003.

**Moore S.A., Baker H.M., Blythe T.J., Kitson K.E., Kitson T.M. and Baker E.N.**

Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases.

*Structure*, 1998; **6**(12): 1541-1551.

**Murphy T.C., Amarnath V., Gibson K.M. and Sr Picklo M.J.**

Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A).

*J Neurochem.*, 2003 Jul; **86**(2): 298-305.

N

**Nakazawa M., Takenaka S., Ueda M., Inui H., Nakano Y. and Miyatake K.**

Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is stabilized by its cofactor, thiamin pyrophosphate, in mitochondria of *Euglena gracilis*

*Archiv Biochem Biophys.*, 2003; **411**(2): 183-188

**Nakazawa M., Inui H., Yamaji R., Yamamoto T., Takenaka S., Ueda M., Nakano Y., Miyatake K.**

The origin of pyruvate: NADP oxidoreductase in mitochondria of *Euglena gracilis*

*FEBS Lett.*, 2000; **479**: 155-156.

**Ni L., Zhou J., Hurley D. and Weiner H.**

Human liver mitochondrial aldehyde deshydrogase: three dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms.

*Protein Science*, 1999; **8**: 2784-2790.

**Niederreither K., McCaffery P., Drager U. C., Chambon P. and Dolle P.**

Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development.

*Mech. Dev.*, 1997; **62**(1): 67-78.

**Nirenberg, M.W. and Jakoby, W.B.**

Enzymatic utilization of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid.

*J. Biol. Chem.*, 1960; **235**(4): 954-960.

O

**O'Connell M.J and Kelly J.M.**

Physical characterization of the aldehyde-dehydrogenase-encoding gene of *Aspergillus niger*.

*Gene*. 1989 Dec 7; **84**(1): 173-80.

**Oguchi K., Tanaka N., Komatsu S. and Akao S.**

Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase is induced in auxin-stimulated and zinc-stimulated root formation in rice.

*Plant Cell Rep.*, 2004 Jun; **22**(11): 848-58.



**Ohlsson I., Nordstrom B. and Branden C.I.**

Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases.  
*J Mol Biol.*, 1974 Oct 25; **89**(2): 339-54.

**Olsen R.W.**

Chapter 12 : GABA

Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.

Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff.

American College of Neuropsychopharmacology 2002.

**P****Palosaari N.R. and Rogers P.**

Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*.

*J Bacteriol.*, 1988 Jul; **170**(7): 2971-6.

**Pappa A., Estey T., Manzer R., Brown D. and Vasiliou V.**

Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea.

*Biochem J.*, 2003 Dec 15; **376**(Pt 3): 615-23.

**Pearl P.L., Gibson K.M., Acosta M.T., Vezina L.G., Theodore W.H., Rogawski M.A., Novotny E.J., Gropman A., Conry J.A., Berry G.T. and Tuchman M.**

Clinical spectrum of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency.

*Neurology.*, 2003 May 13; **60**(9): 1413-7.

**Perez-Miller S.J. and Hurley T.D.**

Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase.

*Biochemistry.*, 2003 Jun 17; **42**(23): 7100-9.

**Piatigorsky J.**

Crystallin genes: specialization by changes in gene regulation may precede gene duplication.

*J Struct Funct Genomics.*, 2003; **3**(1-4): 131-7.

**Piatigorsky J., Norman B., Dishaw L.J., Kos L., Horwitz J., Steinbach P. and Kozmik Z.**

J3-crystallin of the jellyfish lens: similarity to saposins.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; **98**: 12352-12367.

**Piatigorsky J., Kozmik Z., Horwitz J., Ding L., Carosa E., Robison W.G. Jr., Steinbach P. and Tamm E.**

$\Omega$ -crystallin of the scallop lens. A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 enzyme-crystallin.

*J. Biol. Chem.*, 2000; **275**: 41064-41073.

**Pichon M., Courbou I., Beckert M., Boudet A.M. and Grima-Pettenati J.**

Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes.

*Plant Mol Biol.*, 1998 Nov 1; **38**(4): 671-6.

**Pohl E., Brunner N., Wilmanns M., and Hensel R.**

The Crystal Structure of the Allosteric Non-phosphorylating Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeum *Thermoproteus tenax*.

*The Journal of Biological Chemistry*, 2002; **277**(22): 19938-19945.

**Polgar L.**

Ion-pair formation as a source of enhanced reactivity of the essential thiol group of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

*Eur J Biochem.*, 1975 Feb 3; **51**(1): 63-71.

**Pollitt R.J., Green A. and Smith R.**

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.*, 1985; **8**(2): 75-9.

Q

**Quayle J.R. and Taylor G.A.**

Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (OXI). 5. Purification and properties of glyoxylic dehydrogenase.

*Biochem J.*, 1961 Mar; **78**: 611-5.

**Quayle J.R.**

Glyoxylate dehydrogenase

*Methods Enzymol.*, 1966, 9, 342-346.

R

**Racker E.**

Bovine liver aldehyde deshydrogenase

*J Biol Chem.*, 1949; **177**: 883-892

**Ralph J., Hatfield R.D., Piquemal J., Yahiaoui N., Pean M., Lapierre C. and Boudet A.M.**

NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998 Oct 27; **95**(22): 12803-8.

**Rao P.V., Garrow T.A., John F., Garland D., Millian N.S. and Zigler J.S. Jr.**

Betaine-homocysteine methyltransferase is a developmentally regulated enzyme crystallin in rhesus monkey lens.

*J Biol Chem.*, 1998 Nov 13; **273**(46): 30669-74.

**Reiser S. and Somerville C.**

Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase.

*J Bacteriol.*, 1997 May; **179**(9): 2969-75.

**Rhodes M.J.C. and Woollorton L.S.C.**

Enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol during the aging of disks of swede root tissue.

*Phytochemistry*, 1975; **14**(5-6): 1235-1240

**Riboldi-Tunncliffe A. and Hilgenfeld R.**

Cryocrystallography with oil - an old idea revived.

*J Appl Cryst.*, 1999; **32**(5), 1003-1005.

**Riendeau D., Rodriguez A. and Meighen E.**

Resolution of the fatty acid reductase from *Photobacterium phosphoreum* into acyl protein synthetase and acyl-CoA reductase activities. Evidence for an enzyme complex.

*J Biol Chem.*, 1982 Jun 25; **257**(12): 6908-15.

**Robinson W.G., Nagle R., Bachhawat B.K., Kupiecki F.P., and Coon M.J.**

Coenzyme A thiol esters of isobutyric, methacrylic, and beta-hydroxyisobutyric acids as intermediates in the enzymatic degradation of valine.

*J. Biol. Chem.*, 1957; **224**(1): 1-11.

**Rodgers D.W.**

Cryocrystallography.

*Structure.*, 1994 Dec 15; **2**(12): 1135-40. Review.

**Roe C.R., Struys E., Kok R.M., Roe D.S., Harris R.A. and Jakobs C.**

Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: psychomotor delay and methylmalonic aciduria without metabolic decompensation.

*Mol Genet Metab.*, 1998 Sep; **65**(1): 35-43.

**Rossmann M.G.**

The locked rotation function.

*J Mol Biol.*, 1972 Feb 28; **64**(1): 246-9.

**Rossmann M.G., Moras D. and Olsen K.W.**

Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein.

*Nature.*, 1974 Jul 19; **250**(463): 194-9.

**Rossmann M.G., Liljas M.G., Branden C. -I. and Banaszak L.J.**

Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases.

*The Enzymes*, 1975; **11**: 61-102, Boyer P. D., ed., Academic Press, New York.

**Rothschild H.A. and Guzman Barron E.S.**

The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase.

*J Biol Chem.*, 1954 Aug; **209**(2): 511-23.

**Roussel A. and Cambillau C.**

Turbo-Frodo, Silicons Graphics.

Applications directory, 1991, Silicon Graphics, Mountain View, CA, USA.

**Rout U.K. and Weiner H.**

Involvement of serine 74 in the enzyme-coenzyme interaction of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase.

*Biochemistry.*, 1994 Aug 2; **33**(30): 8955-61.

**Rudolph F.B., Purich D.L. and Fromm H.J.**

Coenzyme A-linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. I. Partial purification, properties, and kinetic studies of the enzyme.

*J Biol Chem.*, 1968 Nov 10; **243**(21): 5539-45.

S

**Saeki Y., Yasukouchi A., Nagatomo Y., and Takaki H.**

Distinctive Expression of a Zinc-Binding Protein in Rice Callus Grown in Medium with High Zinc Concentration.

*Soil Science and Plant Nutrition*, 2000; **46**(1): 209-216.

**Sali A. and Blundell T.L.**

Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.

*J. Mol. Biol.*, 1993; **234**: 779-815.

**Sarni F., Grand C. and Boudet A.M.**

Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*).

*Eur J Biochem.*, 1984 Mar 1; **139**(2): 259-65.

**Sauter C. and Giégé R.**

La cristallogénèse des macromolécules.

*Regard sur la biochimie*, 2001; **3**: 21-31.

**Seegmiller J.E.**

Triphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase from yeast.

*J Biol Chem.*, 1953 Apr; **201**(2): 629-37.

**Shone C.C. and Fromm H.J.**

Steady-state and pre-steady-state kinetics of coenzyme A linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1981 Dec 22; **20**(26): 7494-501.

**Sladek N.E.**

Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr Pharm Des.*; 1999 Aug; **5**(8): 607-25. Review.

**Smith L.T. and Kaplan N.O.**

Purification, properties, and kinetic mechanism of coenzyme A-linked aldehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Arch Biochem Biophys.*, 1980 Sep; **203**(2): 663-75.

**Sophos N.A. and Vasiliou V.**

Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact.*, 2003 Feb; **143-144**: 5-22.

**Sokatch J.R., Sanders L.E. and Marshall V.P.**

Oxidation of methylmalonate semialdehyde to propionyl coenzyme A in *Pseudomonas aeruginosa* grown on valine. *J Biol Chem.*, 1968 May 25; **243**(10): 2500-6.

**Soukri A., Mouglin A., Corbier C., Wonacott A., Branlant C. and Branlant G.**

Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 1989 Mar 21; **28**(6): 2586-92.

**Spain J.C.**

Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.*, 1995; **49**: 523-55.

**Sridhara S. and Wu T.T.**

Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 1969 Oct 10; **244**(19): 5233-8.

**Steele M.I., Lorenz D., Hatter K., Park A. and Sokatch J.R.**

Characterization of the mmsAB operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem.*, 1992 Jul 5; **267**(19): 13585-92.

**Steinman C.R. and Jakoby W.B.**

Yeast aldehyde dehydrogenase. I. Purification and crystallization. *J Biol Chem.*, 1967 Nov 10; **242**(21): 5019-23.

**Steinman C.R. and Jakoby W.B.**

Yeast aldehyde dehydrogenase. II. Properties of the homogeneous enzyme preparations. *J Biol Chem.*, 1968 Feb 25; **243**(4): 730-4

**Steinmetz C. G., Xie P., Weiner H. and Hurley T. D.**

Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, 1997; **5**(5): 701-711.

**Stewart M.J., Malek K., Xiao Q., Dipple K.M. and Crabb D.W.**

The novel aldehyde dehydrogenase gene, ALDH5, encodes an active aldehyde dehydrogenase enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1995 Jun 6; **211**(1): 144-51.

**Stines-Chaumeil C.**

Caractérisation enzymatique de la Méthylmalonate semialdéhyde deshydrogénase de *Bacillus subtilis*. Thèse, Enzymologie moléculaire, Nancy 1 2005.

**Stines-Chaumeil C., Talfournier F. and Branlant G.**

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

*Biochem J.*, 2006 Apr 1; **395**(1): 107-15.

**Strauss G. and Fuchs G.**

Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* the 3-hydroxypropionate cycle.

*Eur J Biochem.*, 1993 Aug 1; **215**(3): 633-43.

T

**Tanaka K., Armitage I.M., Ramsdell H.S., Hsia Y.E., Lipsky S.R. and Rosenberg L.E.**

[13C]Valine metabolism in methylmalonicacidemia using nuclear magnetic resonance: propionate as an obligate intermediate.

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1975 Sep; **72**(9): 3692-6.

**Takahashi K., Weiner H. and Filmer D.L.**

Effects of pH on horse liver aldehyde dehydrogenase: alterations in metal ion activation, number of functioning active sites, and hydrolysis of the acyl intermediate.

*Biochemistry.*, 1981 Oct 13; **20**(21): 6225-30.

**Takahashi K., Weiner H. and Hu J.H.**

Increase in the stoichiometry of the functioning active sites of horse liver aldehyde dehydrogenase in the presence of magnesium ions.

*Arch Biochem Biophys.*, 1980 Dec; **205**(2): 571-8.

**Takahashi K. and Weiner H.**

Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites.

*J Biol Chem.*, 1980 Sep 10; **255**(17): 8206-9.

**Ting H.H. and Crabbe M.J.**

Bovine lens aldehyde dehydrogenase. Kinetics and mechanism.

*Biochem J.*, 1983 Nov 1; **215**(2): 361-8.

**Tomarev S.I., Zinovieva R.D. and Piatigorsky J.**

Crystallins of the octopus lens. Recruitment from detoxification enzymes.

*J Biol Chem.*, 1991 Dec 15; **266**(35): 24226-31.

**Tomarev S.I. and Piatigorsky J.**

Lens crystallins of invertebrates--diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins.

*Eur J Biochem.*, 1996 Feb 1; **235**(3): 449-65.

**Tong L.A. and Rossmann M.G.**

The locked rotation function.

*Acta Crystallogr A.*, 1990 Oct 1; **46**(Pt 10): 783-92.

**Townsend A.J., Leone-Kabler S., Haynes R.L., Wu Y., Szweda L. and Bunting K.D.**

Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells.

*Chem Biol Interact.*, 2001 Jan 30; **130-132**(1-3): 261-73.

**Turteltaub K.W. and Murphy P.A.**

Subcellular localization and capacity of beta-oxidation and aldehyde dehydrogenase in porcine liver.

*Arch Biochem Biophys.*, 1987 May 15; **255**(1): 120-6.

U

**Uchida K.**

Cellular response to bioactive lipid peroxidation products.  
*Free Radic Res.*, 2000 Dec; **33**(6): 731-7.

**Ueshima Y., Matsuda Y., Tsutsumi M. and Takada A.**

Role of the aldehyde dehydrogenase-1 isozyme in the metabolism of acetaldehyde.  
*Alcohol Alcohol Suppl.*, 1993; **1B**: 15-9.

V

**Vallari R.C. and Pietruszko R.**

Interaction of Mg<sup>2+</sup> with human liver aldehyde dehydrogenase. I. Species difference in the mitochondrial isozyme.  
*J Biol Chem.*, 1984 Apr 25; **259**(8): 4922-6.

**Vallari R.C. and Pietruszko R.**

Interaction of Mg<sup>2+</sup> with human liver aldehyde dehydrogenase. II. Mechanism and site of interaction.  
*J Biol Chem.*, 1984 Apr 25; **259**(8): 4927-33.

**Valle D., Goodman S.I., Applegarth D.A., Shih V.E. and Phang J.M.**

Type II hyperprolinemia. Delta1-pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase deficiency in cultured skin fibroblasts and circulating lymphocytes.  
*J Clin Invest.*, 1976 Sep; **58**(3): 598-603.

**Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F. and Nebert D.W.**

Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping.  
*Pharmacogenetics.*, 1999 Aug; **9**(4): 421-34.

**Vasiliou V., Pappa A. and Estey T.**

Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism.  
*Drug Metab Rev.*, 2004 May; **36**(2): 279-99. Review.

**Vasiliou V., Estey T., Black W., Weston P. and Lassen N.**

Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily Database.  
Dr. Vasilis Vasiliou's laboratory at the University of Colorado's Health Sciences Center.  
<http://www.aldh.org/>

**Vedadi M., Szittner R., Smillie L. and Meighen E.**

Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP(+)-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*.  
*Biochemistry.*, 1995 Dec 26; **34**(51): 16725-32.

**Velasco-Garcia R., Zaldivar-Machorro V.J., Mujica-Jimenez C., Gonzalez-Segura L. and Munoz-Clares R.A.**

Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase: a potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Biochem Biophys Res Commun.*, 2006 Mar 10; **341**(2): 408-15.

**Vioque J. and Kolattukudy P.E.**

Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L.).  
*Arch Biochem Biophys.*, 1997 Apr 1; **340**(1): 64-72

**Vogels G.D. and Van der Drift C.**

Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms.  
*Bacteriol Rev.*, 1976 Jun; **40**(2): 403-68. Review.

**Vojtechova M., Hanson A.D. and Munoz-Clares R.A.**

Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfiopropionaldehyde to dimethylsulfiopropionate.

*Arch Biochem Biophys.*, 1997 Jan 1; **337**(1): 81-8.

**von Bahr-lindstrom H., Sohn S., Woenckhaus C., Jeck R. and Jornvall H.**

Characterization of a Structure Close to the Coenzyme-Binding Site of Liver Aldehyde Dehydrogenase

*Eur J Biochem.*, 1981; **117**: 521 -526

**von Bahr-Lindstrom H., Jeck R., Woenckhaus C., Sohn S., Hempel J. and Jörnvall H.**

Characterization of the coenzyme binding site of liver aldehyde dehydrogenase: differential reactivity of coenzyme analogues.

*Biochemistry.*, 1985 Oct 8; **24**(21): 5847-51.

**von Tigerstrom R.G. and Razzell W.E.**

Aldehyde dehydrogenase. I. Purification and properties of the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*.

*J Biol Chem.*, 1968 May 25; **243**(10): 2691-702.

**von Tigerstrom R.G. and Razzell W.E.**

Aldehyde dehydrogenase. II. Physical and molecular properties of the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*.

*J Biol Chem.*, 1968 Dec 25; **243**(24): 6495-503.

W

**Wall L. and Meighen E.A.**

Subunit Structure of the Fatty Acid Reductase Complex from *Photobacterium phosphoreumi*

*Biochemistry*, 1986; **25**(15): 4315-4321

**Wall L., Rodriguez A. and Meighen E.**

Intersubunit transfer of fatty acyl groups during fatty acid reduction.

*J Biol Chem.*, 1986 Dec 5; **261**(34): 15981-8.

**Wall L. and Meighen E.**

Covalent reaction of cerulenin at the active site of acyl-CoA reductase of *Photobacterium phosphoreum*.

*Biochem Cell Biol.*, 1989 Feb-Mar; **67**(2-3): 163-7.

**Walsh T.A., Green S.B., Larrinua I.M. and Schmitzer P.R.**

Characterization of plant beta-ureidopropionase and functional overexpression in *Escherichia coli*.

*Plant Physiol.*, 2001 Feb; **125**(2): 1001-11.

**Wang X. and Kolattukudy P.E.**

Solubilization, purification and characterization of fatty acyl-CoA reductase from duck uropygial gland.

*Biochem Biophys Res Commun.*, 1995 Mar 8; **208**(1): 210-5.

**Wang X., Penzes P. and Napoli J. L.**

Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate.

*J. Biol. Chem.*, 1996 ; **271**(27): 16288–16293.

**Wang Y. and Weiner H.**

Evaluation of electrostatic and hydrophobic effects on the interaction of mitochondrial signal sequences with phospholipid bilayers.

*Biochemistry.*, 1994 Nov ; **33**(43): 12860-7.

**Wang X, Weiner H.**

Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis.

*Biochemistry*, 1995 Jan 10; **34**(1):237-43.



**Waters P. and Venables W.A.**

A complete pathway for  $\beta$ -alanine and  $\beta$ -amino-iso-butyrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*.  
*FEMS Microbiology Letters*, 1986; **34**: 279-282.

**Weiner H., Hu J.H. and Sanny C.G.**

Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase.  
*J Biol Chem.*, 1976 Jul 10; **251**(13): 3853-5.

**Weil. J.H.**

Biochimie Generale - Cours et Questions de révision  
10ème édition 2005.  
Editeur : *Dunod*.

**Wengenmayer H., Ebel J. and Grisebach H.**

Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of a cinnamoyl-CoA: NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*).  
*Eur J Biochem.*, 1976 Jun 1; **65**(2): 529-36.

**Weretilnyk E.A. and Hanson A.D.**

Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity.  
*Arch Biochem Biophys.*, 1989 May 15; **271**(1): 56-63.

**Willemsen M.A., IJlst L., Steijlen P.M., Rotteveel J.J., de Jong J.G., van Domburg P.H., Mayatepek E., Gabreels F.J. and Wanders R.J.**

Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjogren-Larsson syndrome.  
*Brain.*, 2001 Jul; **124**(Pt 7): 1426-37. Review.

**Wiseman J.S., Tayrien G. and Abeles R.H.**

Kinetics of the reaction of cyclopropanone hydrate with yeast aldehyde dehydrogenase: a model for enzyme-substrate interaction.  
*Biochemistry.*, 1980 Sep 2; **19**(18): 4222-31.

**Wistow G. and Kim H.**

Lens protein expression in mammals: taxon-specificity and the recruitment of crystallins.  
*J Mol Evol.*, 1991 Mar; **32**(3): 262-9.

Y

**Yamada E.W. and Jakoby W.B.**

Aldehyde oxidation. V. Direct conversion of malonic semialdehyde to acetyl-coenzyme A.  
*J Biol Chem.*, 1960 Mar; **235**: 589-94.

**Yan R.T. and Chen J.S.**

Coenzyme A-Acylating Aldehyde Dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592  
*Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 1990; **56**(9): 2591-2599

**Yoshida A., Huang I.Y. and Ikawa M.**

Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1984 Jan; **81**(1): 258-61.

**Yoshida A., Hsu L.C. and Dave V.**

Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase.  
*Enzyme.*, 1992; **46**(4-5): 239-44.

**Yoshida K., Fujimura M., Yanai N. and Fujita Y.**

Cloning and sequencing of a 23-kb region of the *Bacillus subtilis* genome between the *iol* and *hut* operons.  
*DNA Res.*, 1995 Dec 31; **2**(6): 295-301.

**Yoshida K.I., Aoyama D., Ishio I., Shibayama T. and Fujita Y.**  
Organization and transcription of the myo-inositol operon *iol*, of *Bacillus subtilis*.  
*J Bacteriol.*, 1997 Jul; **179**(14): 4591-8.

Z

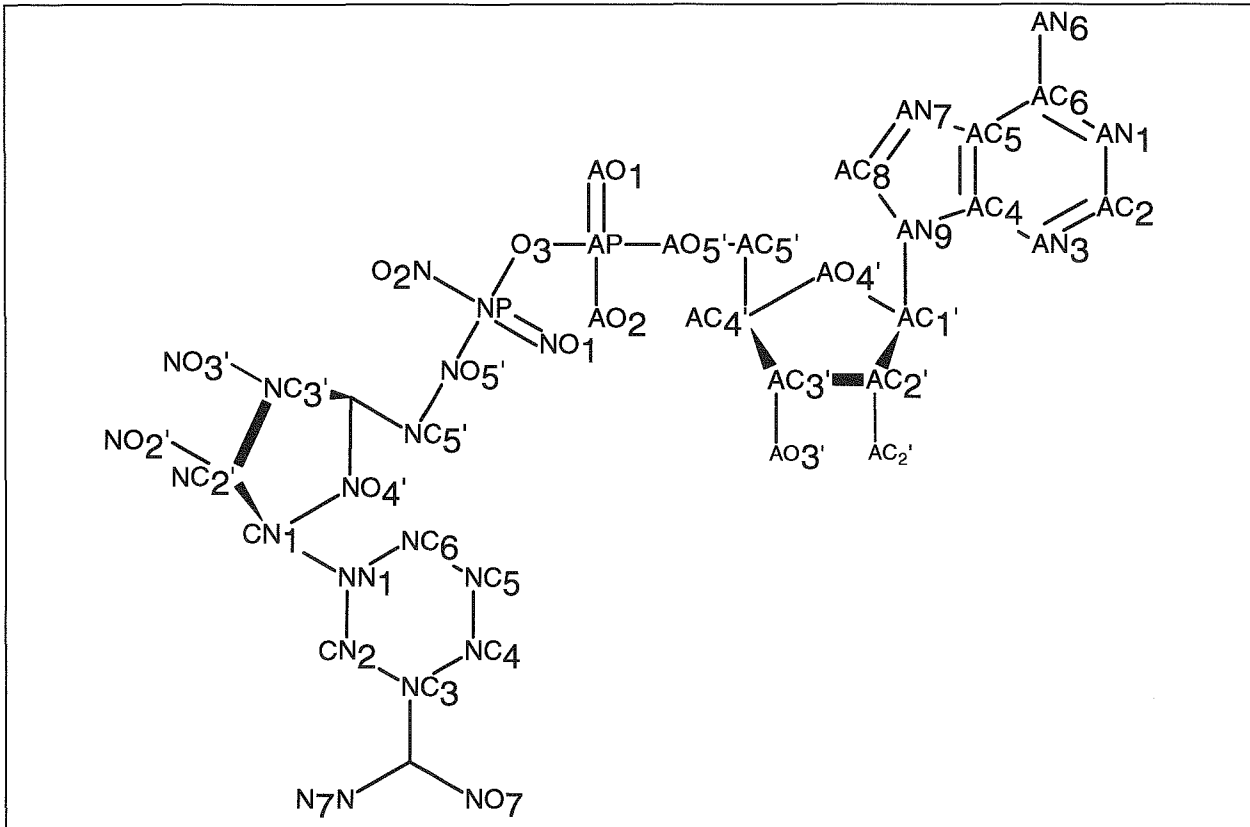
**Zeisel S.H. and Wurtman R.J.**  
Developmental changes in rat blood choline concentration.  
*Biochem J.*, 1981 Sep 15; **198**(3): 565-70.

**Zinovieva R.D., Tomarev S.I. and Piatigorsky J.**  
Aldehyde dehydrogenase-derived omega-crystallins of squid and octopus. Specialization for lens expression.  
*J Biol Chem.*, 1993 May 25; **268**(15): 11449-55.

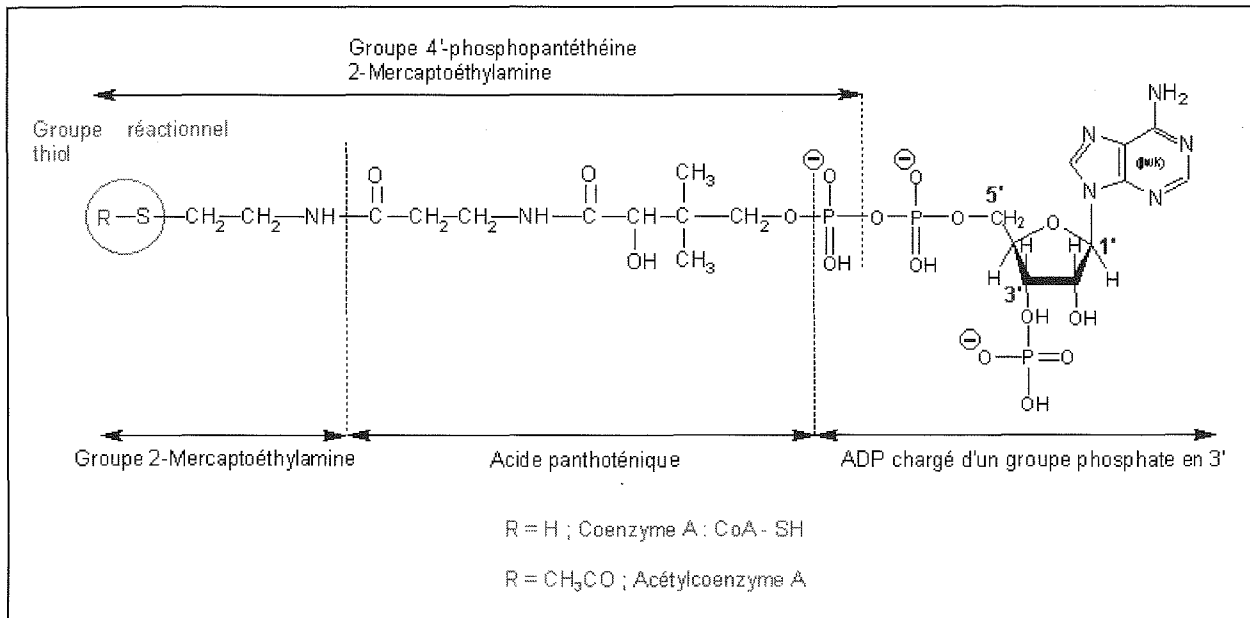
**Zhang Y.X., Tang L. and Hutchinson C.R.**  
Cloning and characterization of a gene (*msdA*) encoding methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor*.  
*J Bacteriol.*, 1996 Jan; **178**(2): 490-5.

**Zhu Y. and Lin E.C.**  
L-1,2-propanediol exits more rapidly than L-lactaldehyde from *Escherichia coli*.  
*J Bacteriol.*, 1989 Feb; **171**(2): 862-7.

# *Annexes*



**Schéma 1 :** Nomenclature de nomination des atomes du NAD<sup>+</sup>.



**Schéma 2 :** Schéma descriptif des entités qui compose le coenzyme A.

*Publication*

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

Hélène Dubourg,<sup>a</sup> ‡ Claire Stines-Chaumeil,<sup>b</sup> ‡ Claude Didierjean,<sup>a\*</sup> François Talfournier,<sup>b</sup> Sophie Rahuel-Clermont,<sup>b</sup> Guy Branlant<sup>b</sup> and André Aubry<sup>a</sup>

<sup>a</sup>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

<sup>b</sup>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](mailto:claude.didierjean@lcm3b.uhp-nancy.fr)

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.

Received 29 March 2004

Accepted 21 May 2004

## 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 acidemia 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  $\beta$ -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'-GAAGGAGGCAATACATATGGCAGAAATCAG-3' and 5'-CTTACGCAACAAA-GAGCTCATAGAGAAGC-3', respectively. The forward primer contains an *NdeI* restriction site (in bold) and the reverse primer contains a *SacI* 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* DH5 $\alpha$  transformants containing the pSKmsdbsub plasmid were grown at 310 K for 24 h in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Cells were harvested by centrifugation (20 min at 3000g) at 277 K and the pellet was suspended in 50 mM potassium

phosphate pH 8.2 (buffer A) containing 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Cells were disrupted by sonication, after which unbroken cells and debris were removed by centrifugation (45 min at 20 000g). 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 mM KCl with a linear gradient of 0–1 M KCl in buffer A at 5 ml min<sup>-1</sup>.

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 mM  $\beta$ -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<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 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 mM DTT, 1 mM EDTA and finally concentrated using a Centricon (Amicon/Millipore) with 30 kDa molecular-weight cutoff at 4500g 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 mM NAD. Crystallization experiments were performed using the hanging-drop vapour-diffusion method (Ducruix & Giegé, 1999) at room temperature. Drops were prepared by mixing 2  $\mu$ l protein solution with an equal volume of reservoir solution and were suspended over 500  $\mu$ l reservoir solution. The protein concentration used for the first screenings was 10 mg ml<sup>-1</sup>. Initial crystallization trials were carried out at 277 and 293 K using

**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)
$R_{\text{merge}}^\dagger$ (%)	13.8 (37.2)

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

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.

## 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  $\varphi$  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<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>.

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<sup>3</sup> Da<sup>-1</sup> (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. Inher. 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. & Vrieling, 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.

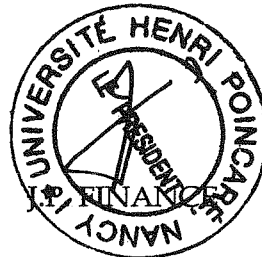
Madame GERECKE - DUBOURG Hélène

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en ENZYMOLOGIE MOLECULAIRE & BIOLOGIE STRUCTURALE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *N°1226*

Nancy, le *30/10/06*

Le Président de l'Université



## Résumé

La méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MSDH) a été mise en évidence chez les eubactéries, les archéons et les mammifères. Selon les organismes, elle intervient dans le catabolisme de la valine, du *myo*-inositol, de la thymine et des composés issus de la voie de dégradation de la  $\beta$ -alanine (uracile et cytidine). Elle catalyse respectivement l'oxydation du méthylmalonate semialdéhyde (MMSA) et du malonate semialdéhyde en propionyl-coenzymeA et acétyl-coenzymeA. La MSDH appartient à la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) non-phosphorylantes et  $\text{NAD(P)}^+$ -dépendantes. La plupart de ces enzymes catalysent, en deux étapes, l'oxydation d'aldéhydes en leurs acides correspondants via le passage par un intermédiaire acylenzyme. Ce dernier est formé par attaque nucléophile d'un résidu cystéyl invariant sur le carbone électrophile de la fonction aldéhydique. L'attaque nucléophile d'une molécule d'eau activée permet la formation du produit de la réaction. La MSDH est une enzyme singulière car c'est une aldéhyde deshydrogénase décarboxylante,  $\text{NAD}^+$  et coenzymeA -dépendante qui procède en trois étapes. La première étape, au cours de laquelle l'acylenzyme et le NADH sont produits, est commune à celle des autres ALDHs. Cependant, contrairement aux autres ALDHs, le cofacteur réduit est libéré à l'issue de cette étape. Les deuxième et troisième étapes sont respectivement la  $\beta$ -décarboxylation, qui est l'étape limitante de la réaction, et la désacylation qui nécessite la fixation préalable du coenzymeA (CoA) pour produire l'acyl-CoA.

Le travail de thèse a consisté à déterminer des structures cristallographiques de la MSDH de *Bacillus subtilis* (*Bs\_MSDH*) en complexe avec ses substrats, en vue d'apporter des éléments structuraux indispensables à la compréhension de son mécanisme enzymatique singulier. Quatre structures cristallographiques de complexes enzyme/substrat(s) ont été obtenues par cocristallisation ou diffusion des substrats de la *Bs\_MSDH* : complexes *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$  (code PDB, 1t90), *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$ /MMSA, *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$ /CoA et *Bs\_MSDH*/CoA. La structure tridimensionnelle de la *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$  est la première structure de MSDH déterminée. Cette dernière se présente sous la forme d'un homotétramère comparable à celui des ALDHs tétramériques connues. Chaque monomère se subdivise en trois domaines : de fixation du cofacteur, catalytique et d'oligomérisation. Tous les éléments moléculaires et structuraux, indispensables au déroulement de la première étape chez les aldéhydes deshydrogénases, sont présents chez la *Bs\_MSDH*. Cette structure est la seule structure d'holoenzyme d'aldéhyde deshydrogénase à rôle catalytique, dans laquelle l'ensemble du cofacteur est bien fixé. Le groupement nicotinamide, en position de transfert d'hydrure, est la partie la mieux stabilisée du  $\text{NAD}^+$ . De plus, le site de fixation de l'adénine du cofacteur diffère de celui des autres ALDHs de telle sorte que l'adénine est moins bien ancrée dans la *Bs\_MSDH*.

La structure de l'acylenzyme a été obtenue avec une enzyme non modifiée, par diffusion du MMSA dans les cristaux *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$ . Cette structure d'acylenzyme ne présente pas de molécule de  $\text{NAD}^+$  ou de NADH. Ces résultats sont en accord avec la cinétique enzymatique de type ping-pong où le NADH est libéré avant la décarboxylation et la fixation du CoA. Les substrats modélisés présentent toujours leur fonction acide en position  $\beta$ , ce qui est en accord avec la cinétique enzymatique. D'après la structure de l'acylenzyme, la  $\beta$ -décarboxylation serait favorisée par la présence du site oxyanion et résulterait de l'attaque d'une molécule d'eau non activée par des résidus aminoacyls de l'enzyme, sur le carbone électrophile de la fonction carboxylique.

Les structures des complexes *Bs\_MSDH*/ $\text{NAD}^+$ /CoA et *Bs\_MSDH*/CoA révèlent que le CoA se fixe dans le site actif de l'enzyme. Le site de fixation du CoA est composé d'éléments de structures secondaires appartenant à trois monomères d'un même tétramère. L'analyse des alignements de structures primaires et des structures tridimensionnelles des enzymes de la famille des aldéhyde deshydrogénases a permis de révéler une séquence signature d'aminocyls PxP, appartenants à la boucle de spécificité de fixation du substrat, caractéristique de la fixation du CoA chez les aldéhyde deshydrogénases CoA-dépendantes.